HAL
open science

Rhizodéposition du carbone et de l'azote chez quatre espèces de Fabacées, conséquences sur la structure et l'activité du microbiote du sol.

Mohamed Kante

To cite this version:

Mohamed Kante. Rhizodéposition du carbone et de l'azote chez quatre espèces de Fabacées, conséquences sur la structure et l'activité du microbiote du sol.. Sciences agricoles. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR022 . tel-03938887

HAL Id: tel-03938887

https://theses.hal.science/tel-03938887

Submitted on 14 Jan 2023

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

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

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Rhizodéposition du carbone et de l'azote chez quatre espèces de Fabacées, conséquences sur la structure et l'activité du microbiote du sol.

Présentée et soutenue par
MOHAMED KANTE

Thèse soutenue le 13/07/2022 devant le jury composé de		
MME ODILE BERGE	CHARGE DE RECHERCHE, INST NAT RECH AGRO d'AVIGNON	Rapporteur du jury
M. GAÉTAN LOUARN	DIRECTEUR DE RECHERCHE, CENTRE REGIONAL INRA POITOU-CHARENTES	Rapporteur du jury
M. STÉPHANE BAZOT	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris-Saclay	Membre du jury
MME WASSILA RIAH-ANGLET	CHARGE DE RECHERCHE, UNILASALLE	Membre du jury
MME CATHERINE ROUMET	DIRECTEUR DE RECHERCHE, CTRE NAT RECH SCIENTIFIQUE	Membre du jury
MME MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Caen Normandie	Président du jury
MME ISABELLE TRINSOUTROT-GATTIN	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNILASALLE	Directeur de thèse
M. JEAN-BERNARD CLIQUET	MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par ISABELLE TRINSOUTROT-GATTIN (AGROECOLOGIE, HYDROGEOCHIMIE, MILIEUX ET RESSOURCES) et JEAN-BERNARD CLIQUET (Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen))

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

UniLaSalle Terre & Sciences

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Aghyle UP 2018.C101 UniLaSalle

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de Doctorat

Spécialité Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-alimentaires

Préparée au sein de l'unité AGHYLE AGroécologie, HYdrogéochimie, miLieux et rEssources d'UniLasalle Rouen et UMR INRAe-UCN 950 EVA Écophysiologie Végétale Agronomie et nutritions N, C, S de l'Université de Caen Normandie

Rhizodéposition du carbone et de l'azote chez quatre espèces de Fabacées, conséquences sur la structure et l'activité du microbiote du sol

Présentée et soutenue par
Mohamed KANTÉ

Thèse soutenue le 13/07/2022 devant le jury composé de		
Monsieur Gaëtan LOUARN	Directeur de Recherche INRAe Unité de Recherche UR P3F, Lusignan	Rapporteur
Madame Odile BERGE	Chargée de Recherche HDR Unité de Recherches de Pathologie Végétale INRAe PACA	Rapportrice
Monsieur Stéphane BAZOT	Professeur des Universités UMR 8079 UPSAY, CNRS AgroParisTech, Université Paris Saclay Orsay	Examinateur
Madame Catherine ROUMET	Directrice de recherche CNRS CEFE/CNRS, Campus du CNRS, Montpellier	Examinatrice
Madame Marie-Pascale PRUD'HOMME	Professeur des Universités UMR INRAe EVA Université de Caen, Normandie	Examinatrice
Madame Isabelle TRINSOUTROT-GATTIN	Directrice de l'unité de recherche AGHYLE (HDR) UniLaSalle, Campus Rouen, Normandie	Directrice de thèse
Monsieur Jean-Bernard CLIQUET	Maître de conférences (HDR) UMR INRAe EVA Université de Caen, Normandie	Co-directeur de thèse
Madame Wassila RIAH-ANGLET	Chargée de recherche UniLaSalle Campus Rouen, Normandie	Encadrante de thèse

Thèse co-dirigée par Isabelle TRINSOUTROT-GATTIN (Unité AGHYLE, UniLaSalle Rouen) et Jean-Bernard CLIQUET (UMR INRAe-UCN 950 EVA Écophysiologie Végétale Agronomie et nutritions NCS), et encadrée par Wassila RIAH-ANGLET (Unité AGHYLE, UniLaSalle Rouen)

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE · Aghyle UniLaSalle UP2018.C101 · ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement · UNICAEN UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE · EVA Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier la région Normandie pour le financement de cette thèse ainsi que l'environnement académique ayant accompagné ce travail, l'école doctorale ED 497 NBISE , l'Université de Rouen et l'Université de Caen.

Je voudrais également remercier Philippe Choquet, directeur général d'UniLaSalle, Marie Lummerzheim, directrice d'UnilaSalle sur le campus de Rouen, et Karine Laval, directrice de Recherche à UniLaSalle, pour leur accueil dans leur établissement via l'unité de recherche AGHYLE sur le campus de Rouen. Je suis également reconnaissant envers Marie-Pascale Prud'Homme ancienne directrice de l'UMR INRAe EVA Université de Caen, l'actuel directeur Philippe Lainé et son adjoint Philippe Etienne pour leur accueil dans leur unité de recherche et pour avoir facilité mes trajets aller-retour entre Caen et Rouen. Merci également à Sophie Vogel Delle Cave pour son aide administrative.

Je remercie Gaëtan Louarn et Odile Berge d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse, ainsi que Stéphane Bazot, Catherine Roumet et Marie-Pascale Prud'homme d'avoir accepté d'en être examinateurs.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à ma directrice de thèse Isabelle Trinsoutrot-Gattin, merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour tes conseils scientifiques avisés et ta bienveillance. À mon co-directeur de thèse, Jean-Bernard Cliquet, merci énormément pour ta confiance durant toutes ces années depuis mes stages de M1 et M2 jusqu'à cette thèse, tu as toujours été très disponible et bienveillant à mon égard, merci également pour ta patience et pour m'avoir fait évoluer scientifiquement. Je voudrais également remercier chaleureusement mon encadrante Wassila Riah- Anglet, j'ai beaucoup appris en travaillant avec toi, merci pour ta réactivité face aux obstacles rencontrés, ton écoute et ton enthousiasme qui a été un réel moteur pour moi.

Je souhaite aussi adresser mes remerciements à Pascal Favrel, Jeremy Lotier, Eric Gontier et Marc Rollin pour le temps qu'ils ont consacré à mon comité de suivi individuel, vos conseils ont été précieux et merci pour vos encouragements.

Merci aux membres des unités AGHYLE et EVA pour leur sympathie et les moments d'échanges enrichissants que ce soit scientifiques ou non, je vous remercie pour ce cadre de travail agréable et pour la contribution de certains d'entre vous au bon déroulement de cette thèse.

Au sein de l'unité AGHYLE, merci à Mélanie Bressan pour son aide, sa disponibilité et ses conseils pour la mise place et les analyses par DNA SIP. Merci également à Elodie Cusset pour son aide pour les analyses statistiques. J'adresse des remerciements particuliers à toute l'équipe technique. Merci à Lisa et Anne pour leur gentillesse et leur bonne humeur, pour leurs aides pour les analyses biomoléculaires et biochimiques, pour le prélèvement des sols, le tamisage et les récoltes. Un grand merci également à Franck, Davy et Cédric du service informatique pour leur assistance. Merci également à Babacar, Nadia et les deux Adrien pour leur sympathie.

A mes collègues doctorants que j'ai pu côtoyer à Rouen : Cyrine, Pauline, Mehdi, merci pour les moments partagés. Merci également à Desire, Angel, Maya et Anouck pour leur gentillesse. Je vous souhaite à tous le meilleure pour la suite.

Au sein de l'UMR EVA, je remercie Emmanuelle Personeni pour ses conseils sur l'analyse de l'architecture des racines. Merci également à Jacque Trouverie pour son assistance informatique. Un grand remerciement aux personnes qui ont donné de leur temps pour mes récoltes surtout pour le tri des racines : Servane, Jean-François, Marie, Pierre, Lucie, Antoine, Paul, Hanh merci pour votre gentillesse. Merci à Philippe Lainé pour son aide pendant les pannes du Phytotron et pour avoir fait le nécessaire pour la restauration de mon écran d'ordinateur. Merci également à Annette et Sophie pour leur grande gentillesse. J'exprime aussi toute ma gratitude à l'ensemble de l'équipe technique. Josiane et Magali, merci pour votre disponibilité sans faille pour les récoltes et les broyages, merci également pour votre amabilité et bonne volonté. Merci à Julie pour sa réactivité pour les pannes de centrifugeuse et son aide pour la mise en culture des rhizobia. Merci à Bénédicte pour le broyage des gros échantillons. Un grand merci à Oliver pour ses réalisations sur mesure pour les besoins de mes cultures et son aide technique concernant le phytotron.

Je remercie chaleureusement Anne-Françoise pour son aide précieuse de la mise en place de mes cultures aux récoltes, merci également pour tout ton soutien et ta bienveillance à mon égard.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à la team PLATIN : Sylvain, Fanny, Jéhane, Manu, Frédérine, Quentin et Josette. Merci pour votre gentillesse et votre engagement pour les analyses IRMS réalisées dans les temps et pour votre réactivité lorsqu'il était nécessaire de refaire des analyses.

Merci aux stagiaires Théophile, Pierre, Kouakou et Joey pour leurs précieuses implications et leur sympathie. Merci également aux autres stagiaires que j'ai rencontrés. Lucile, Clara, Thibault, Julien, Lucie, merci pour votre gentillesse et les moments partagés.

Merci à tous les collègues avec qui j'ai partagé le même bureau en tant que stagiaire puis en tant que doctorant à Caen, Marion, Laetitia, Charlotte, Hans, Antoine, Lethicia, Victor, Aurélien, Galatéa, Hanh, Raphaël, Jérémy, merci pour tous ces bons souvenirs et toutes ces discussions. Je vous souhaite à tous le meilleur pour l'avenir. Merci également à Maxence, Cylia, Emilie et Aurelia pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

A mes très chers parents, Cheick et Sitan, merci pour toutes les valeurs humaines que vous m'avez transmises et de m'avoir toujours encouragé dans mes choix. Malgré la distance, vous avez été pour moi un soutien indispensable et une source de motivation. Je tiens également à exprimer mes sentiments les plus affectueux à mon frère Aboubacar et à ma sœur Salimata pour leurs encouragements et leurs conseils.

A mon épouse Ambidati, merci pour ta patience durant ces quatre années de thèse et pour tous ces moments de bonheur et de réconfort. Ton soutien quotidien et tes conseils ont été essentiels pour le sprint final et mes moments de doute. Ajouter à cela la présence de notre petit cœur d'amour, Malya Sitan qui par sa présence a apporté de la douceur aux journées compliquées et a été une grande source de motivation pour moi.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers Claudie, pour m'avoir accompagné dans mes premiers pas en France, en me suivant et en m'encourageant dans mon parcours. Je te remercie pour tous ces moments d'échanges et tes conseils. Un grand merci également à Célestin, Christelle, Julie, Jérémy et leurs enfants pour leur gentillesse.

Sommaire

Liste des figures…… i

Liste des tableaux…… ii

Liste des abréviations ……..……..iii

Chapitre I : Introduction générale…….. 1

Chapitre II : Synthèse bibliographique…….…… 6

I. Généralités sur les Fabacées……...…… 7

1. Fixation symbiotique et flux d'azote d'une culture de Fabacée…….…….. 8

1.1. Mise en place de la symbiose…….…… 8

1.2. Bilan énergétique de la fixation symbiotique……... 9

1.3. Nutrition azotée des Fabacées, de la source pédosphérique à la source atmosphérique……... 9

1.4. Intégration des Fabacées dans les systèmes de culture…….…….. 10

II. Le sol : une base d'interactions biologiques…….…….. 11

1. L'écologie du sol…….…… 12

2. Les microorganismes : moteurs des fonctions du sol…….. 13

2.1. Les microorganismes et les Cycles C N P…… 13

2.1.1. Cycle du Carbone (C)….…… 13

2.1.2. Cycle de l'azote (N)…….…… 14

2.1.3. Cycle du phosphore (P)…….. 16

3. Les Activités enzymatiques du sol…… 16

3.1. Régulation des activités enzymatiques dans le sol…….. 17

3.2. Stœchiométrie des éléments et activités enzymatiques dans le sol…….…….. 18

3.3. Les principales enzymes mesurées dans les sols…….…… 19

3.3.1. β-Glucosidase (Cycle C)…….. 19

3.3.2. Arylamidase (Cycle N)……... 20

3.3.3. Chitinases (Cycle C, N)…….. 20

3.3.4. Phosphatases (Cycle P)…….. 21

4. Les interactions sol – plante…….. 21

III. Processus de rhizodéposition : moyen d'échange entre la plante et le sol……. 22

1. Composantes de la rhizodéposition……... 22

2. Rhizodéposition du Carbone…… 23

3. Rhizodéposition de l'Azote…… 24

4. Facteurs de variation de la rhizodéposition…… 24

5. Méthodologies d'étude de la rhizodéposition…….. 25

5.1. Analyses quantitatives de la rhizodéposition du C…….. 26

5.2. Analyses quantitatives de la rhizodéposition de l'N…… 26

5.3. Quantification de la rhizodéposition chez les Fabacées…… 28

5.4. Méthodes de calcul…….…….. 29

5.5. Analyses qualitatives…… 30

6. Rhizodéposition et médiation des processus rhizosphérique…… 31

6.1. Interactions biologiques dans le sol et dynamiques des nutriments……..…….. *32*

6.2. Activités et structure des communautés microbiennes……..…….. *33*

6.3. Etude de la diversité des communautés microbiennes……..…….. *35*

Chapitre III : Hypothèses et démarche scientifique……..….. 37

I. Enjeux globaux……..…… 38

II. Objectifs de la thèse et hypothèses de travail……...….. 39

III. Démarche expérimentale……..…….. 40

1. Choix des espèces végétales…… 40

2. Quantification de la rhizodéposition du C et de l'N par double marquage $^{13}C/^{15}N$ et évaluation des facteurs de déterminismes de cette rhizodéposition…… 40

3. Etude de l'exsudation du C et des acides organiques en relation avec l'architecture racinaire et la disponibilité du P dans le sol……. 42

4. Rhizodéposition du C, activités enzymatiques et dynamique des éléments nutritifs dans le sol……. 42

5. Evaluation de la diversité du microbiome rhizosphérique et racinaire…… 43

Chapitre IV : Résultats……... 45

IV A : Approches méthodologiques pour l'estimation de l'azote du sol provenant de la rhizodéposition chez différente espèce de Fabacées…….. 46

IV B : Evaluation of C and N rhizodeposition by four legume crops and relationships with plant functional traits……... 58

IV C : Relations entre la morphologie racinaire, l'exsudation du C et les pools d'acides organiques et de composés phosphorés du le sol…… 83

IV D : Soil enzyme activity and stoichiometry : linking soil microorganisms resource requirement and legumes' carbon rhizodeposition…… 99

IV E : Linking plant exudation to rhizospheric microbiome : Characterization of bacterial and fungal communities directly influenced by root exudates of three plant species…….. 116

Chapitre V : Discussion générale…… 147

1. Estimation de la rhizodéposition du C et N : étude des flux d'origine atmosphérique et analyse des facteurs de déterminisme……. 150

1.1. Détermination d'une méthode d'estimation adaptée…….. *150*

1.2. Évaluation conjointe du C et N alloués à la rhizodéposition…… *151*

1.3. Performance des plantes : détermination de la rhizodéposition spécifique……... *155*

1.4. Déterminisme de la rhizodéposition du C et N…….. *156*

2. Impact de la rhizodéposition sur les activités enzymatiques et la diversité des communautés microbiennes du sol…….. 160

2.1. Effet de la rhizodéposition du carbone sur les activités enzymatiques du sol…….. *160*

2.2. Effet de la rhizodéposition du carbone sur la structure des communautés microbiennes……. *162*

Chapitre VI : Conclusion et perspectives…… 167

Références bibliographiques…….. 171

Liste des figures

Figure 1 : Estimation des quantités d'azote issues de la fixation symbiotique dans l'agriculture française (d'après Vertès *et al.*, 2015).
Figure 2 : Production de soja et des protéagineux. (**A**) Répartition de la production de soja dans le monde (FAOSTAT) ; (**B**) Production européenne de protéagineux et de soja en 2020 (Terre Univia).
Figure 3 : Les bactéries fixatrices d'azote rencontrées dans les écosystèmes naturels et les agroécosystèmes (d'après Vijayakumar, 2018).
Figure 4 : La symbiose rhizobienne chez les Fabacées (d'après Downie, 2007). **(A)** Mise en place de la symbiose entre une légumineuse et son rhizobium spécifique. Par perception de signaux de la plante, les bactéries produisent des facteurs Nod qui déclenchent le mécanisme d'infection et la formation de nodules fixateurs d'azote. **(B)** Une nodulation indépendante des facteurs Nod peut également se produire par colonisation bactérienne par des fissures dans l'épiderme racinaire.
Figure 5 : Modélisation des coûts et bénéfices de la nodulation (d'après Sachs *et al.*,2018). (**A**) Bénéfices métaboliques N et C en fonction du nombre de nodules. (**B**) Les avantages nets de la nodulation.
Figure 6 : Transport et métabolisme dans une cellule nodulaire (d'après Udvardi et Poole, 2013).
Figure 7 : Services écosystémique des Fabacées (d'après Altobeli *et al.*, 2016).
Figure 8 : Relations entre les fonctions et les services écosystémiques du sol (Calvaruso *et al.*, 2021).
Figure 9 : Les interactions entre les organismes du sol et organisation du réseau trophique du sol (Nielsen *et al.*,2015).
Figure 10 : Schéma du cycle du carbone dans les systèmes sol-plante-animaux © IRSN (Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire).
Figure 11 : Les gènes de fonctions impliqués dans les différentes étapes du cycle de l'azote (Griffith, 2016).
Figure 12 : Cycle de l'azote dans le sol et les différents niveaux d'intervention des plantes sur la disponibilité du N (Moreau *et al.*, 2019).
Figure 13 : Représentation simplifiée du cycle du phosphore dans les sols agricoles (Prasuhn et Flisch, 2005).
Figure 14 : Localisation et état des enzymes dans les sols (d'après Burns *et al.*, 2013)
Figure 15 : Effets hypothétiques des ratios élémentaires (C, N, P) de la litière végétale et du sol sur les processus microbiens (d'après Zechmeister-Boltenstern *et al.*, 2015).
Figure 16 : Interactions sol /plante /microorganismes : les processus rhizosphériques affectés par la rhizodéposition (implication de composés carbonés) (d'après Oburger et Jones, 2018)
Figure 17 : Facteurs biotiques et abiotiques influençant la rhizodéposition (d'après Jones *et al.*, 2004).
Figure 18 : Méthodes de marquage isotopique (^{13}C et ^{15}N) des plantes dans le compartiment aérien.
Figure 19 : Méthodes de marquage isotopique (^{15}N) des plantes dans le compartiment souterrain.
Figure 20 : Rhizodéposition de l'azote chez les Fabacées et son transfert vers des cultures associées (Wang *et al.*, 2020).
Figure 21 : les différentes méthodes de calcul de la rhizodéposition (d'après Hupe, 2016).

Figure 22 : Les différentes approches de collecte des exsudats racinaires (Oburger *et al.*,2018).
Figure 23 : Interactions rhizosphériques médiées par les exsudats racinaires (d'après Bais *et al.*,2006).
Figure 24 : Colonisation des différents micro habitats rhizosphériques par les microorganismes (d'après Reinhold-Hurek *et al.*,2015).
Figure 25 : Combinaison des approches SIP et « omiques » pour analyser la structure, la diversité et la fonction des communautés microbiennes actives de la rhizosphère (d'après Haichar *et al.*,2016).
Figure 26 : Schéma conceptuel qui synthétise les objectifs de la thèse.
Figure 27 : Illustrations des dispositifs expérimentaux de culture en serre et dans la chambre phytotronique. *Photos prises lors des expérimentations*
Figure 28 : Illustration des expérimentations de cultures menées en serre en rhizotron, *Photos prises lors des expérimentations*
Figure 29 : Illustration des dispositifs expérimentaux de culture des plantes et de marquage isotopique au $^{13}CO_2$ en phytotron. *Photos prises lors des expérimentations*
Figure 30 : Mise en relation entre la rhizodéposition du C et N pour les 4 espèces de Fabacées étudiées. Les différentes espèces sont positionnées par rapport à leurs quantités de C et N rhizodéposées pendant le développement reproducteur.
Figure 31 : Répartition (%) du carbone issu de la fixation photosynthétique dans le système plante-sol des espèces de Fabacées étudiées en fin de culture (stade reproducteur).
Figure 32 : Répartition (%) de l'azote issu de la fixation atmosphérique dans le système plante-sol des espèces de Fabacées étudiées en fin de culture (stade reproducteur).
Figure 33 : Ratios C : N des rhizodépots des différentes Fabacées étudiées en fin de culture (stade reproducteur).
Figure 34 : Principales relations entre traits fonctionnels et la rhizodéposition du C et l'N.
Figure 35 : Analyse en composantes principales entre la rhizodéposition spécifique du C (A) et de l'N (B) (par unité de C ou N fixé ; CdfR spécifique ou NdfR spécifique) et les traits fonctionnels des légumineuses étudiées en fin de culture (stade reproducteur).
Figure 36 : Représentation schématique de l'exsudation spécifique du C récent (en 24h de marquage $^{13}CO_2$) et des traits racinaires impliqués chez les différentes Fabacées étudiées en stade végétatif.
Figure 37 : Représentation schématique du lien entre la rhizodéposition du carbone et les activités enzymatiques du sol.
Figure 38 : (A) Exemple d'indice de Moorhead et al. (2013) sur limitation en ressources des microorganismes d'après Cui et al. (2021) ; (B) Analyse de la relation entre les traits des plantes et les besoins en ressources des microorganismes.
Figure 39 : Analyse en composantes principales de l'effet du couvert végétal sur la diversité bactérienne (A) et fongique (B) dans les fractions d'ADN ^{12}C et ^{13}C ainsi dans les racines.

Liste des tableaux

Tableau 1 : les principales enzymes mesurées dans les sols. D'après Rao et al. (2017).
Tableau 2 : Caractéristiques des espèces végétales étudiées
Tableau 3 : Composition en sels de la solution nutritive Hoagland sans N

Liste des abréviations

ACP : Acid Phosphatase
AIC : Akaike Information Criterion
AKP : Alkalin Phosphatase
ANOVA : ANalysis Of VAriance
ARYLN : Arylamidase
ATP : Adenosine Triphosphate
BG : β-Glucosidase
C : Carbone
CdfR: Carbon derived from Rhizodeposition
CIMS : Cultures Intermédiaires Multi-Services
CO_2 : Dioxyde de Carbone
CsCl : Cesium chloride
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
Gmea : Geometric Mean
IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometry
ITS : Internal Transcribed Spacer
KMO: Kaiser–Meyer–Olkin measure
LCO : Lipo-Chito-Oligosaccharides
LDMC: Leaf Dry Matter Content
LegHb : Leghémoglobine
MO : Matière Organique
N : Azote
N_2 : Diazote
NAG : N-acétyl-β-Glucosaminidase
Ndfa: Nitrogen derived from the atmosphere
NdfR: Nitrogen derived from Rhizodeposition
Ndfs: Nitrogen derived from soil
OTU : Operational Taxonomic Unit
P : Phosphore
PAC : Politique Agricole Commune
PCA : Principal Component Analysis
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGPR: Plant-Growth Promoting Rhizobacteria
RAS : Root Adhering Soil
RCC : Root Carbon Content
RDMC: Root Dry Matter Content
RGR : Relative Growth Rate
RLD : Root Lenght Density
RMD : Root Mass Density
RMR : Root Mass Ratio
RNA : RiboNucleic Acid
RNC : Root Nitrogen Content
RS : Reproductive Stage
SIP : Stable Isotope Probing
SLA : Specific Leaf Area
SMR : Shoot Mass Ratio
SOM : Soil Organic Matter
VS : Vegetative Stage
WHC : Water Holding Capacity

Chapitre I :

Introduction générale

L'agriculture mondiale a connu une forte intensification pendant plusieurs décennies afin de répondre aux besoins d'une population en pleine croissance. L'augmentation de la production agricole s'est faite d'une part avec une expansion des surfaces agricoles et d'autres part avec une industrialisation et une mécanisation des pratiques agricoles, ainsi qu'une forte utilisation de produits chimiques (Matson *et al.*, 1997; Horrigan Leo *et al.*, 2002; Rudel *et al.*, 2009). En effet, la rentabilité de la production agricole à partir de la révolution verte a été marquée par une forte utilisation de fertilisants azotés et un usage non rentable de ces fertilisants par les cultures (Trenkel, 1997). Cette intensification de l'activité agricole et l'utilisation d'engrais chimiques ont conduit à des modifications environnementales importantes, à la pollution et des perturbations biologiques (Matson *et al.*, 1997; Howden *et al.*, 2007; Burney *et al.*, 2010; Emmerson *et al.*, 2016). Cinq menaces majeures liées à la perte de l'azote dans l'environnent pour la société ont été identifiées: (i) altération de la qualité de l'air impactant la santé humaine (ii) modification de la qualité de l'eau avec notamment l'eutrophisation (iii) l'augmentation de l'effet de serre (iv) perturbation des écosystèmes et de la biodiversité (v) modification de la qualité des sols par surfertilisation et acidification (Sutton *et al.*, 2011).

Face aux effets négatifs de l'agriculture dite intensive, apparait la nécessité d'adapter l'agriculture aux changements environnementaux. Les nouvelles pratiques vont vers une agriculture dite durable. Selon Harwood (1990), l'agriculture durable est « une agriculture qui évolue indéfiniment vers une utilité humaine plus grande, une utilisation plus efficace des ressources, tout en respectant un équilibre avec l'environnent, qui soit favorable aux hommes comme aux autres espèces ». Cette agriculture doit faire face aux défis de la sécurité alimentaire et nutritionnelle d'une population grandissante, de la réduction des changements environnementaux et de l'amélioration de la qualité des sols (Lal, 2015; Velten *et al.*, 2015; DeLonge *et al.*, 2016). Il s'agit également de produire en utilisant au mieux les fonctions écologiques et valoriser les ressources naturelles notamment avec l'introduction du concept d'agroécologie ou encore de l'intensification écologique de l'agriculture (Wezel et Jauneau, 2011; Wezel *et al.*, 2016; Calabi-Floody *et al.*, 2018).

Parmi les solutions qui existent, l'intégration des Fabacées dans les rotations de culture contribue à la durabilité des systèmes agricoles. Les Fabacées (légumineuses) présentent plusieurs atouts qui permettent de fournir des matières premières riches en protéines et en énergie (essentiellement pour l'alimentation humaine et animale), l'utilisation spécifique de l'azote atmosphérique (N_2) pour leur nutrition permet de réduire l'utilisation d'engrais chimique (Fustec *et al.*, 2010; Chalk *et al.*, 2014). En effet les Fabacées sont capables

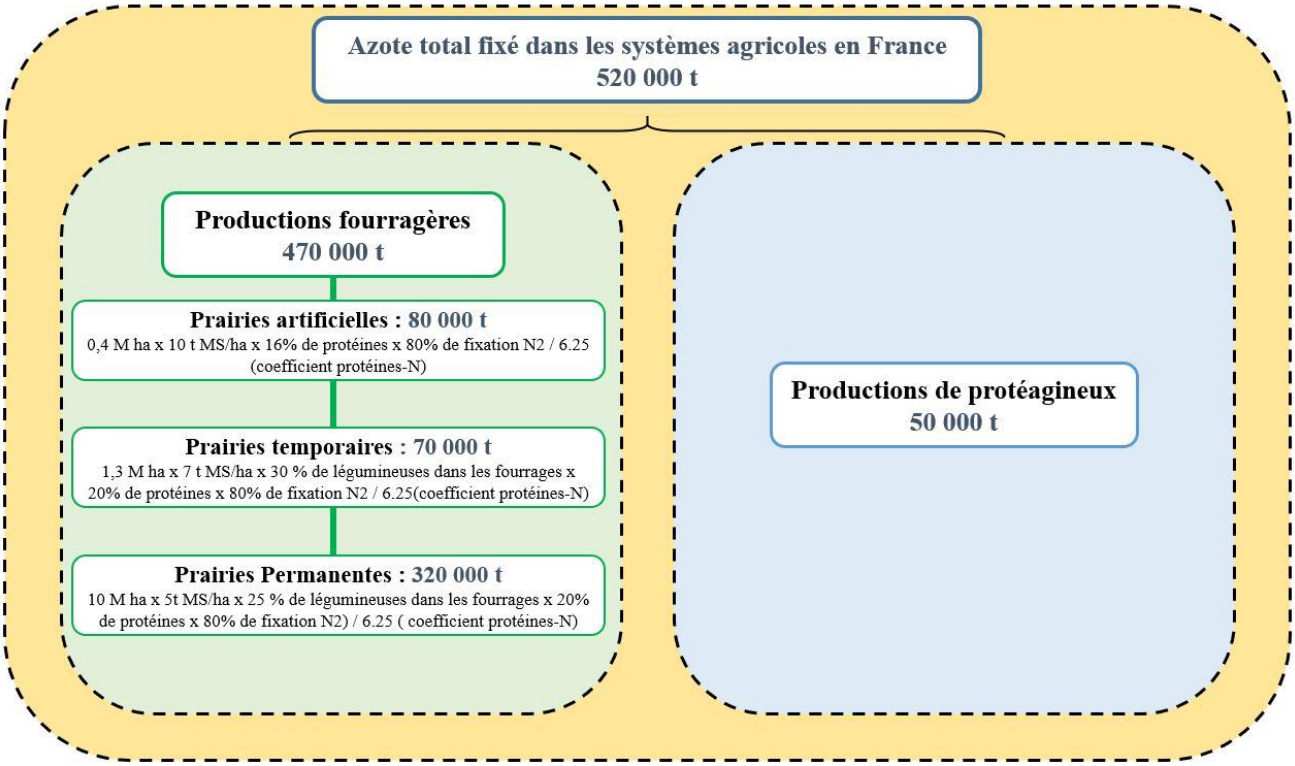


Figure 1 : Estimation des quantités d'azote issues de la fixation symbiotique dans l'agriculture française (d'après Vertès *et al.*, 2015).

d'absorber l'azote sous forme de nitrate, d'ammonium ou d'acides aminés (Masclaux et al., 2010) par voie racinaire comme tous les végétaux et peuvent également fixer le N_2 atmosphérique. Ce N_2 est transformé en azote minéral (NH_3) grâce à une symbiose avec une bactérie de la famille des rhizobiacées (Mylona *et al.*, 1995; Oldroyd *et al.*, 2011). Ces plantes n'ont donc pas besoin de fertilisation N et constituent une porte d'entrée du N_2 atmosphérique vers le sol (Schneider et Huyghe, 2015). L'apport d'N dans le sol issu de la fixation symbiotique du N_2 au niveau mondial a été estimée à 46 millions de tonnes (Mt) par an et 86 Mt proviendraient de l'apport d'engrais chimiques (Peoples *et al.*, 2009; Duc *et al.*, 2010*b*). En France la part de l'azote issu de la fixation symbiotique a été estimée à 520 000 tonnes (t) par an (**Figure 1**) reparties en 470 000 t en production fourragère et 50 000 t en production de protéagineux, comparativement 2,1 Mt d'azote sont issus de la fertilisation chimique (Vertès *et al.*, 2015).

La capacité des Fabacées à utiliser le N_2 atmosphérique a fait l'objet de nombreuses études (Miflin et Cullimore, 1984; Oldroyd *et al.*, 2011; Raza *et al.*, 2020). Cependant, le mécanisme par lequel ces plantes enrichissent le sol en N est moins connu. Cet enrichissement est dû à la dégradation de la litière aérienne ou à la rhizodéposition qui est définie comme l'émission de tous types de composés par les racines d'une plante pendant sa croissance incluant la senescence ou la décomposition racinaire, la sécrétion et l'exsudation de divers composés, la production de mucilage et de cellules de la coiffe et de cellules de bordure (Uren, 2001; Wichern *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009). Au-delà des composés N, la rhizodéposition permet aux Fabacées d'agir sur la disponibilité du P, de structurer et stimuler les communautés microbiennes du sol (Bais *et al.*, 2006; Lupwayi et Kennedy, 2007; Meena et Lal, 2018).

Comme de nombreuses plantes, les Fabacées contribuent positivement aux processus édaphiques, notamment via l'augmentation du stock de carbone organique du sol, la modification des propriétés physiques et chimiques du sol (McDaniel *et al.*, 2014; Stagnari *et al.*, 2017; Veloso *et al.*, 2019). De par leur capacité à enrichir le sol en N, elles contribuent également à la réduction de l'émission des gaz à effet de serre (N_2O), du lessivage du nitrate (NO_3^-) et à l'augmentation du rendement des productions agricoles (Adeboye *et al.*, 2005; Sultani *et al.*, 2007; Schneider and Huyghe, 2015). Les agroécosystèmes peuvent donc être sous l'influence directe et indirecte des Fabacées par le renforcement des services écosystémiques, l'amélioration des cultures voisines ou suivantes et leur implication dans les cycles des nutriments C, N, P (Lipton *et al.*, 1987; Bais *et al.*, 2006; Meena *et al.*, 2018*a*). Par rapport à une exploitation en monoculture, la diversification des cultures intégrant les Fabacées constitue une ouverture agroenvironnementale durable, mieux comprendre les mécanismes qui entrent

en jeu est essentiel afin de valoriser au mieux les atouts et bénéfices écosystémiques des Fabacées (Meena et Lal, 2018). Depuis plusieurs années, sur la plan international et national, différents projets ont été mis en place. Il s'agit notamment d'aller vers une plus grande utilisation des Fabacées dans les systèmes de culture en raison de leurs bénéfices environnementaux, d'en tirer une bonne valorisation économique et lutter contre l'insécurité alimentaire (FAO : Food and Agriculture Organisation of the United Nations). Une journée mondiale des légumineuses (Fabacées) a également été instaurée par les nations unis le 10 février de chaque année afin de mettre avant leurs cultures. Au niveau européen, un pacte vert (Green deal) a été mis en place en 2019 visant une croissance verte pour 2030 et 2050. Ce pacte inclus une réforme de la politique agricole commune (PAC) entre 2021 et 2027 pour un système alimentaire juste, sain et respectueux de l'environnement. D'autres programmes européens ont également vu le jour dans le but d'aller vers une autonomie en protéine végétale en valorisant les Fabacées à graines non OGM (organisme génétiquement modifié) pour notamment réduire les importations. Cela grâce à un plan protéine végétale incluant également les cultures fourragères. En France cette ambition d'autonomie en protéine végétale est un au cœur du volet agricole du plan France Relance avec notamment en 2021, 26 nouveaux projets de structuration de filières de différentes de Fabacées (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2020). En région Normandie, un plan d'action a été mis en place pour les protéines végétales à destination de l'alimentation humaine ou à valeur ajoutée afin d'encourager les cultures de Fabacées avec notamment un projet de développement d'une filière de soja (Pertriaux, 2019).

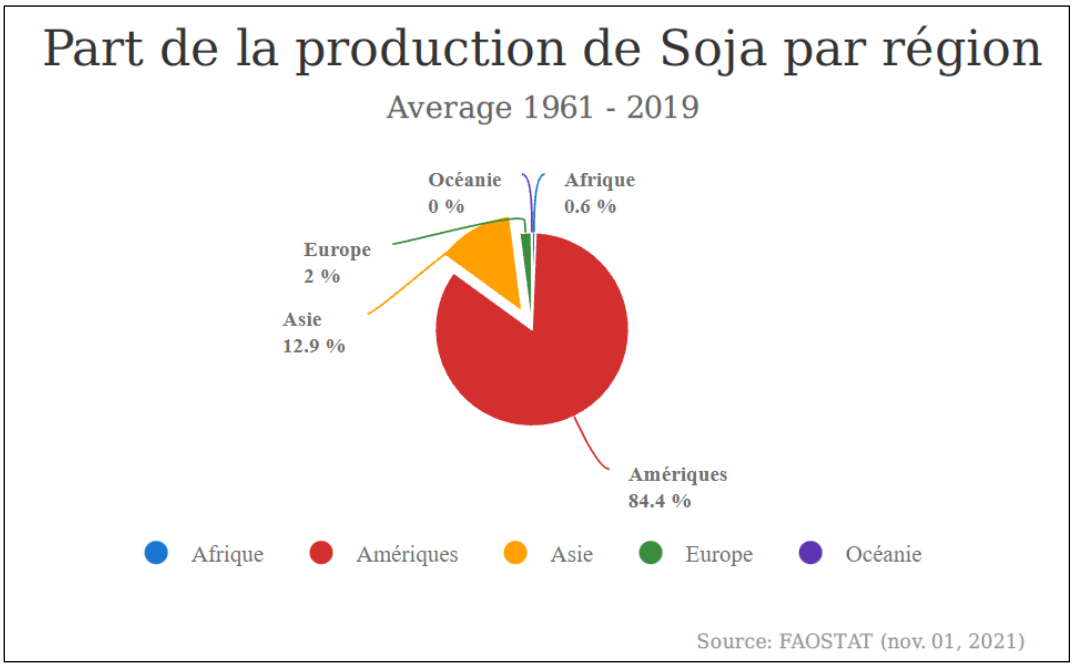
Aujourd'hui, une meilleure connaissance des caractéristiques qui déterminent les performances des Fabacées permettrait de maximiser les bénéfices des Fabacées encore trop peu valorisés dans les systèmes de culture. Les Fabacées fourragères ou protéagineuses à graines constituent une source de protéines végétales avec une bonne valeur nutritionnelle pour l'alimentation humaine et animale (Curran, 2012 ; Jezierny *et al.*, 2010). Ainsi, cette thèse se propose d'étudier le déterminisme de la fourniture de carbone et d'azote dans les sols par les Fabacées à travers la rhizodéposition. Ces éléments favorisent la biodiversité et la fertilité des sols cultivés. Différentes espèces de Fabacées seront étudiées en fonction de leurs traits et leur impact sur les communautés microbiennes *via* la rhizodéposition et la dynamique des nutriments (C, N, P) dans les sols. Dans cette étude, quatre Fabacées cultivées en région Normandie ont été choisies, il s'agit de deux Fabacées à graines ou protéagineuses d'intérêt alimentaire (humaine et animal), le pois et la féverole (Duquesne et Dalstein, 2016). Il s'agit également de deux Fabacées exploitées différemment en agriculture, le trèfle blanc et le trèfle incarnat. Le trèfle blanc est utilisé en culture fourragère et le trèfle incarnat pendant un temps

culture fourragère est désormais essentiellement utilisé comme engrais vert et couvert végétal (Thomas et Archambeaud, 2005; Jeuffroy *et al.*, 2015). Ces deux plantes sont connues pour leurs capacités de rhizodéposition (Lesuffleur *et al.*, 2013; Génard, 2016).

Chapitre II :

Synthèse bibliographique

A



B

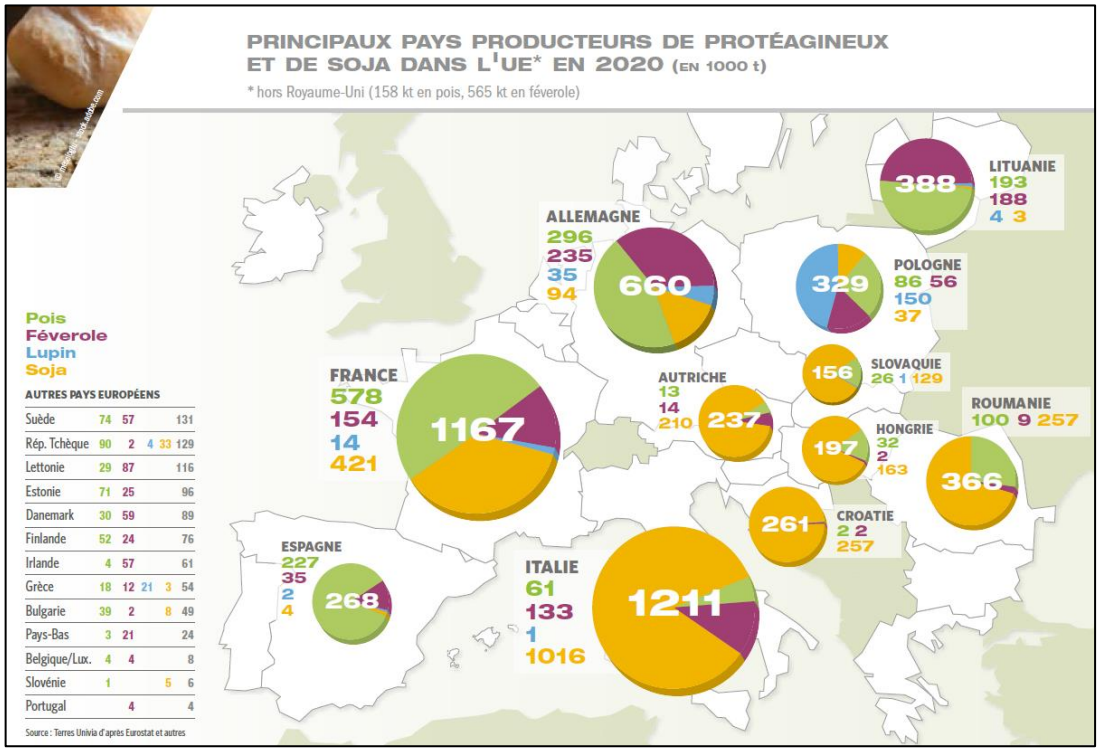


Figure 2 : Production de soja et des protéagineux. (**A**) Répartition de la production de soja dans le monde (FAOSTAT) ; (**B**) Production européenne de protéagineux et de soja en 2020 (Terre Univia).

I. Généralités sur les Fabacées

Les Fabacées constituent une très grande famille de plantes avec près de 20000 espèces référencées dans le monde. Elles constituent ainsi la troisième plus grande famille de plante après les Astéracées et les Orchidées (Talukdar, 2013). Plantes à fleurs, elles peuvent être herbacées ou arborées, sont présentes dans plusieurs régions du monde (Vertes *et al.*, 2010; Altobelli *et al.*, 2016). Deux grands types de Fabacées sont cultivées en agriculture : les Fabacées protéagineuses à graines et les Fabacées fourragères (Cholez et Magrini, 2014; Uijttewaal *et al.*, 2016). Les cultures de Fabacées sont sources de matières premières riches en énergie principalement utilisées pour l'alimentation humaine et animale avec des applications industrielles (Voisin *et al.*, 2013; Schneider et Huyghe, 2015). Ces plantes sont essentiellement caractérisées par leur aptitude à former au niveau de leurs racines une association symbiotique avec des bactéries (*Rhizobium sp.*) capable de transformer le N_2 atmosphérique en N utilisable par la plante (Mylona *et al.*, 1995; Hartwig, 1998; Masson-Boivin *et al.*, 2009). Dans les systèmes agricoles en France, les principaux modes d'exploitation des Fabacées sont : **(**i) en monoculture en vue d'une valorisation en alimentation humaine et animale ; (ii) cultivées seules ou en association avec d'autres plantes en vue de leur services écosystémiques (couverture du sol, engrais vert, services de régulation des bio agresseurs...) ; (Jeuffroy *et al.*, 2015).

Au niveau mondial les principales Fabacées à graines produites sont le soja, le pois, la féverole et le lupin. Le soja est la Fabacées la plus produite dans le monde avec une forte production sur le continent américain (**Figure 2A**). En 2020, le Brésil [133 millions de tonnes (Mt)] les Etats-unis (113 Mt) et l'Argentine (53 Mt) ont été les premiers producteurs. Dans l'union européenne, la production de soja est beaucoup plus faible mais a connu une forte augmentation depuis 2008 (Labalette et Guiavarc'h, 2016) et l'Italie reste le principal producteur avec 1,016 Mt en 2020 devant la France 0,421 Mt et la Roumanie en égalité avec la Croatie 0,257 Mt (**Figure 2B**). En France le pois est la Fabacées à graine la plus produite avec 0,578 Mt en 2020 devant le soja et la féverole (0,154 Mt). Au niveau des débouchés en France, sur près de 1.2 Mt de Fabacées à graines (pois, féverole, lupin, soja) 75% sont destinées à l'alimentation animale et 25% à l'alimentation humaine (France AGRIMER, Terres Univia). D'autres cultures de Fabacées à graines secs (haricots, pois chiches, lentilles) sont destinées à l'alimentation humaines.

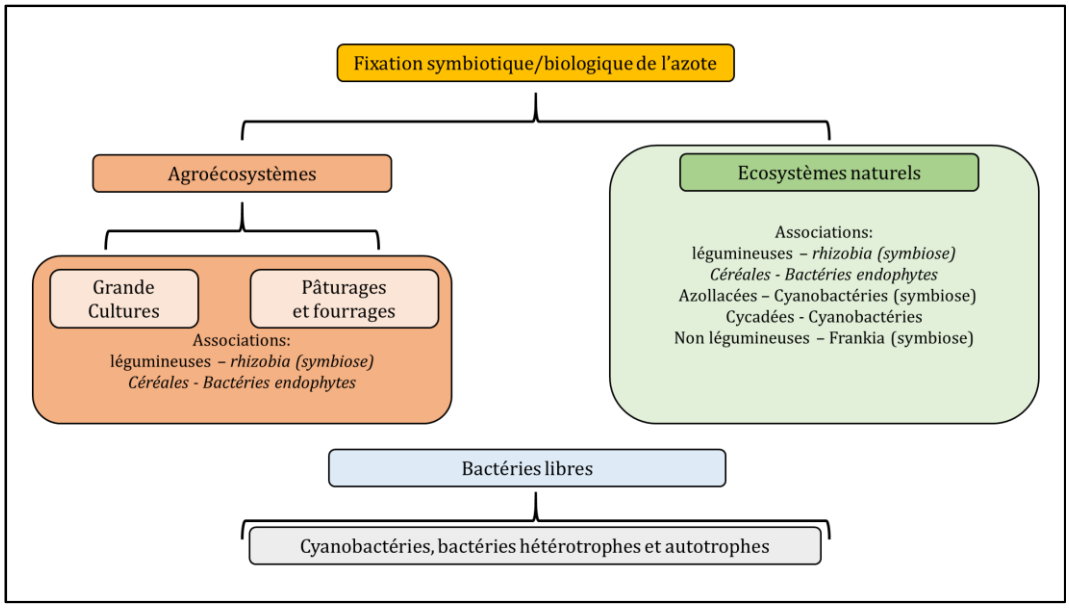


Figure 3 : Les bactéries fixatrices d'azote rencontrées dans les écosystèmes naturels et les agroécosystèmes (d'après Vijayakumar, 2018).

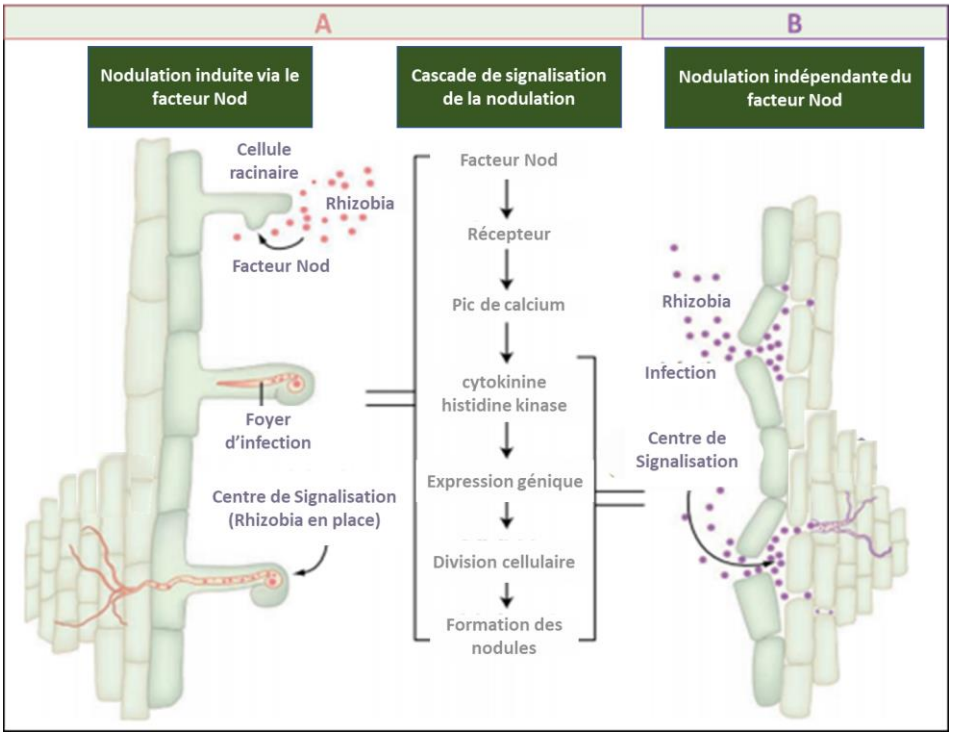


Figure 4 : La symbiose rhizobienne chez les Fabacées (d'après Downie, 2007). **(A)** Mise en place de la symbiose entre une légumineuse et son rhizobium spécifique. Par perception de signaux de la plante, les bactéries produisent des facteurs Nod qui déclenchent le mécanisme d'infection et la formation de nodules fixateurs d'azote. **(B)** Une nodulation indépendante des facteurs Nod peut également se produire par colonisation bactérienne par des fissures dans l'épiderme racinaire.

1. Fixation symbiotique et flux d'azote d'une culture de Fabacée

La fixation biologique du N_2 est un processus métabolique qui peut être réalisé par des microorganismes libres dans le sol ou dans l'eau (**Figure 3**) (*Azotobacter, Beijerinckia, Clostridium, Bacillus, Klebsiella, Chromatium, Rhodospirillum…*). Cette fonction est également présente chez des bactéries capables de former des associations symbiotiques avec des plantes (Garg et Geetanjali, 2009; Shamseldin *et al.*, 2017). Les bactéries du genre *Frankia* peuvent par exemple former cette symbiose avec les plantes actinorhiziennes (Pujic et Normand, 2009). L'association la mieux caractérisée est celle formée entre les rhizobiacées (*Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium*) et les Fabacées.

1.1. Mise en place de la symbiose

La majeure partie des Fabacées cultivées trouve dans le sol l'inoculum de *Rhizobia* qui leur est spécifique, malgré quelques exceptions la spécificité de la symbiose est large (Wang *et al.*, 2012; Voisin et Gastal, 2015). La mise en place de la symbiose nécessite un mécanisme de reconnaissances en plusieurs étapes entre la bactérie et sa plante hôte, sous forme d'échange de signaux (Dénarié et Cullimore, 1993; D'haeze et Holsters, 2002). Cet échange est initié par l'exsudation de différents types de composés par les racines. Les flavonoïdes en particulier jouent un rôle clé dans l'initiation du dialogue moléculaire et agissent par chimiotactisme sur les *Rhizobia* (Cooper, 2004; Ferguson *et al.*, 2010). Ces composés sont perçus par les *Rhizobia* qui en réponse synthétisent des lipo-chito-oligosaccharides (LCO) appelés facteur Nod. Ces composés sont perçus par les Fabacées pour induire l'infection (**Figure 4A**) et la mise place d'un nouvel organe appelé nodule. Cet organe sera le point de fixation et de conversion du N_2 mais aussi joue le rôle de zone d'échange entre la plante et la bactérie. En plus des facteurs Nod connus pour être indispensables à la mise en place de la symbiose légumineuse-rhizobium, il y a une deuxième voie d'infection par les *Rhizobia* indépendantes des facteurs Nod (**Figure 4B**). En effet l'infection d'une Fabacée par un *Rhizobium* peut se faire par pénétration directe dans les cellules *via* une blessure, certaines souches de *Bradyrhizobium* sont capables d'utiliser cette voie alternative pour initier une symbiose avec certaines espèces d'*Aeschynomene* (Bonaldi *et al.*, 2011; Gully *et al.*, 2018). Pendant l'infection par la fissure, la bactérie synthétise dans la zone d'infection des composés de type cytokinine permettant de contourner une partie de la voie de signalisation par les facteurs Nod (Downie, 2007; Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Pendant la fixation symbiotique, la plante fournit des glucides photosynthétiques et des acides aminés (Lodwig *et al.*, 2003) à la bactérie qui en échange alimente la plante en N_2 réduit sous forme ammoniacale (NH_3) et d'asparagine ou d'uréides selon les espèces. La réduction du N_2 ($N_2 + 3H_2 + \text{Energie} \rightarrow 2NH_3$) se fait grâce à l'activité enzymatique de la nitrogénase

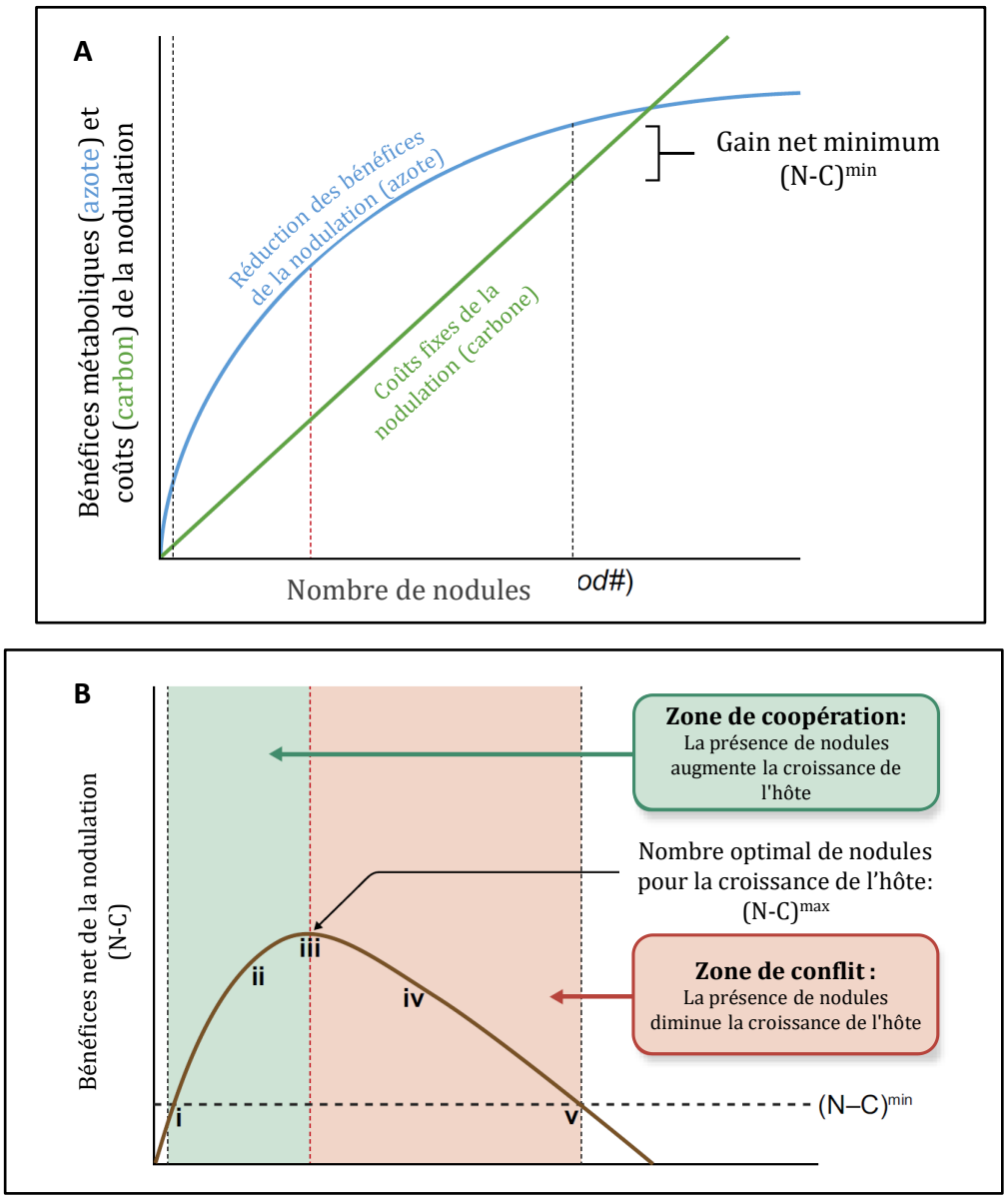


Figure 5 : Modélisation des coûts et bénéfices de la nodulation (d'après Sachs *et al.*,2018). (**A**) Bénéfices métaboliques N et C en fonction du nombre de nodules. (**B**) Les avantages nets de la nodulation.

*Le bénéfice net pour la nodulation est unimodale, augmentant avec la formation de nodules (**zone de coopération**) jusqu'à ce que le nombre optimal de nodules soit atteint (**N – Cmax**), et au-delà duquel des nodules supplémentaires réduisent le bénéfice de l'hôte (**zone de conflit**). Si trop peu ou trop de nodules sont formés, l'hôte n'acquiert pas de bénéfice (c'est-à-dire <**N – Cmin**).*

(Kim et Rees, 1994). La leghémoglobine (LegHb) produite par les Fabacées (une métalloprotéine proche de l'hémoglobine) permet de fixer l'O_2 afin de former un milieu anaérobique favorable la fixation du N_2 (Wilson et Reisenauer, 1963; Ott *et al.*, 2005; Raza *et al.*, 2020). Comme tout autre organe, les nodules ont une durée de vie limitée et finissent par entrer dans un processus de sénescence caractérisé par un déclin de la fixation du N_2 et la mort coordonnée des bactéries et des cellules végétales. Cette senescence peut se faire par un passage des nodules de l'état puit de carbone à source de nutriment *via* un simple vieillissement ou déclenché prématurément par des conditions environnementales défavorables (Kazmierczak *et al.*, 2020).

1.2. Bilan énergétique de la fixation symbiotique

La structure moléculaire du N_2 est chimiquement difficile à réduire et consomme de l'énergie, lors de la fixation symbiotique l'énergie utilisé provient de l'ATP (Adenosine Triphosphate : issu de l'oxydation des substrats carbonés de la photosynthèse). La réduction d'une mole de d'N_2 donne 2 moles d'ammonium avec consommation d'énergie de 16 moles d'ATP (plus une production d'électrons et de protons). La Fabacée peut se retrouver dans des situations où la fixation symbiotique est couteuse plus particulièrement lorsque le nombre de nodules est excessif ou lorsque les bactéries n'arrive pas fixer suffisamment de N_2 (Sachs *et al.*, 2010; Regus *et al.*, 2015). La fixation symbiotique représente ainsi un coût en C pour la plante. Pendant une période active de fixation, ce coût est estimé entre 5 et 10 g de C g^{-1} N [avec une moyenne de 6,5 g de C g^{-1} N (Minchin et Witty, 2005)].

Les composés carbonés issus de la photosynthèse sont utilisés par les nodules aux dépens des autres organes, principalement les racines. Chez les Fabacées, les racines utilisant le N_2 symbiotique sont moins développées que les racines sans nodules (Voisin *et al.*, 2002). La relation symbiotique peut ainsi être problématique pour la plante hôte, le cout carboné de la fixation du N_2 augmente proportionnellement avec le nombre de nodules (**Figure 5A**). Le bénéfice net de la fixation pour une légumineuse peut être estimé par la différence entre l'N fixé et le coût carboné associé, ce bénéfice reste positif jusqu'à un nombre optimal de nodule (**Figure 5B**) pour devenir négatif avec un nombre plus important de nodules. Lorsque trop peu de nodules sont formés ou la capacité de fixation n'est pas optimale, la plante hôte n'acquière pas de bénéfice (Sachs *et al.*, 2018).

1.3.Nutrition azotée des Fabacées, de la source pédosphérique à la source atmosphérique

En raison du coût en C, une culture de légumineuse prélève dans premier temps l'azote minéral disponible dans le sol *via* son système racinaire comme toutes les espèces. Le nitrate (NO_3^-) disponible dans le sol est prélevé par les racines, ce NO_3^- peut être réduit en

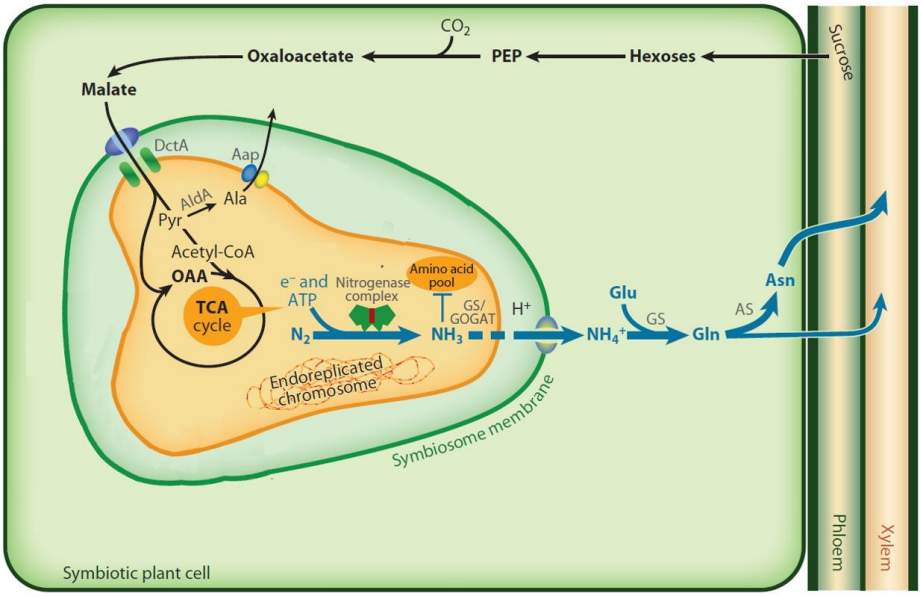


Figure 6 : Transport et métabolisme dans une cellule nodulaire (d'après Udvardi et Poole, 2013).

La plante alimente la fixation de l'azote par ses composés issus de la photosynthèse (flèches noires) et le produit de la fixation de l'azote est ensuite transformé en NH_3 puis en acides aminés et exporté vers la partie aérienne (flèches bleues).

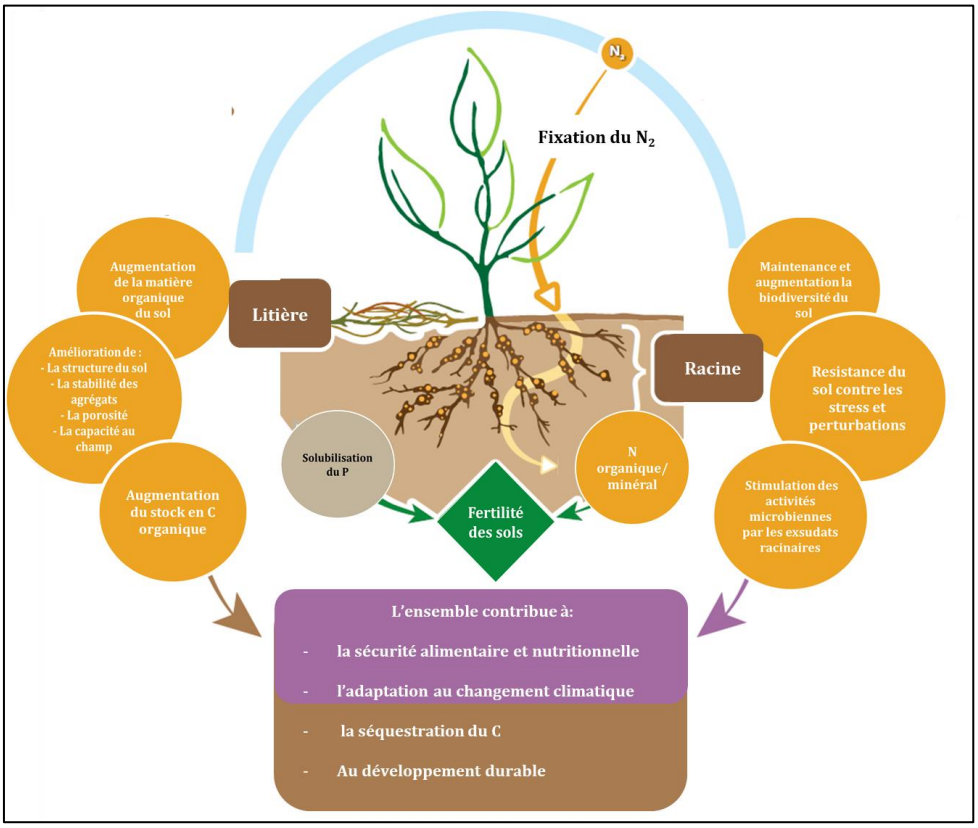


Figure 7 : Services écosystémique des Fabacées (d'après Altobeli *et al*., 2016).

ammonium (NH_4^+) puis transformé en acides aminées (AA). Ces AA sont ensuite exportés vers les parties aériennes (Schrader *et al.*, 1972; Xu *et al.*, 2012). L'épuisement progressif du N minéral du sol entraine une initiation de la mise en place des nodules et le basculement de la nutrition N vers la source atmosphérique N_2 (Voisin et Gastal, 2015). En cas de nouvelle disponibilité en N dans le sol, il y a une diminution de la nodulation et du taux de fixation du N_2 (Bergersen *et al.*, 1992). La plante aura encore la possibilité de rebasculer sur la fixation symbiotique selon le stade de développement. Chez les Fabacées à graines, la mise en place de la fixation symbiotique ne peut plus se faire à partir du début de remplissage des graines, même en cas d'épuisement de l'N du sol. Chez les Fabacées fourragères la mise en place de la nodulation est souvent plus lente car elles présentent une croissance plus lente en début de culture, la quantité d'N du sol peut être élevée par rapport aux besoins de la plante (Heichel et Henjum, 1991). Leur mode d'exploitation par défoliation provoque également un ralentissement important de la fixation symbiotique laissant place à la dépendance au N du sol et des organes de réserve (Kim *et al.*, 1993; Justes *et al.*, 2002).

La nutrition N dépend donc exclusivement de la fixation symbiotique en absence de fertilisation. Le N_2 fixé est transformé en NH_3 (**Figure 6**) *via* le complexe enzymatique nitrogénase et ce NH_3 intègre la voie d'assimilation normale de la plante (cycle GS/GOGAT) pour former des AA exportés vers les tissus aériens (Udvardi et Poole, 2013). Les prélèvements de l'N pédosphérique et atmosphérique se fait ainsi en alternance selon le stade physiologique, l'environnement et le mode d'exploitation. Ce fonctionnement permet la fourniture de tissus riches en énergie, la réduction de la fertilisation azotée et l'enrichissement du sol en N (Voisin et Gastal, 2015; Duarte *et al.*, 2020; Rezgui *et al.*, 2020).

1.4. Intégration des Fabacées dans les systèmes de culture

Lorsqu'elles font partie intégrante des systèmes agricoles, les Fabacées présentent des avantages pour la santé des sols. Leurs usages offrent une utilisation durable du sol (Altobelli *et al.*, 2016). Quel que soit le mode d'exploitation (rotation, culture intercalaire, pâturages), les Fabacées, présentent des avantages significatifs par rapport aux systèmes sans Fabacées en termes de services écosystémiques rendus [**Figure 7** (Franke *et al.*, 2018; Duarte *et al.*, 2020)]. Leur symbiose fixatrice de N_2 améliore la fertilité des sols au bénéfice d'une culture associée ou suivante (Parvin *et al.*, 2020). Elles contribuent ainsi à l'augmentation des rendements. Elles améliorent la disponibilité de nutriments comme le P (Zaidi *et al.*, 2017), protègent le sol contre l'érosion, augmentent la matière organique du sol et la biodiversité (Ganeshamurthy, 2009; Meena et Lal, 2018). Les émissions de N_2O et CO_2 sont également réduites sous une culture de

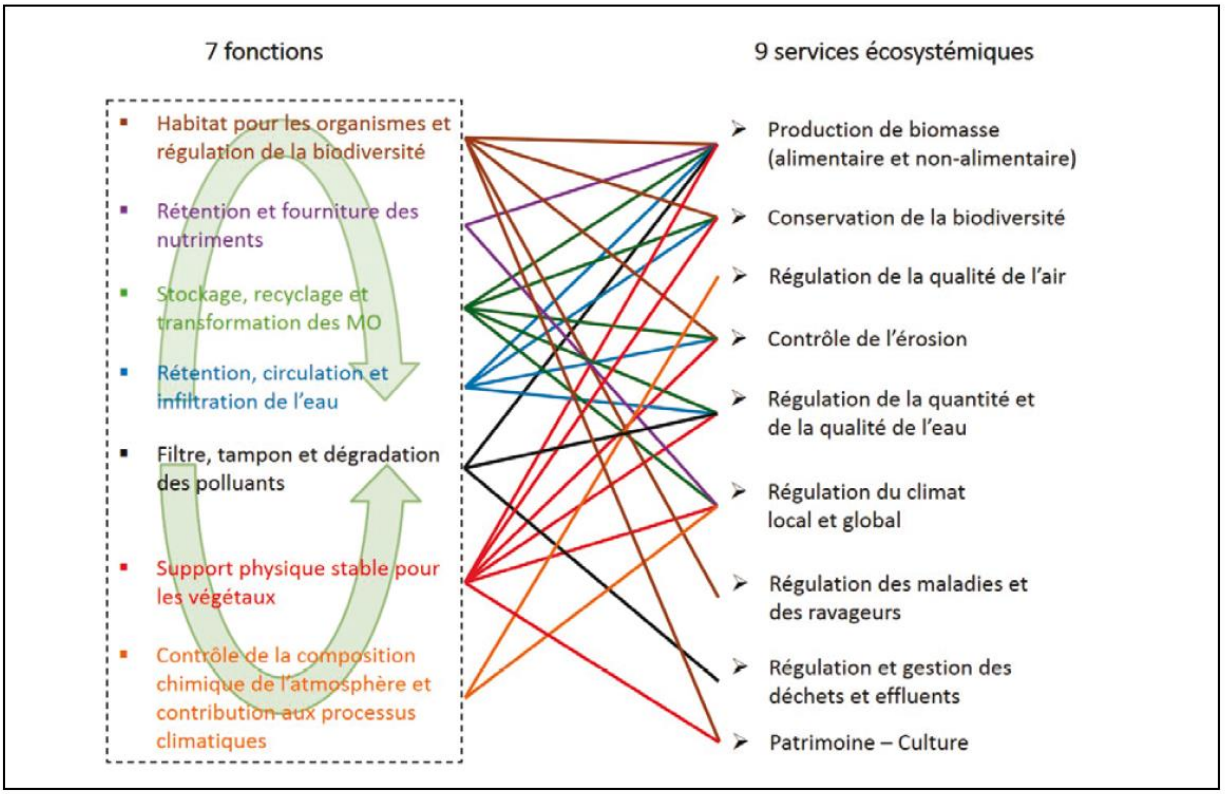


Figure 8 : Relations entre les fonctions et les services écosystémiques du sol (Calvaruso *et al.*, 2021).

Fabacées, en effet l'introduction des Fabacées dans une rotation permet de réduire l'usage de fertilisation N à l'origine d'émissions de gaz à effet de serre (Cellier *et al.,* 2015; Stagnari *et al.,* 2017).

En plus de la réduction des gaz à effet de serre, les Fabacées en interactions avec les microorganismes du sol interviennent dans la dépollution du sol, c'est le cas pour les métaux lourds (Pajuelo *et al.,* 2011). Certaines variétés de *Rhizobia* seraient particulièrement résistantes aux métaux lourds et leur association avec une légumineuse est exploitée pour la bioremédiation (Safronova *et al.,* 2011; Fagorzi *et al.,* 2018; Jebara *et al.,* 2019).

II. Le sol : une base d'interactions biologiques

Le sol représente un milieu très complexe dans sa constitution et ses fonctions, il joue un rôle essentiel dans les écosystèmes. D'une manière générale, le sol est défini comme la couche supérieure de la croute terrestre, constituée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes vivants. Il représente l'interface entre la terre, l'air et l'eau et abrite la majeure partie de la biosphère (European Commission, 2006).

Depuis plusieurs années, les fonctions des sols et leur contribution dans les services écosystémiques sont mis en avant dans la littérature scientifiques (Doran et Safley, 1997; Baveye *et al.,* 2016; Bünemann *et al.,* 2018). Ces éléments sont également discutés au cœur des politiques publiques (Union Européenne, FAO…) afin de souligner l'importance des sols et aider les acteurs intervenant dans la gestion des sols. La dissociation entre les fonctions et les services du sol ont longtemps fait l'objet de débats qui s'accordent de nos jours sur le fait que les fonctions du sols existent indépendamment d'un bénéfice (services) pour l'homme (Rabot *et al.,* 2017; Eglin *et al.,* 2021). Les fonctions du sol sont définies comme « ce que fait le sol » (Seybold *et al.,* 1998), le recyclage des nutriments est par exemple une fonction du sol (Calvaruso *et al.,* 2021). D'après Kibblewhite et al. (2008), les fonctions du sol sont la manifestation de processus résultant des interactions entre les organismes du sol et leur environnement. Ces différentes fonctions du sol peuvent être affectées par des facteurs tels que l'érosion, la diminution de la matière organique, la compaction et la perte de biodiversité (Altobelli *et al.,* 2016; Bünemann *et al.,* 2018).

En ce qui concerne les services écosystémiques, ils constituent les bénéfices acquis directement ou indirectement par l'homme sur la base des fonctions du sol. Calvaruso et al. (2021) identifient selon la littérature scientifique 7 fonctions du sols (**Figure 8**) avec notamment les fonctions d'habitat, de stockage des MO, de support pour les végétaux et filtre pour les polluants. Les fonctions du sol génèrent de nombreux services écosystémiques dont

l'identification diverge dans la littérature suivant l'usage et la gestion des sols. La figure 8 présente neufs services écosystémiques issu de synthèses de littérature incluant la production de biomasse, le contrôle de l'érosion, la régulation de la qualité de l'eau et de l'air ainsi qu'un le patrimoine culturel.

1. L'écologie du sol

Le sol est un habitat présentant toutes les formes d'organismes vivants, sa biodiversité est la plus grande sur terre et les différentes communautés du sol sont au cœur du fonctionnement des écosystèmes terrestres (Bardgett et Van der Putten, 2014; Crowther *et al.*, 2019). Les communautés vivantes du sol sont extrêmement complexes et diversifiées avec comme groupes clés les bactéries, les champignons, les nématodes et les insectes (Dini-Andreote et van Elsas, 2019). Ces groupes présentent des millions d'espèces qui vont de la taille microscopique comme les bactéries et les champignons à la taille macroscopique comme les vers de terre (Nielsen *et al.*, 2015). Parmi les organismes du sol, les microorganismes de taille <2 µm sont particulièrement abondants et diversifiés. En effet, des dizaines de milliers d'espèces sont contenues dans 1g de sol (Roesch *et al.*, 2007; Wurst *et al.*, 2012). Les microorganismes les plus étudiés sont les bactéries et les champignons, qui représentent 5% de la matière organique du sol (Fierer *et al.*, 2007). Les groupes bactériens tels que *Protéobacteries, Acidobacteries, Bacteroidetes, Firmicutes* et *Verrucomicrobia* représentent les phyla majoritaires dans les sols agricoles (Torsvik et Øvreås, 2002; Janssen, 2006; Fierer, 2017). Ces microorganismes sont impliqués dans de nombreuses fonctions du sol et notamment dans les cycles biogéochimiques et la croissance des plantes (Wurst *et al.*, 2012; Berendsen *et al.*, 2012). Le sol abrite également une microfaune entre 3 et 250 µm de diamètre mais certains peuvent avoir un diamètre dépassant 1 mm (Jeffery *et al.*, 2013). Les groupes les plus abondants sont les nématodes, les protozoaires et les rotifères (Bachelier, 1963; Deprince, 2003; Idrissi, 2014). Au-dessus de la microfaune, il y a la mésofaune de taille comprise entre 100 µm et 2 mm dont les acariens, les collemboles, les protoures et les diploures sont les plus abondants (Swift *et al.*, 1979). Ils sont impliqués notamment dans les cycles biogéochimiques, luttent contre les maladies et ravageurs et servent de proies pour les petits vertébrés (Bonkowski *et al.*, 2009; Wurst *et al.*, 2012). Au-dessus de 2 mm les organismes du sol sont classés dans le macrofaune constitué des décomposeurs, prédateurs et herbivores.

La biodiversité du sol peut être présentée en se basant sur les groupes fonctionnels qui jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes et donc dans la fourniture de services écosystémiques (Turbé, 2010). Les groupes fonctionnels peuvent être définis comme

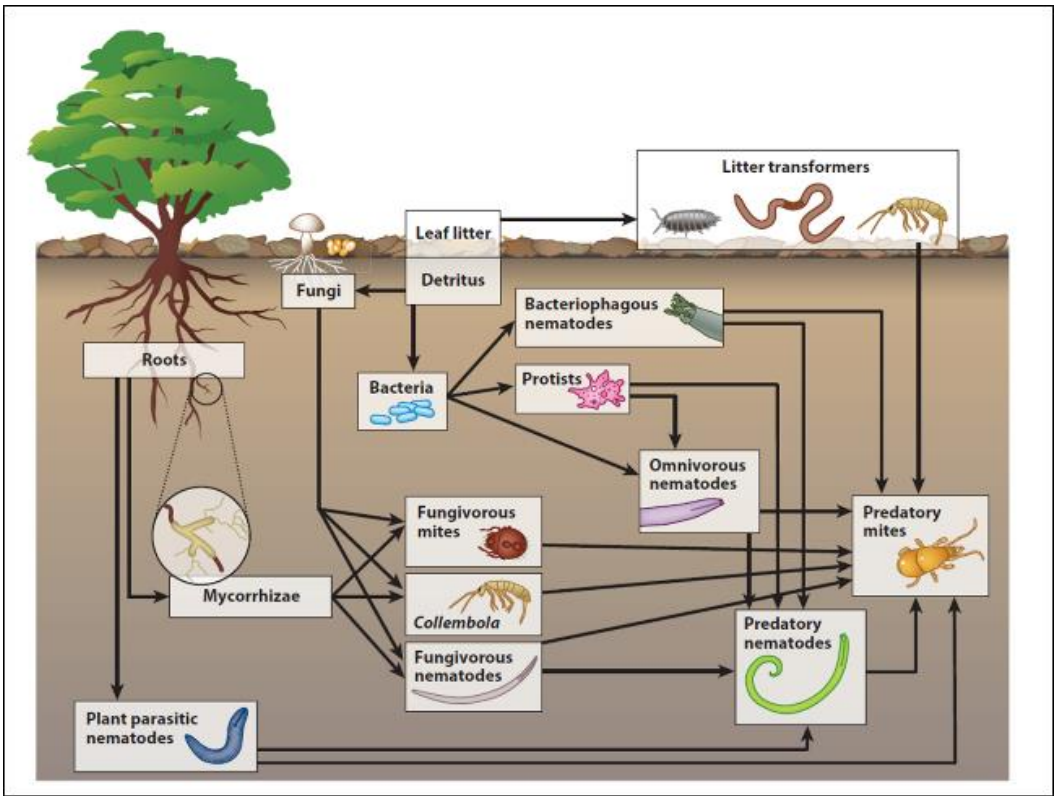


Figure 9 : Les interactions entre les organismes du sol et organisation du réseau trophique du sol (Nielsen *et al.*,2015).

Les champignons et les bactéries forment la base du réseau trophique du sol, agissant comme symbiotes ou décomposeurs des racines des plantes. Les protistes, les nématodes, les acariens et les collemboles se nourrissant de bactéries et de champignons tout en étant à leur tour la proie de la faune du sol plus grande comme les nématodes. Les réseaux trophiques du sol réels sont beaucoup plus complexes et comprennent de nombreux autres groupes de faune du sol.

un ensemble d'espèces ayant des effets similaires sur un processus biogéochimique ou biophysique spécifique au niveau de l'écosystème (les microorganismes décomposeurs ; les régulateurs biologiques : nématodes, protistes, microarthropodes et les ingénieurs des écosystèmes). Les interactions entre ces organismes influencent l'ensemble des processus du sol et font partie d'un réseau trophique complexe (**Figure 9**). Le premier niveau trophique est constitué d'organismes photosynthétiques utilisant l'énergie solaire pour former des composés organiques (algues, lichens, plantes etc..). Les consommateurs primaires forment un deuxième niveau trophique, ils consomment les organismes photosynthétiques morts et sont constitués par les bactéries, les champignons et les nématodes. Un troisième niveau trophique est formé par les parasites et les prédateurs (nématodes, arthropodes, protozoaires) qui se nourrissent des consommateurs primaires. Le niveau suivant comprend des prédateurs plus élevés, tels que les arthropodes et les nématodes prédateurs (Scheu, 2002; Turbé, 2010; Nielsen *et al.*, 2015; Kalev et Toor, 2018).

2. Les microorganismes : moteurs des fonctions du sol

Lieu majeur des interactions biologiques, le sol abrite de nombreux processus biochimiques et biophysiques essentiels pour son propre fonctionnement et celui des écosystèmes voisins (Turbé, 2010). Les microorganismes jouent un rôle central dans ces processus, ils sont à l'origines de 80 – 90% des réactions biochimiques qui se déroulent dans le sol (Nannipieri *et al.*, 2003). En effet, ils interviennent dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore et contribuent dans la fertilisation du sol *via* notamment la minéralisation de la matière organique, la fixation symbiotique du N_2 et la solubilisation du phosphore (Madsen, 2011; Rousk and Bengtson, 2014; Alori *et al.*, 2017). Les microorganismes jouent également un rôle important dans la décontamination des sols pollués, car ils sont capables de dégrader les contaminants (Sims *et al.*, 1990; Chibuike and Obiora, 2014; Abatenh *et al.*, 2017). Ils sont en interaction avec les communautés végétales du sol et ont de ce fait un impact majeur sur la nutrition et la santé des plantes (Bais *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 2010). En effet, les plantes modifient les activités microbiennes et structurent les communautés, à travers notamment la rhizodéposition et les résidus de culture (Butler *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2014; Steinauer *et al.*, 2016; de Sousa *et al.*, 2019).

2.1. Les microorganismes et les Cycles C N P

2.1.1. Cycle du Carbone (C)

Dans les écosystèmes, les principaux processus intervenant dans le cycle du C incluent la photosynthèse (fixation du CO_2), la respiration (oxydation de carbone organique en CO_2), la méthanogenèse (production de méthane) et les oxydations du méthane formant du CO_2

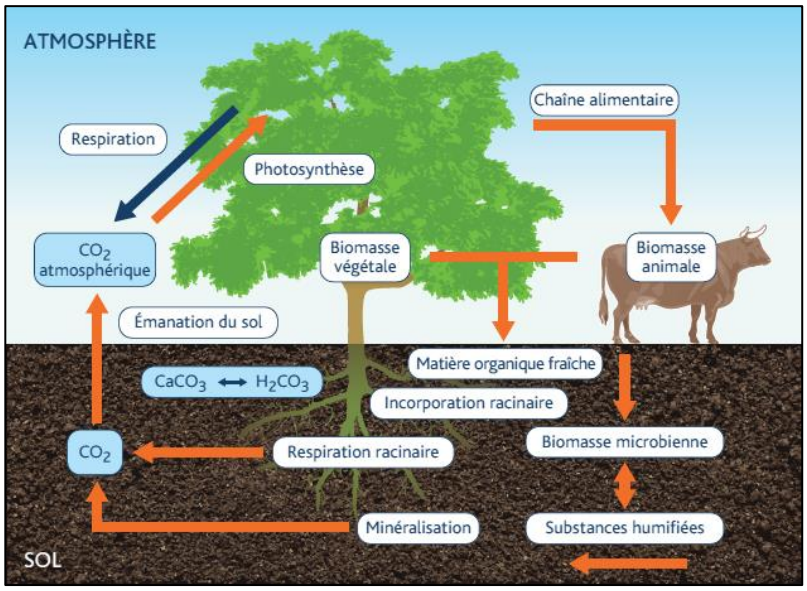


Figure 10 : Schéma du cycle du carbone dans les systèmes sol-plante-animaux © IRSN (Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire).

Le C arrive dans le sol via la fixation du CO_2 par les organismes qui ensuite par décomposition contribue la matière organique du sol et le CO_2 est renvoyé vers l'atmosphère via notamment la respiration. Le carbone organique peut également se trouver sous forme difficilement dégradable par les microorganismes notamment dans les agrégats et par humification.

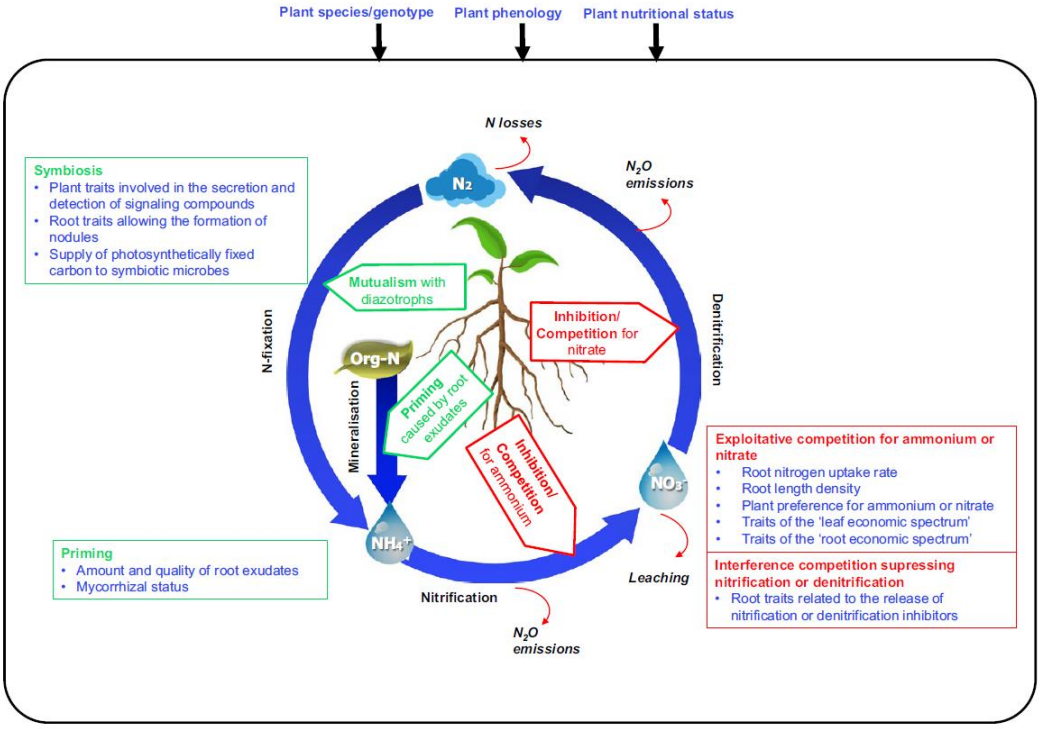


Figure 11 : Cycle de l'azote dans le sol et les différents niveaux d'intervention des plantes sur la disponibilité du N (Moreau *et al.*, 2019).

Les caractéristiques des plantes qui affectent les processus sont indiquées en bleu.

(Madsen, 2011). L'ensemble de ces processus est assuré par les micro-organismes. Sous forme de dioxyde de carbone (CO_2) dans l'atmosphère, le C est fixé par les végétaux et d'autres organismes procaryotes lors de la photosynthèse (**Figure 10**). Le C est ensuite stocké dans les sols sous forme de matière organique (Horwath, 2007; Garcia *et al.*, 2018). Le C organique du sol est le plus grand réservoir du cycle du C terrestre (Schlesinger et Andrews, 2000) et une partie du CO_2 fixé retourne vers l'atmosphère au cours de la respiration (Mackenzie, 1999; Brusseau, 2019). Le C peut également être émis vers l'atmosphère sous forme de méthane (Burney *et al.*, 2010).

En plus de la teneur en C organique qui est considérablement variable dans les sols, le C de la biomasse microbienne correspond généralement à environ 0,9–6% du C organique total, avec une valeur moyenne d'environ 2–3% (Kandeler *et al.*, 2005). Il y a une relation relativement étroite entre le C microbien et les sources de C et N disponibles dans les sols (Buscot et Varma, 2005). La dynamique du C organique dans le sol joue un rôle important dans ce cycle, ce dernier peut être protégé de la dégradation par les microorganismes (Garcia *et al.*, 2018). Cela peut se faire *via* (i) des mécanismes physicochimiques formant des agrégats, c'est le cas lorsque la matière organique du sol est associée aux particules d'argile et de limon (Ladd *et al.*, 1996) et serait inaccessible notamment en raison de la réduction de la diffusion d'oxygène ; (ii) la stabilisation biochimique par le processus d'humification. La décomposition de la matière organique par les microorganismes est un processus fortement influencé par les facteurs environnementaux, le mode de gestion/occupation des sols et les itinéraires techniques en lien avec les pratiques agricoles.

2.1.2. Cycle de l'azote (N)

L'azote joue un rôle indispensable notamment dans la production primaire et la décomposition, mais une grande majorité des organismes ne peuvent pas utiliser la source primaire de l'N (N_2 atmosphérique) (Brusseau, 2019). Il est indispensable dans la dynamique de nombreux processus dans les écosystèmes et constitue un facteur limitant pour un bon nombre d'entre eux (Vitousek et Howarth, 1991; LeBauer et Treseder, 2008). La conversion du N_2 en forme utilisable (ammoniac (NH_3)) se fait grâce aux bactéries fixatrices libres ou symbiotiques du N_2 (**Figure 11**) et constitue une source importante d'entrée d'N dans les sols agricoles en plus des engrais azotés (Peoples *et al.*, 1995). Les formes utilisables d'N sont assimilées par les plantes et autres organismes qui synthétisent de l'N organique (protéines, acides aminées et nucléiques). Pendant la décomposition des organismes en fin du vie (animaux, végétaux, champions, bactéries), les formes organiques d'N sont dégradées par des microorganismes saprophytiques *via* la minéralisation et l'ammonification avec formation

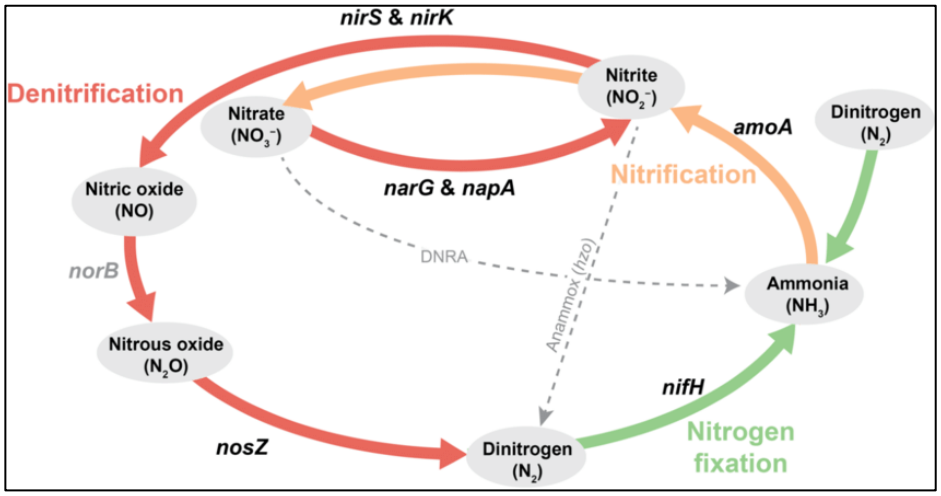


Figure 12 : Les gènes de fonctions impliqués dans les différentes étapes du cycle de l'azote (Griffith, 2016).

Entrée de N dans le sol : Fixation nif H (di nitrogène réductase) Dénitrification napA, narG (nitrate réductase) ; nirK, nirS (nitrite reductase) ; nosZ (nitrous oxide reductase) ; Nitrification AmoA (Amonia momooxygenase).

d'ammonium (NH_4^+)(Li *et al.*, 2019). Le NH_4^+ issu de la minéralisation peut être assimilé par les plantes et les microorganismes ou converti par des bactéries par la nitrification formant du nitrate (NO_3^-) (Buscot et Varma, 2005). Le NO_3^- peut par la suite être réduit en formes gazeuses (oxide nitrique (NO), protoxyde d'azote (N_2O) et diazote (N_2)) *via* le processus de dénitrification et retourné dans l'atmosphère (Bocking et Blyth, 2018).

La présence des plantes dans les sols peut également influencer le cycle N à différent niveau grâce à leurs traits fonctionnels (**Figure 11**). Certaines études montrent des relations entre les traits des plantes, l'activité des microorganismes intervenant dans le cycle N, la perte et la rétention du N dans le sol (Abalos *et al.*, 2014; Cantarel *et al.*, 2015; Guyonnet *et al.*, 2017). Il a été démontré que, par rapport aux espèces à croissance lente, les espèces à croissance rapide sont associées à une réduction des pertes d'N par lixiviation (De Vries et Bardgett, 2016) et à une réduction des émissions microbiennes de N_2O (Abalos *et al.*, 2018). La présence des racines dans le sol impacte le cycle du N notamment la disponibilité de celui-ci dans l'écosystème *via* la fixation symbiotique du N_2, la stimulation de la minéralisation et la réduction par dénitrification (Guyonnet *et al.*, 2017; Moreau *et al.*, 2019).

Différents gènes de fonctions sont associés aux principales étapes de transformation d'N (**Figure 12**) et permettent d'identifier les communautés microbiennes directement impliquées dans ces transformations (Wallenstein et Vilgalys, 2005; Ribbons *et al.*, 2016; ; Karthikeyan *et al.*, 2020). Pour la fixation du N_2, le gène le plus utilisé comme marqueur des bactéries fixatrices de N_2 est le gène *nif H* codant pour la nitrogénase réductase chez les diazotrophes (Mergel *et al.*, 2001; Bürgmann *et al.*, 2004). Au niveau de la nitrification le gène le plus étudié est *amoA* codant pour l'ammonium monooxygénase et les microorganismes chimiolithotrophes constituent un groupe essentiel dans ce processus (Levy-Booth *et al.*, 2014; Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2017). Les gènes *napA* et *narG* codant la nitrate réductase sont très utilisés pour étudier les communautés microbiennes qui interviennent dans la première étape de la dénitrification (conversion du NO_3^- en NO_2^-) et les gènes *nirS et nirK* codant la nitrite réductase, responsable de la conversion du NO_2^- en NO (Sharma *et al.*, 2005; Philippot *et al.*, 2006). En dernière étape de la dénitrification, les gènes *nosZ* (nitrous oxyde reductase) sont souvent étudiés et interviennent dans l'étape de conversion du NO en N_2 (Sameshima-Saito *et al.*, 2006; Inaba *et al.*, 2012). L'étude de ces différents gènes de fonctions permet l'identification des communautés microbiennes impliquées dans les différentes étapes de transformation en lien avec le cycle de l'azote.

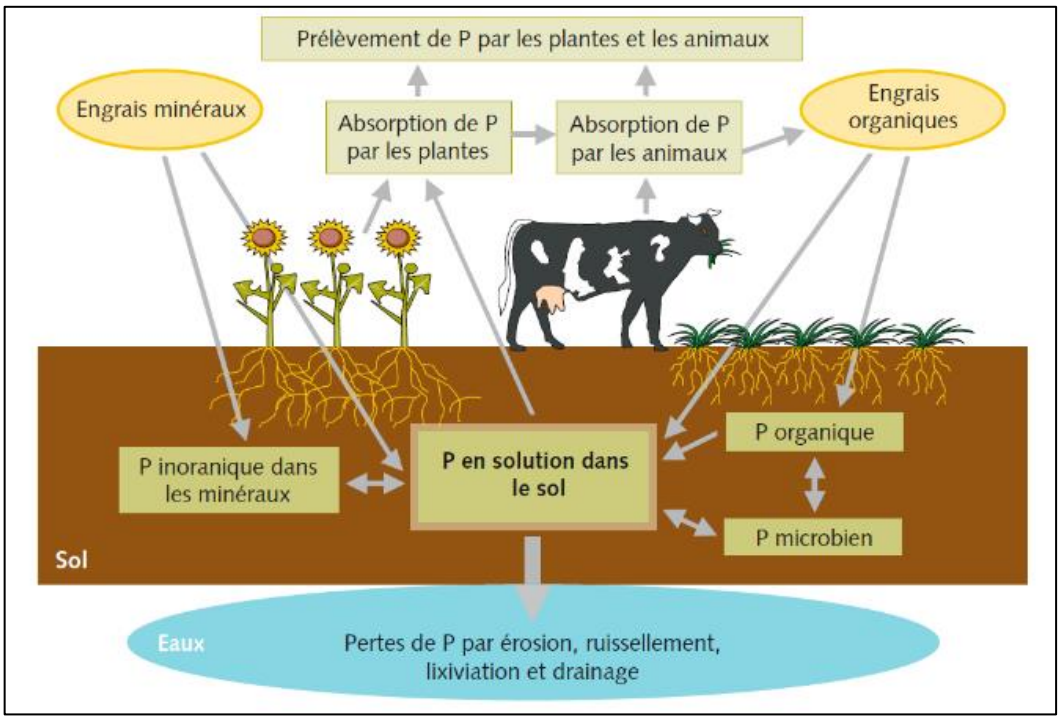


Figure 13 : Représentation simplifiée du cycle du phosphore dans les sols agricoles (Prasuhn et Flisch, 2005).

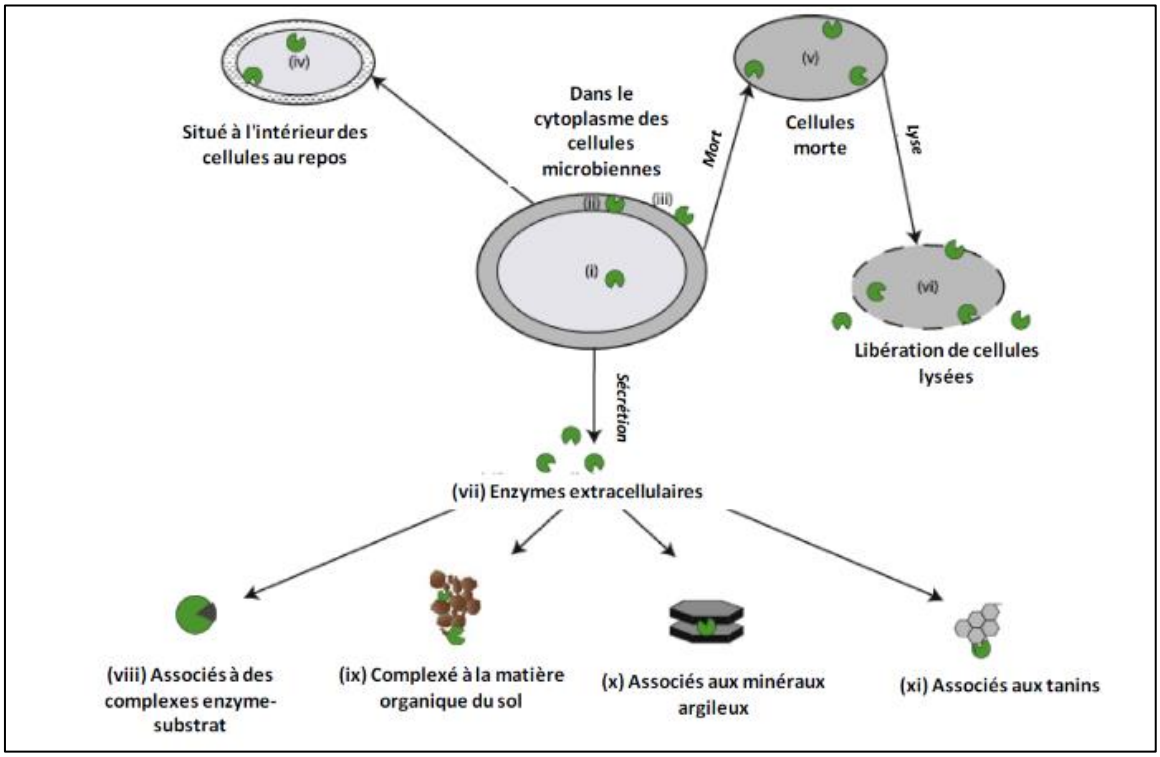


Figure 14 : Localisation et état des enzymes dans les sols (d'après Burns *et al.*, 2013)

(i) dans le cytoplasme des cellules microbiennes; (ii) à l'espace périplasmatique 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.

2.1.3. Cycle du phosphore (P)

Le P est l'autre élément majeur limitant pour la croissance des plantes. En effet, le P est peu accessible en raison de sa haute réactivité avec le calcium, le fer et l'aluminium dans le sol (Buscot et Varma, 2005). Le P est rendu disponible dans les sols agricoles *via* la décomposition de la matière organique et l'apport de fertilisant (**Figure 13**). Le P organique est hydrolysé et solubilisé par l'action de certains microorganismes et certaines plantes (Alori *et al.*, 2017; Amy *et al.*, 2022). La dernière étape de la conversion du P organique en Phosphate se produit également par l'action des enzymes phosphatases (Plante, 2007). Le P rendu soluble peut ensuite être lixivié ou perdu par ruissèlement en fonction des caractéristiques du sol. Les microorganismes peuvent entrainer la fixation ou l'immobilisation du P dans le sol en favorisant la formation de précipités inorganiques ou par assimilation en constituants cellulaires organiques ou granules de polyphosphate intracellulaire (Plante, 2007; Yevdokimov *et al.*, 2016; Amy *et al.*, 2022). L'immobilisation du P est affectée par le rapport C:P des matières organiques décomposées et la quantité de P disponible en solution. Lorsqu'il y a un ratio C:P < 200 il y aura une minéralisation nette du P et inversement, un C:P > 300 entraînera une immobilisation nette du P, peu de variation sont observées, entre immobilisation et minéralisation pour des ratio entre 200 - 300 (Plante, 2007).

3. Les Activités enzymatiques du sol

Le sol rhizosphérique constitue un milieu extrêmement riche en organismes et les processus de transfert d'énergie, le recyclage des éléments, la productivité et la qualité des sols sont largement modulés par la présence d'enzymes qui catalysent les différentes réactions dans le sol (Tabatabai, 1994). Les plantes, les animaux et les microorganismes sont à l'origine des enzymes extracellulaires présentes dans le sol suite à la senescence ou la lyse cellulaire ou par production directe d'enzymes pour des raisons physiologiques (Gianfreda et Ruggiero, 2006). Les microorganismes constituent la source majoritaire de ces enzymes dans le sol (Rao *et al.*, 2017; Datt et Singh, 2019). Elles sont synthétisées par différents processus et peuvent être intra ou extracellulaires (Rao *et al.*, 2017) contribuant quantitativement et qualitativement à l'activité enzymatique globale dans les sols (Gianfreda et Ruggiero, 2006; Burns *et al.*, 2013; Adetunji *et al.*, 2020) (**Figure 14**). Ces enzymes peuvent se trouver sous différentes formes dans le sol en liaison avec les particules du sol (argile, colloïdes humiques) par adsorption, microencapsulation, réticulation, formation de copolymère, piégeage, échange d'ions et fixation covalente (Karaca *et al.*, 2011). Ces processus de liaison participent à la stabilisation des enzymes dans le sol (Dick and Tabatabai, 1999; Dick, 2020; Dove *et al.*, 2020).

3.1. Régulation des activités enzymatiques dans le sol

Les enzymes du sol sont produites par les organismes en fonction de leurs besoins métaboliques et de la disponibilité des nutriments (Caldwell, 2005). Les microorganismes peuvent ainsi produire les enzymes d'une part de manière constitutive (en permanence sans régulation) et d'autres part *via* une induction par un substrat spécifique (Priest, 1977; Allison *et al.*, 2011). En raison de la grande complexité des processus du sol, les enzymes produites par induction sont soumises à une régulation liée aux facteurs environnementaux (Tabatabai, 1994). L'activité de toute enzyme dans le sol résulte de sa synthèse, de sa stabilisation, de sa régulation et de son comportement catalytique (Dick et Tabatabai, 1999). Tous ces processus peuvent être influencés par des changements dans la composition physique, chimique et biologique du sol (Gianfreda et Ruggiero, 2006).

Une réaction enzymatique peut être schématisée comme suit :

Où **S** est le substrat, **E** est l'enzyme du sol, **ES** est le complexe instable intermédiaire enzyme-substrat, **P** est le produit de la réaction et **k1, k2 et k3** les constantes de vitesse de réaction (Dotaniya *et al.*, 2019). Les réactions enzymatiques peuvent être régulées par la quantité de produit formé, l'activité de l'enzyme s'arrête par rétrocontrôle lorsqu'il est présent en forte concentration. Par exemple une augmentation de la concentration du phosphore inorganique dans la solution du sol réduit l'activité des phosphatases (Sinsabaugh *et al.*, 1993; Amador et Jones, 1997; Sarapatka, 2003). Les réactions enzymatiques sont également très dépendantes du pH, de manière générale les enzymes ont un pH optimal et leurs activités décroient lors d'une modification de ce pH, et sont irréversiblement dénaturées dans des conditions de pH extrêmes (Tabatabai, 1994; Burns *et al.*, 2013). La température est aussi un facteur de régulation important, les enzymes sont de grosses molécules protéiques et une température excessive entraîne une dénaturation de la structure protéique de l'enzyme (Campbell et Smith 1993 ; (Karaca *et al.*, 2011). D'autres facteurs influencent l'activité des enzymes comme la salinité (diminution d'activité avec une forte salinité), l'humidité du sol et la présence de métaux lourds (Aponte *et al.*, 2020). Les pesticides peuvent également modifier

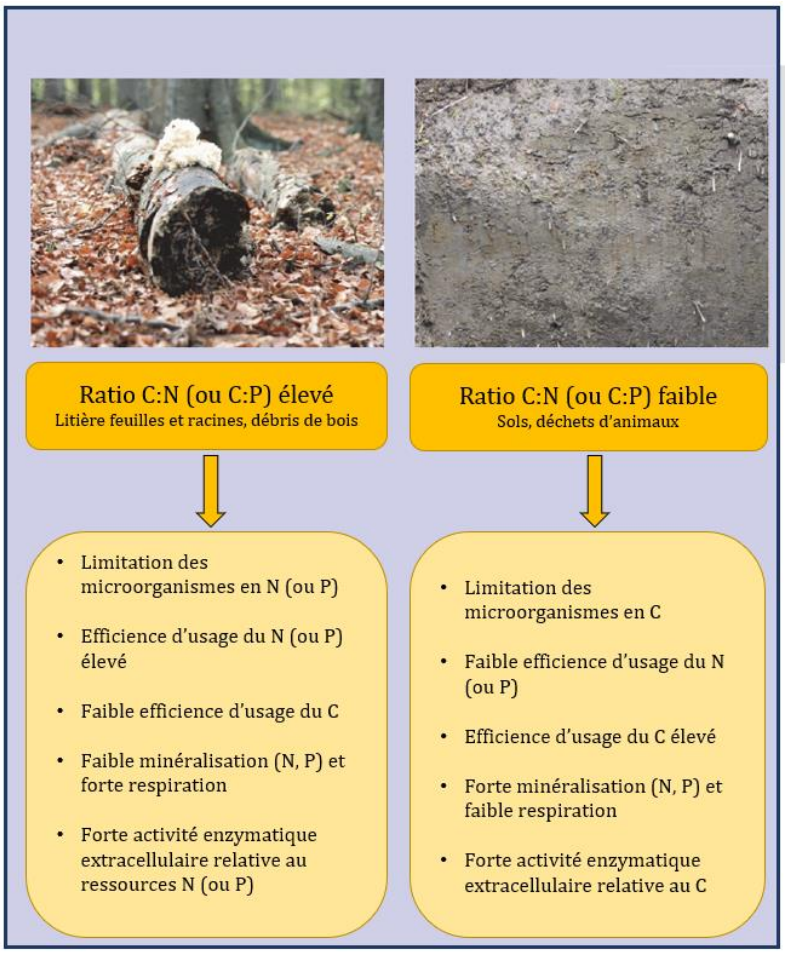


Figure 15 : Effets hypothétiques des ratios élémentaires (C, N, P) de la litière végétale et du sol sur les processus microbiens (d'après Zechmeister-Boltenstern *et al.*, 2015).

certaines activités enzymatiques du sol (Schäffer, 1993; Riah *et al.*, 2014; Riah-Anglet *et al.*, 2018). Ils peuvent se lier directement aux enzymes en modifiant leurs conformations, leurs activités et présentent des effets indirects principalement par induction de changements dans la structure et les fonctions des microorganismes (Gianfreda et Ruggiero, 2006). Les pratiques agricoles, telle que le travail du sol, le mode d'usage, le type de systèmes de culture influencent également les activités enzymatiques dans les sols (Sannino et Gianfreda, 2001; Kalyani *et al.*, 2010; Sekaran *et al.*, 2020). Plusieurs études ont d'ailleurs montré l'effet positif des rotation de cultures incluant les Fabacées sur les activités enzymatiques du sol (Aschi *et al.*, 2017; Rezgui *et al.*, 2020; Pittarello *et al.*, 2021).

3.2. Stœchiométrie des éléments et activités enzymatiques dans le sol

Les substrats ciblés par les enzymes sont essentiellement des macromolécules incluant les protéines, les glucides polymérisés, le phosphore organique et les lignines. Ces macromolécules présentent des ratios élémentaires (C:N:P) bien définis et chez la plupart des organismes, elles définissent fortement leur stœchiométrie et leur demande en nutriments (Sinsabaugh *et al.*, 2008, 2009; Allison *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2021). Chez les microorganismes, les différents taxons présentent des différences stœchiométriques nettes qui pourraient affecter leur demande en ressources. Par exemple, les bactéries ont des rapports C:N de 5:1 (paroi cellulaire riche en N), tandis que les champignons montrent des rapports C:N de 15:1 (paroi cellulaire riche en C) (Sterner et Elser, 2002). D'après Zechmeister-Boltenstern et al. (2015), la stœchiométrie permet de couvrir différents niveaux d'organisation biologique en établissant des liens entre les différents compartiments de l'écosystème (**Figure 15**). Dans le sol, lorsque les ratio C:N et C:P sont faibles, les microorganismes sont limités en C et ont de ce fait des faibles efficiences d'utilisation du N et du P et présentent un taux de minéralisation N et P élevé. En réponse à la limitation du C par rapport au N et P, les microorganismes enclenchent une forte activité d'enzymes extracellulaires pour dégrader des substrats carbonés (**Figure 15**). De même, en réponse à des ratios C:N et C:P élevés dans les litières végétales, les microorganismes présentent des niveaux d'activités enzymatiques extracellulaires N et P très importantes (limitation en N, P). La compréhension des facteurs modulant la demande en nutriments contribuent à expliquer les modèles de production d'enzymes dans le sol (Sinsabaugh *et al.*, 2009; Allison *et al.*, 2011, 2014; Bai *et al.*, 2021).

L'utilisation des ratios C:N, C:P et N:P peut donc aider à mieux comprendre l'allocation des ressources dans les interactions sol-plante (Sterner et Elser, 2002). Plusieurs études récentes ce sont intéressées à la stœchiométrie des éléments C:N:P et ces ratios ont été utilisés en incluant les enzymes impliquées directement dans la dégradation de ces éléments

Tableau 1 : les principales enzymes mesurées dans les sols. D'après Rao et al. (2017).

Enzyme	Source	Réaction catalysée	Cycle	Facteurs influençant l'activités de l'enzyme
α-Amylase	Microorganismes, plantes, animaux	Hydrolyse de l'amidon	**Cycle C**	Pratiques agricoles, type de végétation, environnement et types de sol
β-Amylase	Principalement les plantes	Hydrolyse de l'amidon		
Déshydrogénase	Microorganismes	Oxydation de composés organiques		Teneur en eau du sol, température, pesticides, oligo-éléments, pratiques agricoles, pollution
Endo/Exo-1, 4-β-glucanase	Microorganismes, protozoaire et termites	Endo hydrolyse de la cellulose /Clivage de cellulose aux extrémités		Température, pH, eau, teneur en O_2, qualité et emplacement de la matière organique, des éléments minéraux et des fongicides.
β-glucosidase		Hydrolyse du cellobiose		
Phénol Oxydase	Microorganismes, plantes	Hydrolyse de la lignine		pH, précipitations et températures, enrichissement en N
Protéase	Microorganismes, plantes	Minéralisation du N	**Cycle N**	[Acide humique], disponibilité en C et N
Chitinase	Microorganismes, plantes	Dégradation et hydrolyse de la Chitine		Disponibilité en N, profondeur du sol, [CO_2]
Uréase	Microorganismes, plantes et quelques invertébrés	Hydrolyse de l'urée		Profondeur du sol, pesticides, pratiques agricoles, teneur en matière organique
Arylsulfatase	Microorganismes, plantes, animaux	Hydrolyse des esters de sulfate	**Cycle S**	Métaux lourds, pH, teneur et composition en matière organique, et disponibilité des esters de sulfate
Phosphatase acide	Microorganismes, plantes	Solubilisation du P (Hydrolyse des esters et anhydrides de l'acide phosphorique)	**Cycle P**	Teneur en matière organique, pH, pratiques de gestion, pollution, espèces de cultures et variétés
Phosphatase Alcaline	Principalement les bactéries			

(Hill *et al.*, 2012; Moorhead *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2020; Cui *et al.*, 2021). La stœchiométrie enzymatique est considérée comme un indicateur pertinent de la limitation relative des microorganismes du sol en ressources (Sinsabaugh *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2021). Les études traitant de la stœchiométrie enzymatique ont confirmé que l'utilisation d'une seule activité enzymatique comme indicateur de la dynamique des nutriments dans le sol n'est pas représentative de la complexité des activités métaboliques dans les sols (Ghosh *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Il pourrait être plus efficace et pertinent de combiner une grande variété d'enzymes du sol.

3.3. Les principales enzymes mesurées dans les sols

Il existe 6 classes d'enzymes selon la nomenclature E.C (Enzyme Commission), les enzymes majeures dans le sol appartiennent aux classes d'enzymes hydrolases, oxydoréductases et lyases. La classe d'enzymes extracellulaires dominante dans les sols est la classe des hydrolases incluant les amylases, les cellulases, les glucosidases, les phosphoestérases, les sulfatases, les amidases, l'uréase etc. (Dotaniya *et al.*, 2019). Le **Tableau 1** présente une liste non exhaustive d'activités enzymatiques utilisées couramment comme indicateur de l'état biologique des sols (Rao *et al.* (2017). Ce tableau met en exergue la diversité des activités enzymatiques intervenant dans la dégradation d'un panel de substrats avec différents niveaux de complexité, pouvant renseigner ainsi sur les capacités métaboliques des sols agricoles.

3.3.1. β-Glucosidase (Cycle C)

Secrétée surtout par les microorganismes, la β-Glucosidase (BG) est souvent utilisée comme indicateur pour l'évaluation de la qualité des sols (Almeida *et al.*, 2015; Adetunji *et al.*, 2017, 2020). Elle intervient dans l'hydrolyse du maltose et de la cellobiose issue de la dégradation de la cellulose pour produire le glucose, qui peut servir comme source d'énergie pour les communautés microbiennes. En effet, les apports de matière organique au sol sous forme de résidus végétaux et de litières contiennent souvent beaucoup de cellulose qui est dégradée pour être utilisées par les microorganismes du sol, ainsi les enzymes cellulases et glucosidases jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique (Tabatabai, 1994).

Différents facteurs peuvent influencer l'activité de la BG dans les sols. En effet, cette activité varie en fonction de la température, la teneur en eau dans le sol et la qualité de la matière organique (Sardans *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2016; Rao *et al.*, 2017). Une augmentation du pH, de la salinité, une diminution d'humidité, ainsi qu'un état structural du sol compacté, réduisent l'activité de cette enzyme (Rietz and Haynes, 2003; Puissant *et al.*, 2019). Au niveau des systèmes de culture, la présence de Fabacées peut également jouer sur cette activité. Il a ainsi été montré qu'une rotation riz-pois chiche augmente diverses activités enzymatiques du

sol, dont la β-glucosidase, par rapport à une rotation riz-blé (Borase *et al.*, 2021). L'activité de cette enzyme a également fait l'objet de recherches qui montrent qu'elle est fortement influencée par les différents couverts de Fabacées fourragères (Navas *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2022).

3.3.2. Arylamidase (Cycle N)

L'arylamidase (ARYLN) est une enzyme appartenant au groupe des amidases. L'ARYLN intervient dans l'hydrolyse du N organique dissous et plus particulièrement dans le clivage du N-terminal des acides aminés, des peptides de petite taille ainsi que des arylamides (Dodor et Tabatabai, 2002). Cette enzyme joue un rôle important dans la minéralisation du N et est largement répandue dans la nature chez les plantes, les animaux et les microorganismes (Tabatabai *et al.*, 2002; Dodor et Tabatabai, 2007).

Les conditions optimales pour l'action de l'ARYLN dans le sol, correspondent à un pH alcalin autour de 9 et une forte proportion d'acide aminés tels que l'alanine et/ou la leucine dans la matière organique (Tabatabai *et al.*, 2002). L'activité de l'ARYLN est influencée comme d'autres enzymes, par le travail du sol et diminue avec la profondeur du sol (Acosta-Martínez et Tabatabai, 2001). En effet, il a été démontré que l'activité de cette enzyme est significativement plus importante dans les systèmes sans travail du sol que dans les systèmes avec travail du sol et également influencée par la taille des agrégats (Muruganandam *et al.*, 2006, 2009; Tang *et al.*, 2021). Comme pour BG, un impact positif d'une rotation de cultures incluant une Fabacée à graine (féverole) sur l'activité ARYLN a déjà été démontré (Aschi *et al.*, 2017).

3.3.3. Chitinases (Cycle C, N)

Les chitinases d'origines microbiennes sont cruciales dans les cycles biogéochimiques du C et du N par l'hydrolyse de la chitine qui est un constituant essentiel de la structure squelettique des insectes et du mycélium fongique (Hjort *et al.*, 2014). En plus de la cellulose (réserve C), la chitine constitue l'un des plus gros réservoirs organiques de C et N présent dans les sols. La N-acétyl-glucosaminidase (NAG) est l'une des trois chitinases (β-glucosaminidase, chitobiosidase et endochitinase) impliquées dans l'hydrolyse des résidus N-acétylesglucosamines des extrémités non réductrices des chito-oligosaccharides.

Cette activité est corrélée positivement avec l'N minéral du sol et peut ainsi être utilisée comme un indice de la minéralisation du N (Tabatabai *et al.*, 2010). Dans la plante, elle est synthétisée en réponse aux infections microbiennes (Punja and Zhang, 1993; Gust *et al.*, 2012). Elle participe ainsi à la défense de la plante contre les agents pathogènes et est souvent affectée

par les systèmes culturaux avec notamment une plus faible activité dans un système de monoculture par rapport une rotation culturale (Ekenler et Tabatabai, 2002).

3.3.4. Phosphatases (Cycle P)

Les phosphatases sont les enzymes extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des liaisons phospho-ester dans les substrats organiques contenant du P libérant du P inorganique sous forme d'orthophosphates ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}) qui peuvent être utilisés par le biote du sol. La demande de P par les plantes et les microorganismes est liée à la production et à l'activitédes phosphatases du sol (Condron *et al.*, 2015), moins il y a de P dans le sol, plus les organismes vont sécréter des phosphatases afin de produire du P inorganique facilement assimilable.

Les phosphatases sont classées en plusieurs types en fonction du nombre de liaisons hydrolysées pour libérer l'orthophosphate et du pH optimal pour l'activité (Dotaniya *et al.*, 2019). Les phosphatases alcalines et acides permettent l'hydrolyse des liaisons C-O-P dites phospho-ester dans un milieu possédant un pH plutôt basique pour la première (9 à 11) et acide pour la seconde 5 à 6.6). Ces enzymes diffèrent également par les organismes qui les produisent : la phosphatase alcaline est produite par les microorganismes et notamment les champignons mycorhiziens, tandis que la phosphatase acide est produite principalement par les plantes (orge, soja, lupin etc.) mais aussi par certains microorganismes (Rejmánková et Sirová, 2007). Le pH a ainsi une action sur le type et l'activité des phosphatases : dans un sol acide l'activité des phosphatases alcalines seront faibles et moins actives que des phosphatases acides. Ces enzymes sont connues pour leur sensibilité à l'humidité et les métaux lourds qui peuvent inhiber leurs activités (Adetunji *et al.*, 2017).

4. Les interactions sol – plante

Le sol est la principale réserve de nutriments pour la plante qui en retour modifie celui-ci par la rhizodéposition. Le sol contient des éléments nutritifs qui sont classé en macro (C, N, P, K…) et micronutriments (Ca, Fe, Na, Mg…) entrant dans la composition des molécules structurelles et fonctionnelles des plantes (Altobelli *et al.*, 2016). Malgré cette abondance de nutriments, leur acquisition par les plantes est rendue complexe par l'hétérogénéité du sol avec une distribution spatiale des ressources et parfois sous des formes difficilement utilisables (Marschner et Rengel, 2012; Mimmo *et al.*, 2018). En effet, la disponibilité de ces différents éléments varie en fonction des facteurs environnementaux, des propriétés biologiques et physico-chimiques des sols (Corey, 1990; Fageria et Stone, 2006; Rao *et al.*, 2017). Ces différents paramètres de l'écologie du sol sont à leur tour influencés par la végétation. Les plantes sont en mesures de modifier leur environnement *via* le system racinaire et le volume du

sol sous l'influence des racines, cette interaction a fait l'objet de nombreux travaux (Bais *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2013; Ahkami *et al.*, 2017). En effet *via* des composés libérés par les racines vivantes, les plantes impactent la structure des communautés microbiennes, pouvant influencer en retour la dynamique des nutriments ou la capacité des plantes à résister aux maladies (Hartmann *et al.*, 2009; Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015; Carof *et al.*, 2018). En plus d'interagir avec les organismes, les plantes peuvent intervenir dans de nombreux processus physico-chimiques du sol (Jastrow *et al.*, 1998; Read *et al.*, 2003;Bardgett *et al.*, 2014). Au cœur des interactions trophiques, l'effet des plantes sur les organismes du sol diffère en fonction de la quantité et de la composition de leur litière, de leurs traits fonctionnels et des composés libérés par leurs racines (Freschet *et al.*, 2018). En raison des nombreux processus impliqués, l'études de ces interactions entre la plante et le sol, plus particulièrement entre la plante et la grande diversité d'organismes dans le sol, sont importantes pour relever les défis de la production végétale (Carof *et al.*, 2018).

III. Processus de rhizodéposition : moyen d'échange entre la plante et le sol

1. Composantes de la rhizodéposition

Les systèmes racinaires des plantes jouent un rôle essentiel dans la croissance et la nutrition des plantes *via* leur fonction de prélèvement de minéraux à partir du sol. En plus de leur capacité à absorber des minéraux et de stocker des composés chimiques biologiquement actifs, les racines libèrent également différents types de composés dans la rhizosphère (Bais *et al.*, 2006). La rhizosphère est définie comme le volume de sol sous l'influence et en contact direct avec les racines d'une plante en croissance (Bais *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 2009) et constitue une zone d'interaction entre la plante et les microorganismes du sol (Smalla *et al.*, 2001; Guyonnet *et al.*, 2018*b*). La rhizosphère est une zone de sol particulièrement importante, un hotspot où l'activité microbienne est de 2 à 20 fois supérieure à celle d'un sol non influencé par l'activité racinaire (Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015).

En fonction des études, différentes définitions sont attribuées à la rhizodéposition. Un grand nombre d'études définissent la rhizodéposition comme l'émission de C organique par les racines incluant l'exsudation, les lysats cellulaires, les débris racinaire et les cellules bordantes « border cells » (Meharg, 1994; Kuzyakov et Domanski, 2000; Nguyen, 2003; Jones *et al.*, 2004). Il est cependant établi que les racines libèrent en plus du C des composés minéraux et en particulier des composés azotés (Paynel *et al.*, 2001 ; Wichern *et al.*, 2007 ; Louarn *et al.*, 2015). C'est pourquoi certains auteurs définissent de façon plus large la rhizodéposition comme « la libération de toutes sortes de composés par les racines d'une plante vivante, y

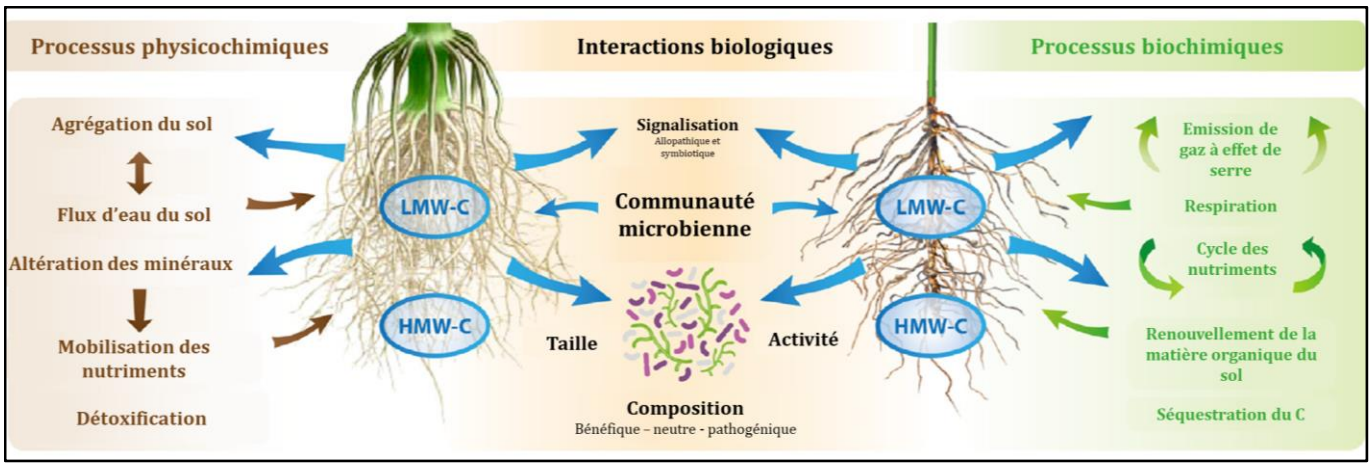


Figure 16 : Interactions sol /plante /microorganismes : les processus rhizosphériques affectés par la rhizodéposition (implication de composés carbonés) (d'après Oburger et Jones, 2018)
LMW-C (Low Molecular Weight C); HMW-C (High Molecular Weight C).

compris les ions et les composés volatiles » (Uren, 2001; Wichern *et al.*, 2008). Ce processus peut ainsi être subdivisé en deux parties incluant :

(i) Les composés provenant de racines vivantes (tissus et cellules) : notamment l'exsudation racinaire avec sécrétion d'ions, d'enzymes, de mucilage et une large gamme de métabolites primaires et secondaires (Marschner, 1995; Bais *et al.*, 2006).

(ii) Les composés provenant des résidus des tissus racinaires : fragments racinaires avec notamment la sénescence des tissus racinaires et des cellules de bordure.

2. Rhizodéposition du Carbone

Par fixation et transformation du CO_2 atmosphérique en composés organiques, les plantes contribuent à l'augmentation du stock de C organique du sol reliant ainsi les parties abiotique et biotique du cycle C (Pausch et Kuzyakov, 2018). Cet apport résulte de la décomposition des résidus de tissus végétaux et de la rhizodéposition (Kuzyakov et Domanski, 2000; Nguyen, 2003). Selon Nguyen (2003), une moyenne de 17% du C fixé par la plante est rhizodéposé dans le sol mais ce chiffre varie très fortement en fonction des espèces, des méthodes d'étude et du stade physiologique de la plante (Kuzyakov et Domanski, 2000*a*; Pausch *et al.*, 2013; Pausch and Kuzyakov, 2018). Cette proportion est plus élevée chez les plantes prairiales, entre 30 et 50 %, que chez les grandes cultures ou elle représente entre 20 et 30 % du C fixé (Pausch et Kuzyakov, 2018). La contribution de chacune des composantes de la rhizodéposition est particulièrement délicate à déterminer (Nguyen, 2003). Le C issu de l'exsudation serait 10 – 100 fois plus important par rapport au C provenant des cellules bordantes et des mucilages (Nguyen, 2003). Les composés solubles exsudés (majoritairement des sucres, des acides organiques et des acides aminés) contribueraient de 1 – 10% au flux total de C (Paterson, 2003). Il a été proposé que 90% des rhizodépots serait constitué par les débris racinaires (Uren, 2001) mais très peu d'études ont permis de distinguer les différentes composantes de la rhizodéposition (Nguyen, 2003).

L'apport en C issu de la rhizodéposition est important pour de nombreux processus rhizosphériques (**Figure 16**) incluant les processus physico-chimiques, biochimiques et les interactions biologiques (Six *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 2007; Oburger et Jones, 2018). Cette source de C est rapidement consommée par les microorganismes et environ un tiers du C rhizodéposé contribue à la biomasse microbienne (Hupe *et al.*, 2019). De même, il est estimé que 23% du C total issu de la rhizodéposition est alloué à la biomasse microbienne et au

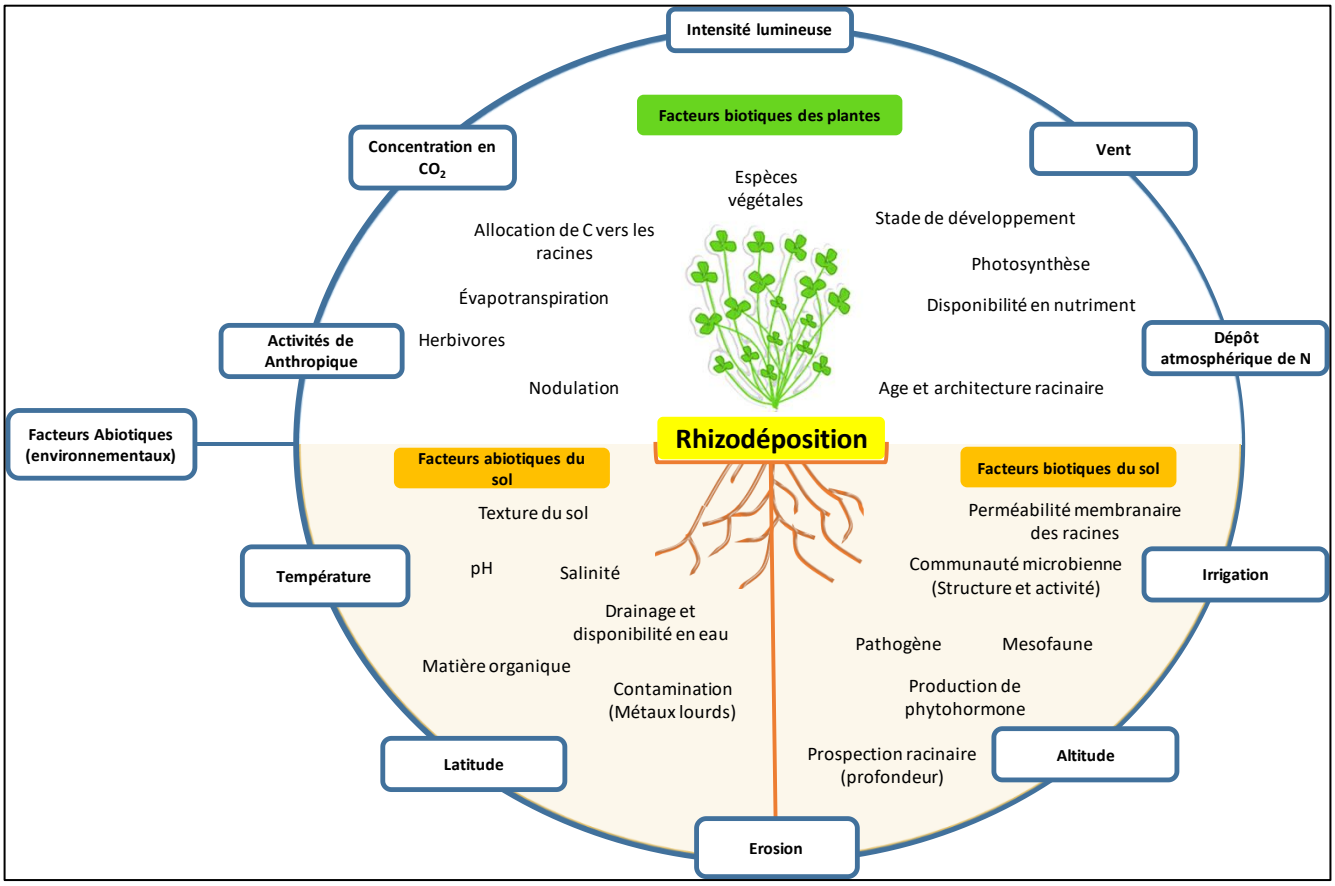


Figure 17 : Facteurs biotiques et abiotiques influençant la rhizodéposition (d'après Jones *et al.*, 2004).

niveau global cela représenterait 1.3% du C total dans le system plante-sol (Schenck zu Schweinsberg-Mickan *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2019).

3. Rhizodéposition de l'Azote

La rhizodéposition de l'azote suit les mêmes voies que le C, incluant ainsi la senescence racinaire et l'exsudation de composés solubles (Wichern *et al.*, 2008; Fustec *et al.*, 2010). L'exsudation de composés N solubles est constituée de 6 – 31% d'éléments comme le NO_3^-, le NH_4^+ et les acides aminés (Paynel et Cliquet, 2003; Lesuffleur, 2007; Bobille *et al.*, 2016). La quantité d'N rhizodéposé et la composition des exsudats en N varient également en fonction des espèces (Wichern *et al.*, 2008). Certaines études signalent également la présence d'uréides dans les exsudats mais il est probable qu'une forte proportion des composés N exsudés n'ont pas été identifiés (Paynel et Cliquet, 2003; Warren, 2015). Il est cependant connu que les espèces de Fabacées présentent des exsudats racinaires plus riches en NH_4^+ et en acides aminés par rapport aux exsudats des autres espèces (Hale *et al.*, 1978; Liu *et al.*, 2022).

Alors que les flux de C se font presque exclusivement de la plante vers le sol, les échanges d'azote entre le sol et les plantes se font dans les 2 sens, mais surtout du sol vers la plante via l'absorption de l'N. La rhizodéposition de l'N est estimée entre 4 et 71% du N total assimilé par la plante avec une médiane de 16% chez les Fabacées et 14% chez les céréales (Wichern *et al.*, 2008). En effet, la capacité des Fabacées à utiliser l'azote atmosphérique *via* la symbiose avec les *Rhizobia,* leur permet d'enrichir le sol en N d'origine atmosphérique (Høgh-Jensen et Schjoerring, 2001; Fustec *et al.*, 2010). En plus de la sénescence des tissus racinaires, la sénescence des nodules contribue, elle aussi à l'apport en N dans le sol (Dubach et Russelle, 1994; Jensen, 1996). Le N provenant de la rhizodéposition serait également majoritairement lié à la sénescence racinaire, les composés C issus de l'exsudation étant estimés à 1 – 10%, certains auteurs supposent le même ordre de grandeur pour l'N exsudé (Wichern *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009). Cette estimation de la rhizodéposition de l' N est essentielle afin de mieux comprendre la dynamique de N dans le sol et sa disponibilité pour les cultures dans les rotations culturales (Mayer *et al.*, 2003; Hupe, 2016; Guinet, 2019).

4. Facteurs de variation de la rhizodéposition

De nombreux facteurs biotiques et abiotiques modulent la rhizodéposition (**Figure 17**). L'effet du stade de développement sur la rhizodéposition est très étudié mais les résultats obtenus sont contradictoires. Ainsi, selon Nguyen (2003), plus la plante est âgée moins il y aurait de carbone alloué au compartiment souterrain. D'autres études montrent une augmentation de la rhizodéposition avec l'âge, cela est essentiellement lié aux différentes composantes de la rhizodéposition considérées par les auteurs

(Jensen, 1996; Wichern *et al.*, 2008; Pausch et Kuzyakov, 2018). La composante d'exsudation est particulièrement plus importante chez les plantes jeunes et la contribution de senescence intervient avec l'âge de la plante (Matsumoto *et al.*, 1979; Saarnio *et al.*, 2004; Arcand *et al.*, 2013). L'exsudation par les racines peut se faire par diffusion passive et faiblement contrôlée par les plantes ou par des processus actifs étroitement contrôlés (Jones *et al.*, 2004; Lesuffleur et Cliquet; 2010). Jílková et al. (2020) expliquent les différences de production d'exsudat racinaires principalement par des différences de biomasse racinaire à un stade précoce de développement. La rhizodéposition est essentiellement localisée sur les 25 premiers centimètres du sol (Zang *et al.* 2018 ; Peixoto *et al.*, 2020). Wang et al. (2020) ont observé chez l'arachide et le haricot que la rhizodéposition en N exprimée par unité de biomasse racinaire est 3,5 fois plus importante dans l'horizon supérieure du sol entre 0 et 20 cm (couche arable).

La disponibilité en nutriment impacte également la rhizodéposition, Luo et al. (2019) démontrent une augmentation du C issu de la rhizodéposition (C organique du sol) avec une augmentation de la fertilisation N. Cette augmentation serait lié à une plus forte production de biomasse racinaire et une plus forte exsudation (Baptist *et al.*, 2015; Kaštovská *et al.*, 2017). Preece et Peñuelas (2016) confirment ce lien entre la biomasse végétale et la quantité totale de rhizodépôts. La rhizodéposition peut également être impactée par la concentration du CO_2. En effet, certaines études montrent une augmentation de la rhizodéposition du C et de l'N pour des plantes soumises à des concentrations élevées de CO_2 (De Graaff *et al.*, 2007; Jílková *et al.*, 2020). D'autres facteurs importants entrent également en jeu, notamment la texture du sol, le pH, la salinité et l'humidité (Nguyen, 2003; Jones *et al.*, 2004).

L'étude de la rhizodéposition est ainsi hautement influencée par différents facteurs et en premier lieu l'espèce et les conditions expérimentales. En plus de la diversité des espèces végétales, les communautés microbiennes participent également dans la complexité des flux C et N car elles sont consommatrices directes des rhizodépots et leur diversité est affectée par la rhizodéposition (Nguyen, 2003; Tian *et al.*, 2020). Une meilleure connaissance de la dynamique du C et N est donc essentielle.

5. Méthodologies d'étude de la rhizodéposition

Deux approches sont actuellement utilisées pour étudier les échanges de C entre l'atmosphère et le sol. Les approches micrométéorologiques permettent de quantifier ces échanges à l'échelle globale alors que les approches isotopiques seules permettent de s'intéresser plus précisément aux processus impliqués (Riederer *et al.*, 2015). Les quantités de

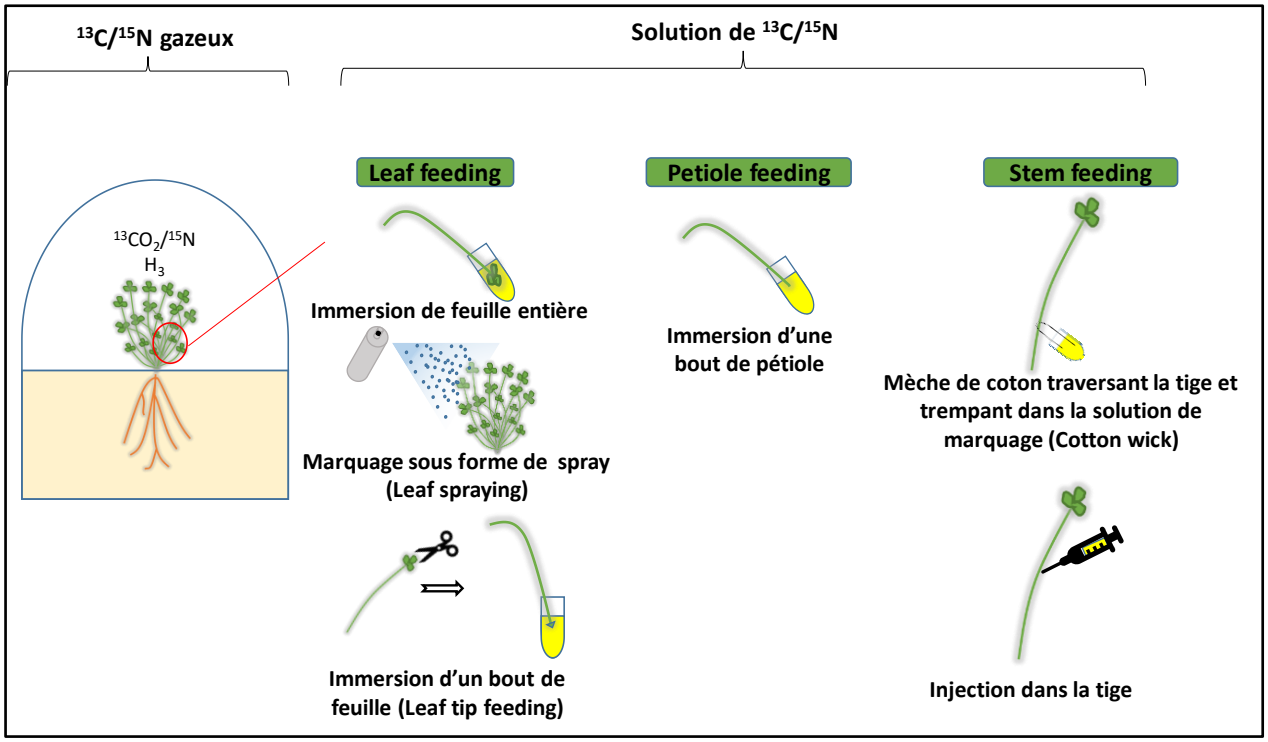


Figure 18 : Méthodes de marquage isotopique (^{13}C et ^{15}N) des plantes dans le compartiment aérien.

C et de N issues de la rhizodéposition sont estimées en utilisant des approches de marquages isotopiques (Kuzyakov et Schneckenberger, 2004; Wichern *et al.*, 2008; Chalk *et al.*, 2014).

5.1. Analyses quantitatives de la rhizodéposition du C

Les études quantitatives de la rhizodéposition du C portent sur des travaux en conditions contrôlées (expérimentation en serre) ou en plein champs en utilisant différents isotopes dont le ^{14}C radioactif (Jensen, 1993; Domanski *et al.*, 2001; Rasmussen *et al.*, 2019) et le ^{13}C comme isotope stable (Kuzyakov et Schneckenberger, 2004; Zang *et al.*, 2018). L'apport de C marqué est réalisé le plus souvent sous forme gazeuse (Hütsch *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2017) ou solide (sel de carbonate ou de bicarbonate) en particulier dans les études de terrain (Pausch *et al.*, 2013). Par exemple, Yasmin *et al*. (2010) pour marquer des plantes de pois chiche utilisent un mélange d'acide lactique et de bicarbonate de sodium ($NaH^{13}CO_3$), ce mélange provoque une émission de $^{13}CO_2$ dans l'atmosphère de la plante. L'apport de CO_2 marqué est en générale bien adaptée pour les études en conditions contrôlées et difficile à mettre en œuvre en champs. L'apport de l'isotope peut se faire également sous forme liquide, notamment par l'immersion d'un organe aérien dans la solution marquée, le plus souvent sous forme de glucose **(Figure 18)** (Wichern *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2015; Hupe *et al.*, 2016).

5.2. Analyses quantitatives de la rhizodéposition de l'N

Les approches permettant de quantifier la rhizodéposition de l'N sont particulièrement diversifiées. Un certain nombre de méthodologies ont été développées pour les plantes fixatrices ou non d'N atmosphérique. Comme pour le C, le marquage N peut se faire au niveau de la partie aérienne sous forme gazeuse avec le $^{15}NH_3$ (Janzen et Bruinsma, 1989; Bazot *et al.*, 2008) ou sous forme de solution. Différentes approches sont utilisées pour cela (**Figure 18**) :

- *Leaf feeding* avec différentes variantes, cette méthode se fait par le marquage d'une feuille entière (Ledgard *et al.*, 1985; Pirhofer-Walzl *et al.*, 2012), d'une partie des feuilles « *leaf tip feeding* » (Palta *et al.*, 1991) ou encore par application du marquage à la surface des feuilles en spray et par brossage « *leaf spraying* et *leaf brushing* » (Sierra *et al.*, 2007; Wichern *et al.*, 2008).
- *Petiole feeding via* une immersion de petiole dans la solution de marquage (Khan *et al.*, 2002*b*; Yasmin *et al.*, 2006)
- *Stem feeding* où le marquage est apporté au niveau de la tige notamment avec la technique du « *Cotton Wick* » qui est basé sur le passage d'une mèche de coton à travers un trou dans la tige et dont les deux extrémités trempent dans la solution de marquage (Russell et Fillery, 1996; Mahieu *et al.*, 2009; Zang *et al.*, 2015). Une autre approche

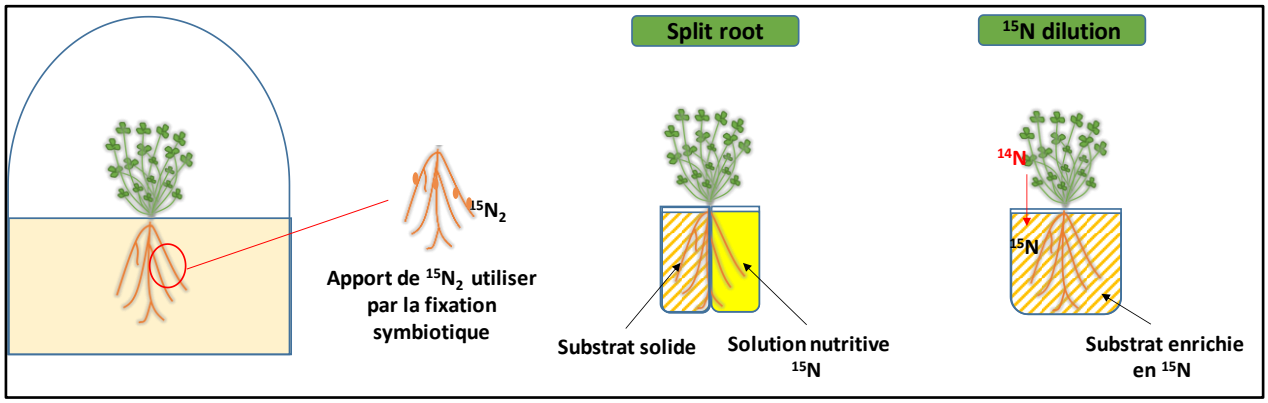


Figure 19 : Méthodes de marquage isotopique (^{15}N) des plantes dans le compartiment souterrain.

- par « *stem injection* » permet d'injecter une solution marquée dans la tige avec une micro seringue (Götz et Herzog, 2000).

L'apport de ^{15}N peut être sous forme d'urée, d'ammonium ou de nitrate (Khan *et al.*, 2002; Wichern *et al.*, 2008; Fustec *et al.*, 2010; Chalk *et al.*, 2014).

Ces différentes possibilités d'apporter du marquage sur les organes aériens offrent de bonnes opportunités expérimentales en raison de la grande diversité morphologique rencontrée chez les végétaux. Cependant, il est difficile de comparer plusieurs espèces en même temps car la réussite d'un marquage passe par une bonne assimilation et une distribution homogène dans les tissus suivant les relations source – puit (Turgeon, 1989; Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2018). Avec les différentes méthodes de marquage en solution, la distribution du marquage peut être affectée par une pénétration variable de la solution dans les organes aériens. Yasmin *et al.* (2006) ont comparé les méthodes de marquage aérien en solution « *leaf*, petiole et stem *feeding* » chez le pois chiche et trouvent une meilleure assimilation du marquage par le « *leaf feeding* ». Cependant, le « *petiole feeding* ». semble permettre d'obtenir le marquage le plus homogène de la plante. Mahieu *et al.* (2009) démontrent que le marquage avec un simple pulse surestime la rhizodéposition. Gasser *et al.* (2015) font la même observation en utilisant l'approche par « *leaf feeding* ». Inversement, l'approche par marquage continu permettrait d'avoir un enrichissement plus homogène des tissus végétaux (Rasmussen, 2011). Il faut également noter que ces marquages sont souvent appliqués sur des périodes courtes et variables car l'application de ces solutions à une certaine concentration peut être toxique pour la plante (Goyal et Huffaker, 1984).

D'autres approches permettant de quantifier plus spécifiquement la rhizodéposition de l'N atmosphérique par les plantes fixatrices de cette source. L'utilisation de marquage atmosphérique permet de limiter les problèmes liés à l'absorption de l'isotope et de relier la rhizodéposition à la fixation biologique de l'N (**Figure 19**). Une des approches consiste à exposer des nodules au $^{15}N_2$ et permet de mesurer la contribution du N_2 fixé au pool d'N rhizosphérique (McNeill *et al.*, 1994; Russelle *et al.*, 1994; Lesuffleur *et al*., 2013). Cette technique est également utilisée pour estimer le transfert de N d'une culture de légumineuse associée à une autre plante (Chalk *et al*., 2014). Elle n'est pas applicable sur une période longue en raison des fortes quantités d'N marqué nécessaires et de leur coût.

Dans une autre approche dite par dilution isotopique (Poth *et al.*, 1986; Khan *et al.*, 2002*b*), le ^{15}N est apporté au compartiment souterrain. Dans ce cas, la rhizodéposition est quantifiée par dilution du ^{15}N apporté dans le substrat par l'N atmosphérique issu de la fixation et non marqué. Cette approche peut être appliquée sur un cycle de culture complet pour estimer la

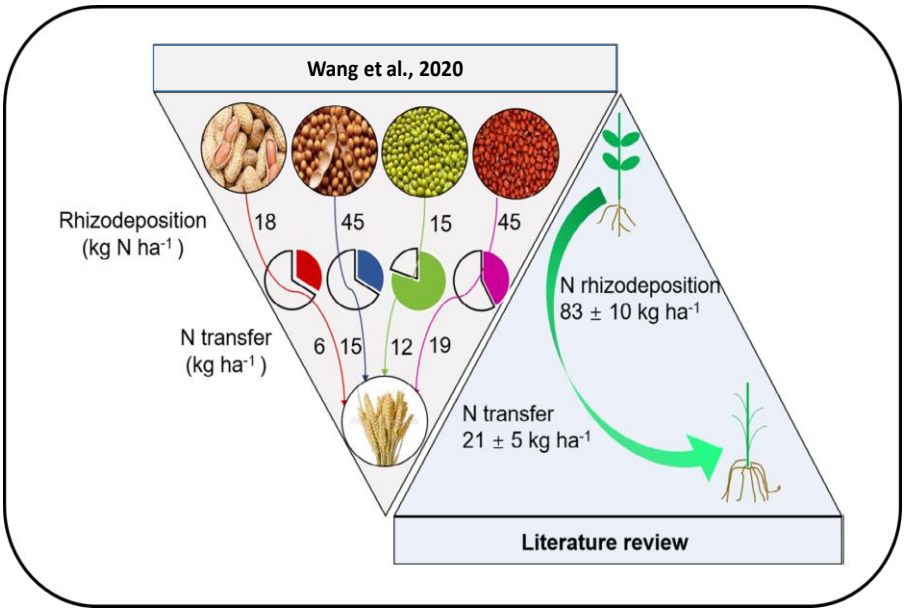


Figure 20 : Rhizodéposition de l'azote chez les Fabacées et son transfert vers des cultures associées (Wang *et al.*, 2020).

Quantités d'azote rhizodéposé (N) sous culture d'arachide, de soja, d'haricot mungo et d'haricot adzuki sans fertilisation, et le transfert de cet azote vers le blé d'hiver suivant (A Gauche). La quantité d'N rhizodéposée des Fabacées (n = 75) et leur transfert aux plantes associées (n = 14) dans le système de rotation selon la littérature (A Droite).

rhizodéposition en N et nécessite d'avoir un marquage homogène dans le sol (Khan *et al.*, 2002*b*). Les racines peuvent également être marquées en utilisant l'approche par « *Split root* », le système racinaire de la plante est divisé deux parties, une partie est immergée dans une solution nutritive enrichie en ^{15}N et une autre partie est dans un substrat solide (Sawatsky et Soper, 1991; Merbach *et al.*, 2000). Cette approche du « Split root » entraine une perturbation du système racinaire et une surestimation de la rhizodéposition (Wichern *et al*., 2008). Certaines études réalisent une pré culture dans une solution enrichie en ^{15}N puis transfert la plante sur un substrat solide (Rroço et Mengel, 2000; Hertenberger et Wanek, 2004) mais cette approche ne permet pas de faire un marquage continu (Wichern *et al.*, 2008). Enfin, certaines études sont basées sur les différences naturelles d'abondance isotopique entre l'N atmosphérique et l'N du sol pour quantifier le transfert d'N des Fabacées vers les espèces compagnes (Louarn *et al.*, 2016).

5.3. Quantification de la rhizodéposition chez les Fabacées

L'étude de la rhizodéposition, notamment la quantification permet de mieux comprendre le flux et la dynamique du C et N entre les plantes et le sol, plus particulièrement chez les Fabacées. De nombreuses études se sont intéressées au flux d'N des Fabacées vers le sol en termes de transfert vers une culture associée (Lesuffleur *et al.*, 2013; Chalk *et al.*, 2014; Louarn *et al.*, 2016; Génard *et al.*, 2016). Dans une prairie multi-espèces constituée de Fabacées comme le trèfle des prés, le trèfle blanc et la luzerne, Pirhofer-Walzl *et al.* (2012) ont estimé un transfert d'environ 40 kg N ha^{-1} de ces Fabacées vers les plantes voisines. De même Dhamala *et al.* (2017) estiment un transfert d'environ 15% du N provenant du trèfle des prés vers ses espèces voisines dans une prairie. Une part importante de l'N des Fabacées au sein d'une culture peut donc profiter aux cultures associées ou aux cultures suivantes en rotation en raison de la rhizodéposition et surtout des organes non récoltés. Selon une revue de littérature par Wang *et al.* (2020) les Fabacées rhizodéposent 83 ± 10 kg N ha^{-1} dans le sol dont 21 ± 5 kg N ha^{-1} serait profitable à une culture suivante (**Figure 20**). La présence des Fabacées dans une rotation contribue donc fortement aux besoins azotés des cultures suivantes. Cette contribution est très différente selon les espèces (Guinet *et al.*, 2020 ; Wang et al., 2020), des études portant sur la sélection des Fabacées les plus efficientes et la détermination des facteurs de variations contribueront à la bonne gestion des rotations. En plus de l'N, les Fabacées rhizodéposent, comme toutes les plantes, également du C contribuant à la séquestration du C dans le sol.

Par rapport à la rhizodéposition de l'N, moins de travaux ont été consacrés à l'étude de la rhizodéposition en C. Mieux quantifier la part de C rhizodéposé par les Fabacées est également important afin de déterminer si les espèces les plus efficientes pour la rhizodéposition N sont

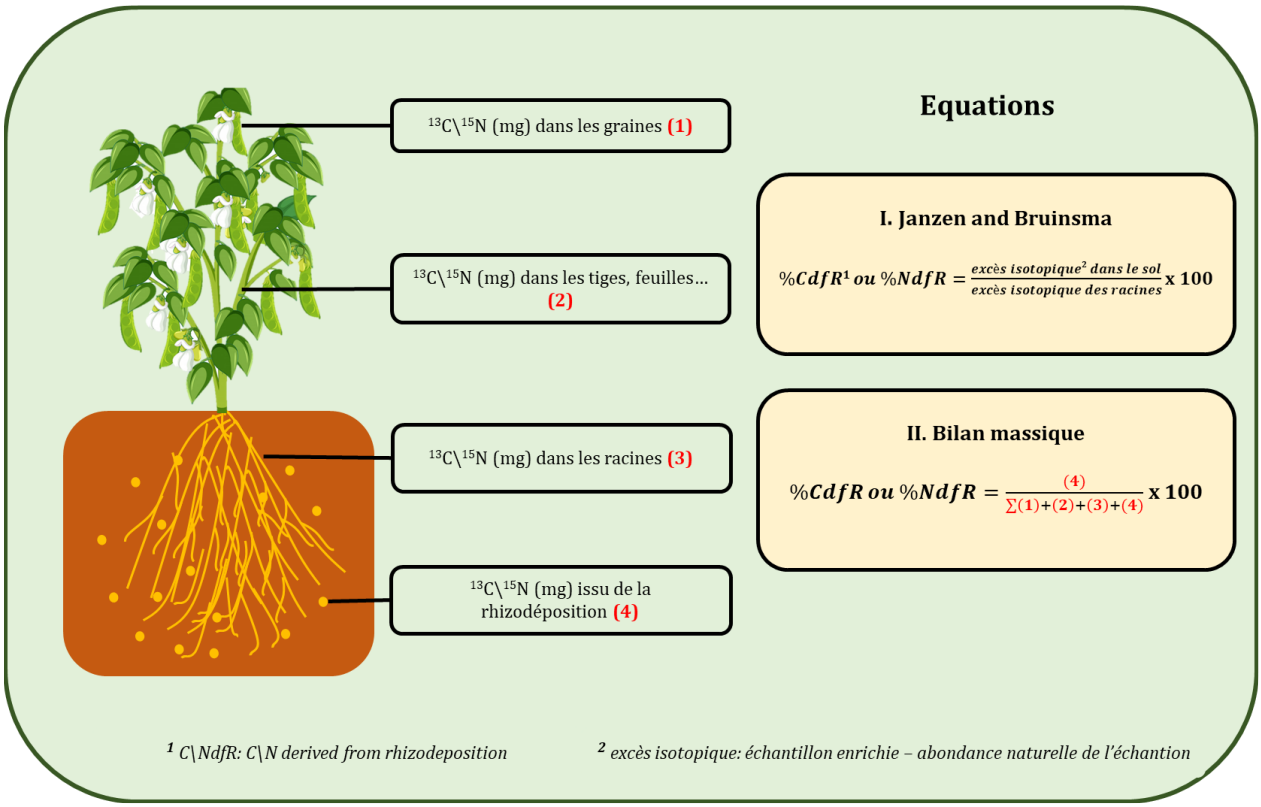


Figure 21 : les différentes méthodes de calcul de la rhizodéposition (d'après Hupe, 2016).

celles qui rhizodéposent le plus de C. Certaines études montrent une variation simultanée de la rhizodéposition C et N chez les Fabacées. Parmi ces études, Wichern *et al.* (2007) réalisent un double marquage $^{13}C/^{15}N$ en utilisant la méthode « *Cotton wick* » sur le pois et l'avoine afin d'estimer la rhizodéposition des 2 éléments. À maturité 36% de N et 30% de C de la plante sont rhizodéposés chez le pois. Certaines études montrent une variation différente de la rhizodéposition de ces 2 éléments en fonction du stade de développement. Zang *et al.* (2015) montrent une augmentation de la proportion de C et N rhizodéposés entre le début de la formation des gousses et le stade de maturité chez le haricot mungo. A l'inverse Hupe *et al.* (2019) indiquent que les quantités de rhizodéposition C et N ne changent pas entre la floraison et la maturité sous une culture de pois.

De nombreuses études traitent la quantification de la rhizodéposition des plantes en générale et chez les Fabacées avec différentes méthodes et des résultats différents sont observés. Ces différences sont notamment liées au fait que la rhizodéposition repose sur une large gamme de composantes comprenant l'exsudation racinaire et la senescence de fragment racinaire. La définition pris en compte en fonction des études génère ainsi des divergences dans les résultats et les espèces utilisées contribuent, elles aussi dans les différences observées.

5.4. Méthodes de calcul

Différentes méthodes de calcul sont utilisées pour estimer le C et N du sol provenant de la rhizodéposition à partir d'un marquage des organes aériens. La majorité des études se sont inspirées d'une même méthode de calcul développée par Janzen et Bruinsma (1989) (**Figure 21**). Cette méthode n'est applicable qu'en cas de marquage homogène et constant des racines et des rhizodépots pour éviter une sur ou sous-estimation dû à la dilution ou la redistribution du marquage. Les pourcentages de C et N issus de la rhizodéposition sont calculés comme suite :

$$\%CdfR \text{ ou } \%NdfR = \frac{Excès\ isotopique\ du\ sol\ (\%)}{Excès\ isotopique\ des\ racines\ (\%)} x\ 100$$

où $excès\ isotopique\ =\ Atom\ \%\ ^{15}N\ /\ ^{13}C\ de\ l'échantillon - l'abondance\ naturelle\ ^{15}N\ /\ ^{13}C$ et %CdfR / %NdfR = %C/N issu de la Rhizodeposition. La quantité totale de C/N rhizodéposée est obtenue en multipliant la quantité totale de N ou C dans le sol par le %CdfR / %NdfR obtenu. En raison de la distribution des nutriments et des relations source-puit pendant le développement d'une plante, l'homogénéité du marquage entre les différents compartiments est difficilement atteinte, ce qui constitue un biais pour l'approche Janzen et Bruinsma (Rasmussen, 2011). Par exemple l'azote est fortement relocalisé pendant le développement

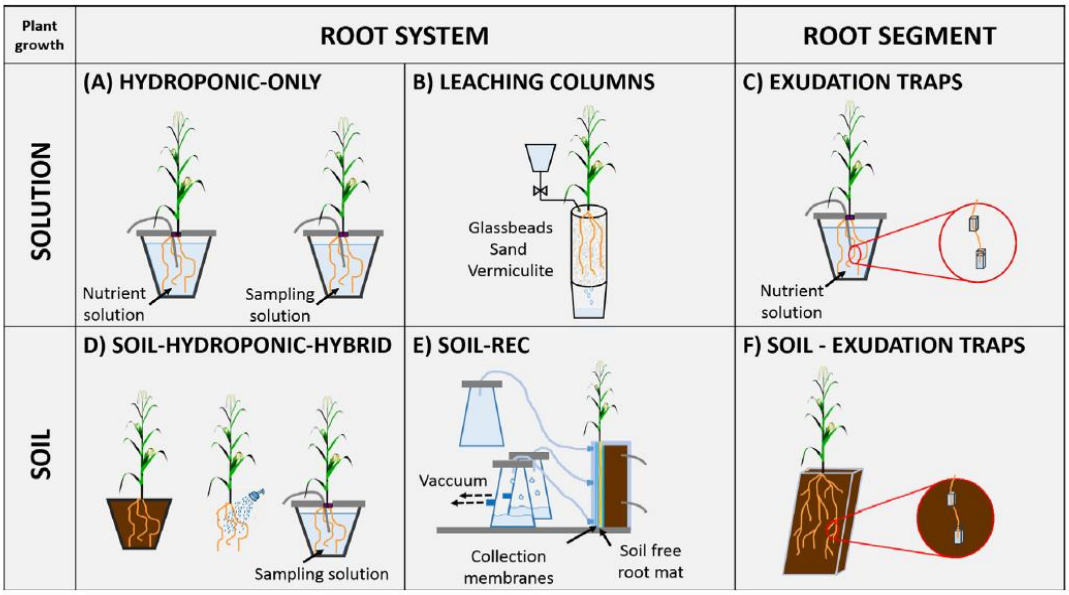


Figure 22 : Les différentes approches de collecte des exsudats racinaires (Oburger *et al.*,2018).
Ces méthodes permettent la collecte des taux d'exsudation bruts (c'est-à-dire non modifiés par les interactions de la matrice du sol et la décomposition microbienne) à partir de systèmes racinaires entiers ou de segments racinaires. Les conceptions expérimentales sont séparées en fonction des conditions de croissance de la plante (hydroponie ou culture sur sol).

d'une plante, Schiltz *et al.* (2005) ont montré que plus de 11% du N des graines de pois proviennent des racines. Ainsi la redistribution du marquage peut induire une surestimation de la rhizodéposition.

Une autre méthode de calcul permet d'éviter les biais liés à une distribution non homogène du marquage, il s'agit de la méthode par bilan massique (**Figure 21**). Cette méthode inclue la distribution du marquage dans la plante entière et la redistribution du marquage des racines vers les graines ne pourrait pas influencer ce calcul (Khan *et al.*, 2002*b*; Pausch *et al.*, 2013; Hupe *et al.*, 2016). Les %CdfR et %NdfR sont déterminés en proportion du C/N total (plant + sol) :

$$\%CdfR\ ou\ \%NdfR = \frac{^{13}C\ ou\ ^{15}N\ du\ sol\ (mg)}{\sum {}^{13}C ou\ ^{15}N\ de\ tous\ les\ compartiments\ (mg)} x\ 100$$

Hupe *et al.* (2016) comparent ces deux méthodes dans leur étude et montrent une surestimation de la quantité de rhizodéposition avec la méthode Janzen et Bruinsma (1989).

Une autre méthode de calcul à partir d'un marquage du sol (dilution isotopique) réalisée uniquement pour l'estimation de l'apport en N d'origine atmosphérique sous une culture de Fabacée. Les pourcentages de l'accumulation totale de N dans les tissus végétaux et le sol d'une culture de légumineuse provenant de la fixation de N_2 (%Ndfa) sont calculés en utilisant les proportions de ^{15}N de la légumineuse et d'une plante référence non fixatrice du N_2 (Shearer et Kohl, 1986 ; Khan et al., 2002). La part de N du sol provenant de la fixation (%Ndfa soil) est calculé comme suite :

$$\%Ndfa_{sol} = \frac{(Excès\ isotopique\ ^{15}N\ plante\ référence - Excès\ isotopique\ ^{15}N\ \ Fabacées)}{(Excès\%\ \ d'atome^{15}N\ plante\ référence)}$$

Où l'excès isotopique ^{15}N est déterminé à partir de l'abondance naturel dans le sol. Le %Ndfa sol est ensuite ramené à la quantité totale de N du sol.

5.5. Analyses qualitatives

L'analyse qualitative de la rhizodéposition concerne l'étude de la composition moléculaire des rhizodépots (notamment les exsudats racinaires). Les principaux composés retrouvés dans les rhizodépots sont (1) les sucres et les polysaccharides (2) les acides aminés (3) acides organiques (4) les acides gras (6) les hormones (7) les enzymes (8) les ions (Uren, 2001; Nguyen, 2003). Différentes approches de collecte des exsudats racinaires sont utilisées (**Figure 22**). Une grande partie des études sur la composition des exsudats ont été réalisées en culture hydroponique évitant les contraintes liées à l'absorption des exsudats par les particules du sol

et leur consommation par les microorganismes (Oburger et Jones, 2018). La culture est faite dans un premier temps dans une solution nutritive pour la croissance des plantes puis elles sont transférées dans une autre solution afin de collecter les exsudats (Marschner *et al.*, 1987; Strehmel *et al.*, 2014). D'autres études collectent les exsudats de manière localisé avec immersion de zones racinaires spécifiques dans la solution de collecte (Delhaize *et al.*, 1993; Gaume *et al.*, 2001). Cependant, l'approche hydroponique est loin des conditions réelles de culture des plantes notamment par rapport à l'architecture racinaire et les conditions contrôlées. D'autres études sont réalisées en condition semi-hydroponique afin d'apporter la contrainte mécanique subit par les racines dans un substrat solide (**Figure 22B**). Les plantes sont cultivées dans un système de percolation où la partie supérieure des racines sont en contact avec un substrat solide (sable ou vermiculite) et la solution de cette partie est récupérée en dessous dans un récipient (Hodge *et al.*, 1997; Oburger et Jones, 2018). Cependant, la récupération complète des exsudats n'est pas certaine avec cette approche en raison d'une absorption possible par le substrat utilisé et il est n'est pas possible d'échantillonner dans une zone racinaire spécifique (Oburger et Jones, 2018). Une des approches utilisées pour collecter les exsudats à partir d'un segment de racine est la méthode « *exudation trap* » en hydroponie ou sur substrat solide, cette méthode consiste à piéger un segment de racine dans un anneau en résine (**Figure 22C et F**).
Pour se rapprocher des conditions réalistes de culture, certaines études utilisent le sol comme substrat puis transfèrent les plantes après lavage des racines dans une solution de collecte (Canarini *et al.*, 2016). Une autre approche dite « *soil-rec* » est utilisée par culture en rhizobox couplé à un outil de collecte d'exsudat racinaire (**Figure 22E**). Cette configuration permet le rinçage continu d'un tapis racinaire qui est physiquement séparé du sol par une membrane perméable et qui permet l'échange de soluté (Oburger et Jones, 2018). Par conséquent, les exsudats non modifiés par les processus de sorption du sol peuvent être collectés de manière non destructive et répétée (Wenzel *et al.*, 2001; Oburger *et al.*, 2013). Mais cette approche est aussi dans des conditions de croissance semi-naturelles. L'étude de composition des exsudats est donc très complexe avec de nombreuses méthodes abordées de manière à se rapprocher le plus possible des conditions réelles de culture. L'analyse de la composition chimique peut être ciblée et non ciblée en fonction des objectifs de l'étude et les molécules sont souvent analysées par approches de chromatographie (Knee *et al.*, 2001; Dundek *et al.*, 2014; Bowsher *et al.*, 2015; Oburger et Jones, 2018).

6. Rhizodéposition et médiation des processus rhizosphériques

La rhizosphère constitue une zone de sol très complexe et dynamique à la fois dans le temps et dans l'espace, elle est façonnée en permanence par l'interaction entre la plante, le sol et les

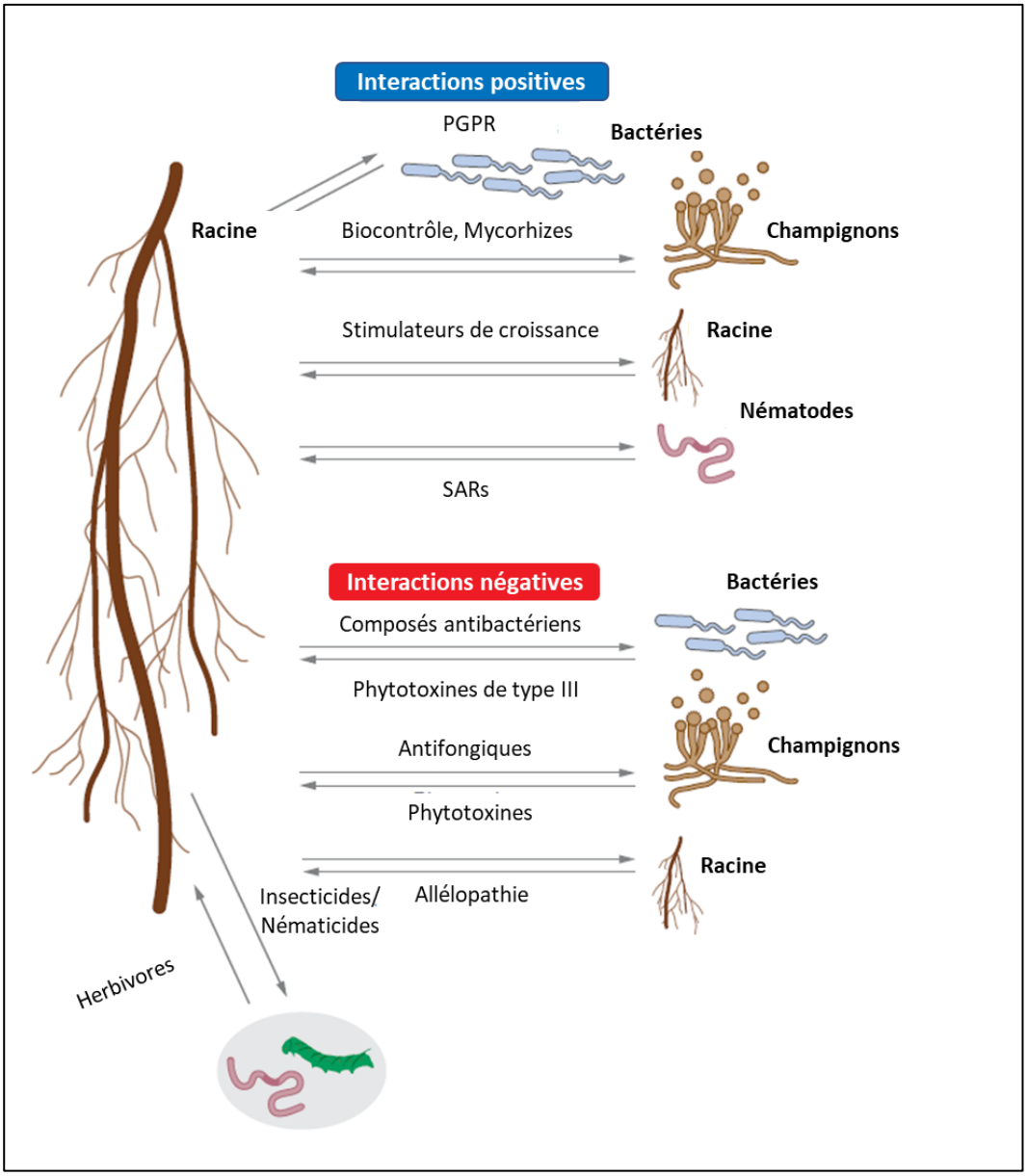


Figure 23 : Interactions rhizosphériques médiées par les exsudats racinaires (d'après Bais *et al.*,2006).

Les interactions rhizosphériques médiées par les racines (les interactions positives et négatives). Les interactions positives impliquent des interactions médiées par l'exsudat racinaire avec les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR). Les interactions négatives médiées par les exsudats racinaires impliquent la sécrétion d'antimicrobiens, de phytotoxines, de composés nématicides et insecticides. Les flèches indiquent un échange chimique. VAM : vesicular arbuscular mycorrhizas ; SAR : systemic acquired resistance.

micro-organismes (Mimmo *et al.*, 2018). Les rhizodépots sont connus pour être impliqués dans de nombreuses d'interactions dans le sol et peuvent remplir différentes fonctions dans l'écologie du sol (Bais *et al.*, 2006; Berendsen *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2020). La composante principale de la rhizodéposition intervenant dans les processus rhizosphériques est l'exsudation racinaire, qui dépend de l'espèce végétale, des caractéristiques du sol et des conditions environnementales (Jones *et al.*, 2004; Mimmo *et al.*, 2011; Vives-Peris *et al.*, 2020). La littérature rapporte le rôle de cette exsudation racinaire dans le recrutement et le façonnage du microbiome rhizosphérique. En effet, la proportion de bactéries cultivables est entre 2 – 7% dans un sol rhizosphérique comparativement à un sol nu où cette proportion serait <1% (Zelenev *et al.*, 2005). D'ailleurs, un apport exogène de glucose et de mucilage dans un sol nu engendre une augmentation du nombre de microorganismes actifs dans le sol (Benizri *et al.*, 2007).

6.1. Interactions biologiques dans le sol et dynamiques des nutriments

En stimulant les processus rhizosphériques, les plantes induisent des interactions favorables à leur développement (Yadav *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2017; Schirawski et Perlin, 2018). Ainsi, les symbioses fixatrices du N_2 et les mycorhizes sont mises en place grâce à un dialogue moléculaire entre les plantes et les bactéries ou champignons du sol (**Figure 23**). Les bactéries dites PGPR (Plant Growth Promoting Bactéria) se développent grâce à des nutriments abondants dans la rhizosphère et certaines de ces rhizobactéries procurent des avantages à la plante, entraînant une stimulation de la croissance des plantes (Nelson, 2004; Ashrafuzzaman *et al.*, 2009; Basu *et al.*, 2021). D'autres effets positifs des relations plantes-microorganismes permettent une augmentation de la tolérance au stress biotique et abiotique (Ha-Tran *et al.*, 2021). Cette tolérance passe notamment par une protection des plantes *via* des biofilms protecteurs ou des antibiotiques agissant comme des agents de biocontrôle et par dégradation de composés toxiques pour la plante. La rhizosphère est également le siège d'interactions négatives, certains microorganismes sont notamment parasites ou pathogènes des plantes et produisent des phytotoxines néfastes pour la plante (Schirawski et Perlin, 2018). A leur tour, les plantes peuvent se défendre contre les microorganismes pathogènes grâce aux exsudats racinaires (Baetz et Martinoia, 2014; Baetz, 2016).

Les exsudats racinaires jouent également un rôle essentiel dans la disponibilité des nutriments dans le sol notamment à travers les activités enzymatiques et la modification des propriétés chimiques du sol. La gamme large de composés exsudés par les plantes, ont une grande influence sur les caractéristiques de la rhizosphère en favorisant la mobilisation des nutriments par acidification, réduction / complexation et / ou d'échange de ligands

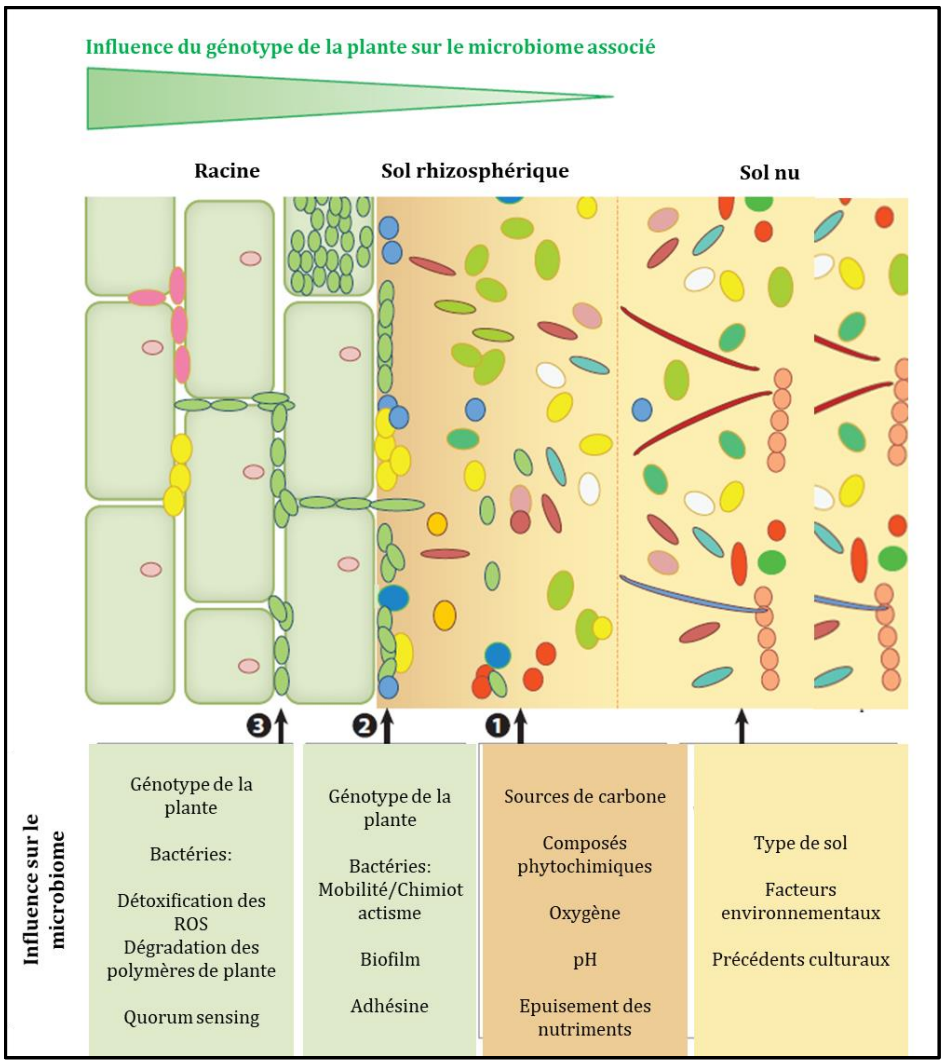


Figure 24 : Colonisation des différents micro habitats rhizosphériques par les microorganismes (d'après Reinhold-Hurek *et al.*,2015).

Dans le sol nu, les communautés microbiennes dépendent du type de sol, des facteurs environnementaux. (1) Début de la zone d'influence racinaire (ectorhizosphère) sur la composition de la communauté microbienne. (2) Une communauté plus spécialisée s'enrichit sur le rhizoplan sous l'influence de facteurs spécifiques du génotype végétal. (3) L'endorhizosphère, des traits bactériens spécifiques sont nécessaires pour pénétrer et s'établir à l'intérieur de ce compartiment. Abréviations : ROS, espèces réactives de l'oxygène.

(Terzano *et al.*, 2015; Mimmo *et al.*, 2018). Certains exsudats racinaires appelés phytosiderophores interviennent comme des chélateurs métalliques dans la rhizosphère et peuvent augmenter la disponibilité des micronutriments métalliques du sol, notamment le fer, le manganèse et le zinc (Cakmak *et al.*, 1998; Dakora et Phillips, 2002; Garnica *et al.*, 2018). Les acides organiques peuvent également agir comme chélateurs de métaux dans la rhizosphère et ont un impact important sur la disponibilité du phosphore (P) dans le sol (Bais *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2020; Wang et Lambers, 2020). En effet, le lupin blanc est particulièrement efficace dans la mobilisation du P grâce à des modifications à la fois morphologiques et physiologiques (i) il a d'une part, des racines en forme de brosse dites « *protéoides* » qui augmentent le volume du sol exploré et (ii) d'autre part, il a la capacité de libérer des composés organiques (acides organiques, flavonoïdes) et protons favorisant ainsi cette action de mobilisation du P (Keerthisinghe *et al.*, 1998; Tomasi *et al.*, 2008; Mimmo *et al.*, 2018). L'étude de l'ensemble de ces processus rhizosphériques implique de considérer leur variabilité spatiale et temporelle pour une meilleure compréhension de ces interactions, qui sont au cœur de la régulation des cycles biogéochimiques dans le sol (Comby *et al.*, 2016; Faucon, 2020; Moroenyane *et al.*, 2021).

6.2. Activités et structure des communautés microbiennes

Les rhizodépots constituent des apports direct d'élément organique dans le sol et contribuent à la régulation de la décomposition de cette matière organique du sol par le biais de processus rhizosphériques (Kuzyakov, 2010; Dijkstra *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014). Ces apports stimulent la croissance microbienne dans la rhizosphère, entraînant ainsi la production d'enzymes extracellulaires par rapport à un sol nu (Kuzyakov, 2010; Zhu et Cheng, 2011; Shahzad *et al*., 2015; Zhu *et al*., 2018). Ce phénomène d'apport en éléments organiques est connu sous le nom d'effet « priming » de la rhizosphère (Jones *et al.*, 2004; Cheng, 2009), qui dépend étroitement de la quantité et la qualité des éléments rhizodéposés. Lynch et Whipps, (1991) classent les différents micro-habitats dans la rhizosphère de la manière suivante : (i) endorhizosphère (l'endoderme et les couches corticales à l'intérieure de la racine) (ii) rhizoplan (la surface de la racine avec une couche de polysaccharide (mucilage) et (iii) ectorhizosphère (particules de sol au-delà de la surface des racines et qui sont en contact avec les rhizodépots. Reinhold-Hurek *et al.* (2015) présentent un modèle de colonisation racinaire en plusieurs étapes du sol nu vers l'endorhizosphère (**Figure 24**). Ces auteurs expliquent que dans le sol nu, la composition des communautés microbiennes est influencée par les caractéristiques du sol et le précédent cultural. Tandis qu'au niveau de l'ectorhizosphère la communauté microbienne est influencée par les racines grâces aux exsudats. Plus les microorganismes sont proches des

racines, plus la communauté microbienne est spécifique à l'espèce. Au niveau du rhizoplan, les microorganismes sont dans un complexe polysaccharidique (mucilage) alors que dans l'endorhizosphère, les microorganismes pénètrent à l'intérieur et colonisent la racine (selon des échanges de signaux et des traits microbiens spécifiques). Le modèle présenté dans la **Figure 24** illustre bien les facteurs explicatifs de la diversité des communautés microbiennes retrouvées dans les différents micro-habitas rhizosphériques.

La variabilité des exsudats racinaires selon les espèces peut ainsi se traduire par une composition différente des communautés microbiennes (Bakker *et al.*, 2013). Steinauer *et al.* (2016) en appliquant différents mélanges d'exsudats synthétiques sur un sol, ont démontré des changements importants dans la composition des microorganismes. Ces auteurs précisent aussi que les exsudats riches en C favorisent davantage la biomasse microbienne du sol comparativement aux cocktails d'exsudats riches en N. Haichar *et al.* (2008) démontrent que les rhizosphères de blé, de maïs, de colza et de luzerne abritent différentes communautés bactériennes en lien avec l'assimilation des exsudats racinaires. Cette différence de communautés microbiennes entre les sols rhizosphériques se traduit par une différence dans les activités microbiennes. En effet, Siczek *et al.* (2018) montrent des activités enzymatiques supérieures et une diversité métabolique des microorganismes plus importante dans la rhizosphère de la féverole par rapport à celle du blé. La présence de la symbiose fixatrice avec les rhizobia influence également ces activités, puisqu'il a été démontré qu'un sol sous féverole ne présentant pas de symbiose fixatrice a des niveaux d'activités enzymatiques plus faibles par rapport à un sol sous féverole nodulée (Siczek et Lipiec, 2016). Par ailleurs, l'effet spécifique de certains acides organiques et de sucre dans les exsudats a également été démontré. Guyonnet *et al. (*2017) ont montré que le taux de dénitrification est nettement plus important dans la rhizosphère de certaines cultures (fétuque, brome et de dactyle) comparativement au sol nu. Ils précisent que ces différences de taux de dénitrification sont positivement corrélées à la production d'acide succinique et butanoique et négativement corrélées la présence de xylose. Ces modifications des activités de dénitrification passent par une stimulation des microorganismes (bactéries et champignons) *via* les exsudats racinaires des plantes. Ainsi, Guyonnet *et al.* (2018) utilisent l'exsudation comme trait fonctionnel associé à la stratégie d'acquisition de ressources des plantes. Les plantes à stratégie exploitative, caractérisées par une forte croissance et des tissus riches en nutriment exsuderaient beaucoup plus de composés par rapport aux plantes à stratégie conservatives, caractérisées par une croissance plus lente et des faibles besoins en nutriments (Garnier et Navas, 2012; Faucon, 2020).

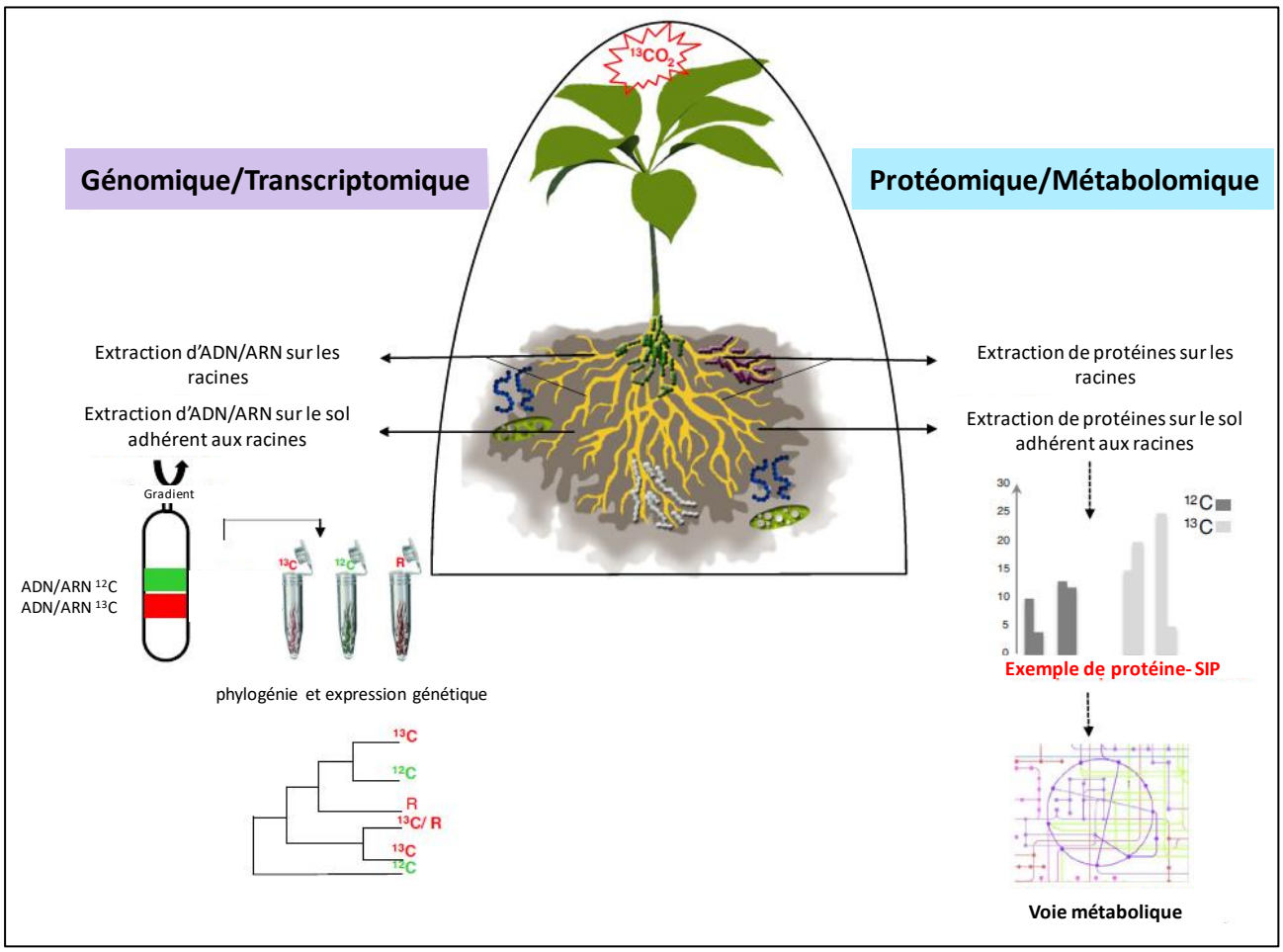


Figure 25 : Combinaison des approches SIP et « omiques » pour analyser la structure, la diversité et la fonction des communautés microbiennes actives de la rhizosphère (d'après Haichar *et al.*,2016).

La plante est marquée sous une atmosphère enrichie en $^{13}CO_2$. L'ADN et / ou l'ARN totaux sont extraits du système racinaire et du sol adhérant aux racines (RAS). Les acides nucléiques du RAS sont séparés par centrifugation en gradient de densité pour obtenir des fractions ^{13}C-ADN / ARN et ^{12}C-ADN / ARN. Afin d'analyser la structure, la diversité et la fonction des communautés microbiennes actives, des gènes de fonction peuvent être ciblés, suivis d'une analyse phylogénétique. Le Protein-SIP est réalisée pour identifier et quantifier les protéines exprimées par les communautés microbiennes actives.

L'ensemble de ces études montre que la composition des exsudats racinaires qui varie quantitativement et qualitativement entre les espèces de plantes, a un effet majeur sur les activités et la diversité des communautés microbiennes du sol (Bürgmann *et al.*, 2005; Broeckling *et al.*, 2008; Haichar *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2017). Ces résultats expliquent en partie les différences observées dans la composition des communautés microbiennes et leur activités sous diffèrent couverts végétaux (Marschner *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2011; Rousk et Bengtson, 2014).

6.3. Etude de la diversité des communautés microbiennes

Les plantes interagissent avec les microorganismes principalement au niveau de leur racines (Bais *et al.*, 2006; Bonkowski *et al.*, 2009; Bakker *et al.*, 2013). En effet, les racines recrutent le cortège microbien rhizosphérique et en retour ces communautés microbiennes impactent la croissance de ces plantes. Si les communautés microbiennes recrutées ont un rôle majeur dans la nutrition et la santé des plantes (Smith *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014; Ha-Tran *et al.*, 2021), la compréhension de la boucle de rétroaction entre plantes et microorganismes dans la rhizosphère, reste à approfondir. Il s'agit ici d'étudier la structure des communautés microbiennes activement impliquées dans l'assimilation des exsudats racinaires, déterminants majeurs dans le façonnage du microbiome rhizosphérique (Haichar *et al.*, 2016). Il existe un panel de méthode permettant de faire le lien direct entre les exsudats des plantes et les microorganismes de la rhizosphère, seules les approches basées sur le marquage isotopique et notamment les techniques SIP (Stable Isotope Probing) seront abordées. Ces approches sont basées sur l'étude de l'incorporation d'isotopes stables exsudés par les plantes et incorporés dans les composés microbiens tels que les bases nucléiques ou les acides gras (Dumont and Murrell, 2005; Bernard *et al.*, 2007; Haichar *et al.*, 2012; Guyonnet *et al.*, 2018*b*; Achouak *et al.*, 2019). L'usage des acides gras (PLFA-SIP) dans l'études de la structure des communautés microbiennes rhizosphériques offre une grande sensibilité (1% d'incorporation du marquage) mais le manque de résolution taxonomique ne permet souvent pas l'attribution phylogénétique avec une précision suffisante (Haichar *et al.*, 2016). Concernant les acides nucléiques (ADN/ARN) (**Figure 25**), leur utilisation comme biomarqueurs permet d'identifier une gamme de microorganismes plus large avec un plus grand degré de confiance (Dumont and Murrell, 2005; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007). Cette approche avec les acides nucléiques notamment l'ADN (DNA-SIP) a également été utilisée pour analyser les microorganismes intervenant dans la dégradation des résidus de culture (Lee *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2020). En raison de son marquage rapide par rapport à l'ADN, l'usage de l'ARN (RNA-SIP) permet une analyse à court terme de l'assimilation des sources carbonés des exsudats racinaires (Gkarmiri *et al.*, 2017). La

technique dite ARN-SIP permet ainsi d'identifier les consommateurs primaires représentés par les microorganismes à croissances rapides avant l'incorporation du marquage par les consommateurs secondaires constituée par les microorganismes à croissance lente (Dumont et Murrell, 2005; Haichar *et al.*, 2016).

De nouvelles approches SIP permettent également d'analyser plus spécifiquement des microorganismes métaboliquement actifs notamment *via* l'analyse de l'ARN messager et des protéines (**Figure 25**) (Haichar *et al.*, 2012; Oburger et Schmidt, 2016). Les données protéomiques issues de la méthode « Protein-SIP », fournissent des informations physiologiques qui ne sont pas incluses dans les approches DNA/RNA -SIP (Jehmlich *et al.*, 2016). Ce constat met en avant la complémentarité des deux approches DNA/RNA-SIP et « Protein-SIP » dans valuation des communautés microbiennes rhizosphériques et notamment pour avancer dans la compréhension des relations structure/fonctions de ces communautés microbiennes.

Les approches SIP pourraient aider à mieux discriminer les communautés microbiennes impliquées dans les interactions plantes/microorganismes en lien avec les exsudats racinaires et identifier des fonctions spécifiques par la quantification des gènes fonctionnels en lien par exemple avec le cycle de l'azote. La combinaison des approches SIP avec des approches omiques (transcriptomique – protéomique - métabolomique) permettrait d'aller encore plus loin dans la compréhension des mécanismes des associations plantes-microorganismes par l'identification notamment des métabolites intervenant dans ces associations plantes/microorganismes (Haichar *et al.*, 2016).

Chapitre III :

Hypothèses et démarche scientifique

I. Enjeux globaux

Dans un contexte de transition agroécologique, l'enjeu est de pouvoir maintenir ou augmenter la production tout en limitant l'empreinte environnementale de l'activité agricole (Altieri, 2002; Thénard *et al.*, 2014). Les externalités positives d'un certain nombre de pratiques agricoles permettent aujourd'hui d'envisager la construction et le développement de systèmes de culture durables et performants d'un point de vue agronomique, écologique et sociétal pour répondre aux exigences règlementaires et aux attentes des consommateurs (Plénet et Simon, 2015; Altieri, 2018). L'usage accru des Fabacées répond aux principes de cette agriculture durable et contribue au renforcement des services écosystémiques et la durabilité des systèmes de cultures (Schneider et Huyghe, 2015). Les différentes démarches nationales mises en œuvre pour stimuler et faciliter la transition des systèmes de production agricole offre un contexte favorable au développement des cultures de Fabacées (Duc *et al.*, 2010; Schaller, 2012). En effet, ces dernières années, la France vise à développer sa production de protéine végétale avec le plan protéine végétale pour la France 2014 – 2020 qui a été prolongé en 2021 et 2022, s'inscrit dans cette démarche. L'objectif est d'accroitre la proportion de protéines végétales provenant des Fabacées pour l'alimentation humaine et animale et de renforcer l'autonomie fourragère pour l'élevage.

L'intérêt agronomique des Fabacées est connu depuis plus de 2000 ans (Chorley, 1981; Pointereau, 2001). En effet, grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, en association avec les bactéries rhizobiacées, les Fabacées enrichissent le sol en azote et constituent une alternative intéressante à l'utilisation d'engrais chimique (Fustec *et al.*, 2010; Voisin *et al.*, 2017). 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 les cultures suivantes (Wichern *et al.*, 2008; Fustec *et al.*, 2010; Guinet, 2019; Rezgui *et al.*, 2020). Toutefois, les quantités d'azote apportées *via* les Fabacées sont encore sous-estimées en raison d'une prise en compte partielle des parties racinaires et de la rhizodéposition (Jensen, 1996*b*; Carlsson and Huss-Danell, 2003; Crews and Peoples, 2005). Alors que les mécanismes impliqués dans la fixation de l'azote atmosphérique sont étudiés depuis de nombreuses années (Mylona *et al.*, 1995; Varin *et al.*, 2010), ceux qui pilotent la rhizodéposition sont beaucoup moins connus, or cette rhizodéposition a un impact majeur sur la dynamique des éléments nutritifs, les activités et la diversité des communautés microbiennes du sol. Les communautés microbiennes sont fortement influencées par les caractéristiques du sol, les pratiques agricoles et par la

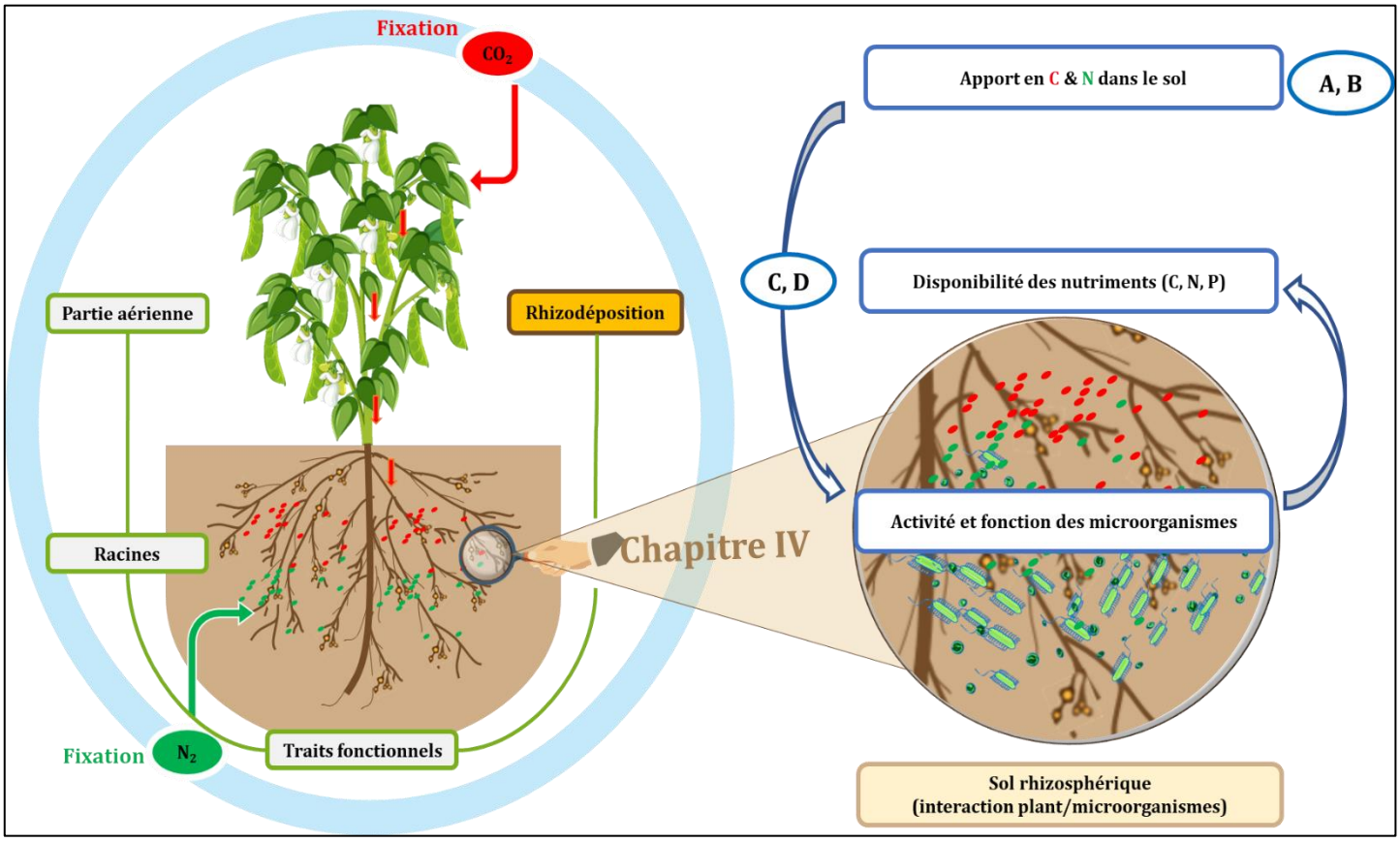


Figure 26 : Schéma conceptuel qui synthétise les objectifs de la thèse.
*La plante par ses caractéristiques fonctionnelles et sa capacité de rhizodéposition, influence la zone du sol en contact direct avec les racines (rhizosphère). Dans la rhizosphère les apports en C et N constituent des sources de nutriments et d'énergie pour les microorganismes qui à leur tour jouent un rôle essentiel dans la disponibilité des nutriments. Le chapitre III qui présente les questions, les hypothèses ainsi que les objectifs de cette thèse, présentera les différentes expérimentations en lien avec les points : (**A** et **B**) pour la quantification des apports en C et N via la rhizodéposition et les facteurs de déterminisme de cette rhizodéposition ; (**C**) l'influence de la rhizodéposition sur les activités microbiennes en lien avec la disponibilités des nutriments (C, N, P) et (**D**) l'identification des microorganismes impliqués dans la rhizodéposition et le lien avec les activités enzymatiques du sol.*

présence des plantes *via* la rhizodéposition (Gkarmiri *et al.*, 2017; Crecchio *et al.*, 2018). En effet, les zones du sol sous l'influence des racines, appelées rhizosphère, offrent des micro-habitats pour les communautés microbiennes du sol et présentent une composition microbienne différente par rapport à un sol nu (Bais *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2020). De plus, cette rhizosphère, qui est au cœur des échanges entre les plantes et les microorganismes, diffère en fonction des rhizodépots des espèces végétales. Ces différences vont engendrer des modifications de la diversité et des activités du microbiome rhizosphérique.

II. Objectifs de la thèse et hypothèses de travail

Les références sur les intérêts agronomiques et écologiques des Fabacées restent largement lacunaires, notamment *vis-à-vis* de l'impact de la rhizodéposition sur l'état du sol (Mahieu, 2008). Les interactions plantes/microorganismes qui découlent de ce processus entrainent des bénéfices réciproques aux protagonistes (Mylona *et al.*, 1995; Bais *et al.*, 2006) mais la compréhension des mécanismes demeure limitée. Dans ce contexte, les objectifs de la thèse sont les suivants (**Figure 26**) :

1) Mettre en œuvre une méthode qui permette de mesurer et comparer sur un même échantillonnage la rhizodéposition du carbone et de l'azote d'origines atmosphériques par différentes Fabacées protéagineuses [pois et féverole, cultures Fabacées prédominantes en région Normandie (Duquesne et Dalstein, 2016)] et fourragères [trèfle blanc et trèfle incarnat, connues pour leur capacités de rhizodéposition (Lesuffleur *et al.*, 2013; Génard *et al.*, 2016)]. Il s'agira également d'étudier les facteurs de déterminisme de cette rhizodéposition.

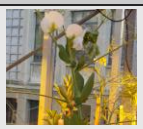
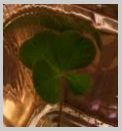
2) Etudier l'impact de cette rhizodéposition sur la diversité et les activités des communautés microbiennes des sols et en retour l'impact des changements dans ces communautés sur la croissance des plantes, afin d'avancer dans la compréhension de la boucle de rétroaction des interactions Fabacées /microorganismes

3) Comprendre les conséquences des interactions plantes / microorganismes sur la dynamique du carbone, de l'azote et du phosphore dans les sols.

Les hypothèses qui sous-tendent ce travail sont les suivantes :

1- La rhizodéposition du C augmente proportionnellement avec la rhizodéposition de l'N, c'est-à-dire que les plantes qui ont de fortes capacités de rhizodéposition du C ont également de fortes capacités de rhizodéposition de l'N.

Tableau 2 : Caractéristiques des espèces végétales étudiées

Légumineuses (Fabacées)			
Espèces	Système racinaire	Usages	
Pois *Pisum sativum L.*	Pivotant	Protéagineux (alimentation humaine et animale) 13200 ha en Normandie Terre inovia 2020	
Fèverole *Vicia faba L.*		Protéagineux (alimentation humaine et animale) 4710 ha en Normandie Terre inovia 2020	
Trèfle blanc *Trifolium repens L.*	Fasciculé	Fourragères (alimentation animale)	
Trèfle incarnat *Trifolium incarnatum L.*		Fourragères/couvert végétal (alimentation animale et plantes de services)	
Poacées			
Blé *Triticum aestivum L.*	Fasciculé	Céréales (alimentation humaine et animale) 467 015 ha en Normandie Agreste 2020	

2- Les traits fonctionnels des plantes, en particulier les traits racinaires et les traits liés à l'acquisition des nutriments, constituent de bons indicateurs de la capacité de rhizodéposition des plantes.

3- La capacité de rhizodéposition du C et de l'N des espèces de Fabacées peut avoir un impact sur la réponse des activités enzymatiques et la limitation des microorganismes du sol en éléments C, N et P.

4- La rhizodéposition du C et de l'N différentielles entre les espèces de Fabacées aurait pour conséquence des modifications dans la diversité des communautés microbiennes impliquées activement dans la dégradation des exsudats racinaires.

III. Démarche expérimentale

1. Choix des espèces végétales

Pour tester les hypothèses présentées ci-dessus, les travaux de cette thèse ont été conduits en conditions semi-contrôlées en serre et en chambre phytotronique lorsque cela était nécessaire. Les espèces végétales concernées par ce travail correspondent à différentes espèces de Fabacées qui présentent des intérêts certains pour la région Normandie et dont les caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 2**. Il s'agit de deux espèces de protéagineux, le pois (*Pisum sativum L. cv* Glauris) dont la surface de culture a été estimée en 2020 à 13200 ha dans la région Normandie et la féverole (*Vicia faba L.cv* Fanfare) avec une surface de culture estimée à 4710 ha. Ces protéagineux constituent une source importante de protéines végétales pour l'alimentation animale et humaine. Les deux autres espèces de plante correspondent à des Fabacées fourragères, le trèfle blanc (*Trifolium repens L.cv* RD84) utilisé en pâturage notamment en association avec le ray gras anglais et le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum L.*) utilisé souvent comme culture intermédiaire. A ce panel de Fabacées, le blé (*Triticum aestivum L.*) qui appartient à la famille des Poacées est également étudié. Cette espèce a été utilisée comme indicatrice de l'abondance en ^{15}N du sol car elle ne fixe pas l'N atmosphérique. Cette abondance est nécessaire au calcul de la proportion d'N atmosphérique fixée par les plantes fixatrices. Nous avons également utilisé le blé par comparaison aux Fabacées pour la rhizodéposition du C.

2. Quantification de la rhizodéposition du C et de l'N par double marquage $^{13}C/^{15}N$ et évaluation des facteurs de déterminismes de cette rhizodéposition

Des approches de marquages isotopiques (^{15}N et ^{13}C) ont été utilisées afin de déterminer les apports C et N dans le sol en fonction des espèces étudiées. L'estimation de la rhizodéposition en C a été réalisée grâce à un marquage des plantes sous une atmosphère enrichie en $^{13}CO_2$ (en chambre phytotronique de marquage). Les plantes étaient introduites dans cette chambre de

Figure 27 : Illustrations des dispositifs expérimentaux de culture en serre et dans la chambre phytotronique. *Photos prises lors des expérimentations*

marquage une fois par semaine tout au long de leur croissance jusqu'à la récolte qui avait lieu avant la floraison (stade végétatif) ou lorsque 50% des feuilles étaient sénescentes (stade reproducteur). L'objectif était de mesurer la rhizodéposition non pas sur une courte période mais tout au long du cycle de croissance. L'estimation de la rhizodéposition de l'N quant à elle, a nécessité différentes expérimentations afin de mettre au point la méthode de marquage isotopique répondant aux mieux aux objectifs de la thèse. Pour ce faire deux techniques de marquage ont été testées. Il s'agit du marquage par « ^{15}N Shoot labeling » qui consiste à marquer les parties aériennes des plantes avec une solution d'urée enrichie en ^{15}N. La seconde méthode est le marquage par dilution isotopique, cette méthode a nécessité l'utilisation d'un sol préalablement enrichi en ^{15}N ($^{15}NH_4NO_3$). Les résultats obtenus par les deux méthodes de marquage ont permis de sélectionner l'approche de dilution isotopique pour la suite des travaux de thèse. L'analyse comparatives de ces deux méthodes est détaillée dans le **Chapitre IV. A.**

La première expérimentation avait pour objectif de quantifier la rhizodéposition du C et de l'N et d'évaluer certains facteurs de déterminismes de cette rhizodéposition. Cette expérimentation était conçue pour quantifier sur un cycle de culture entier les apports de C et N d'origine atmosphérique dans le sol. Le dispositif expérimental a été mis en place en serre (**Figure 27**) et s'est appuyé sur un sol limoneux provenant d'une parcelle de grande culture (maïs) en Seine et Marne (France).

Pour estimer la rhizodéposition du C des différentes cultures, les plantes ont été introduites une journée par semaine dans une chambre de croissance pour un marquage $^{13}CO_2$ pendant 24 heures dans des conditions identiques à celles de la serre. La fixation du N_2 et la rhizodéposition en N ont été mesurées avec la méthode de dilution isotopique du ^{15}N du sol par le ^{14}N atmosphérique. Cette méthode permet d'estimer les proportions d'N issues du sol (riche en ^{15}N) et de l'atmosphère (pauvre en ^{15}N). Elle est plus souvent utilisée pour des plantes cultivées en hydroponie que sur sol car l'hétérogénéité de l'enrichissement en ^{15}N des différentes fractions du sol peut entraîner des biais dans les calculs. C'est pourquoi nous avons utilisé pour cette approche un sol issu d'une expérimentation de 2013 ou 4 mg de N par kg de sol avaient été ajoutés sous forme de solution de $^{15}NH_4{}^{15}NO_3$ avec un excès isotopique de 99.7%. Sur la base des travaux de Giller *et al.* (1991), du saccharose a été incorporé plusieurs semaines avant le début de l'expérience (~12 semaines dans cette étude) afin de stimuler l'incorporation de ^{15}N sous forme organique par les communautés microbiennes du sol et donc d'obtenir un sol homogène en ^{15}N. La fraction minérale du sol a été extraite avec une solution KCl 1M pour estimer l'enrichissement en ^{15}N de l'azote soluble disponible pour la croissance des plantes au

Tableau 3 : Composition en sels de la solution nutritive Hoagland sans N

Sels	Masse molaire ($g.ml^{-1}$)	Concentration finale (mM)
$Ca(NO_3)_2$, 4 H_2O	236.1	**0**
KNO_3	101.1	**0**
KH_2PO_4	136.1	**0.25**
$MgSO_4$	246.37	**0.5**
EDTA, NaFe, 3 H_2O	421	**0.2**
$CaCl_2$, 2 H_2O	147.02	**1.25**
K_2SO_4	174.259	**0.625**
Oligoéléments		
	Masse molaire	**[conc finale] µM**
H_3BO_3	61.83	14
$MnSO_4$, H_2O	169.01	5
$ZnSO_4$, 7 H_2O	287.5	3
$CuSO_4$, 5 H_2O	249.68	0.7
Na_2MoO_4 2 H_20	241.95	0.7
$CoCl_2$	237.93	0.1

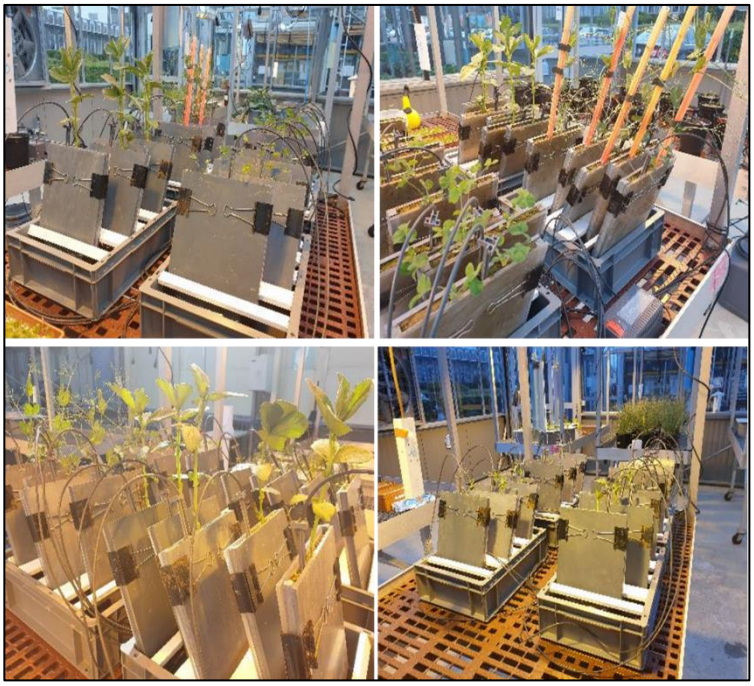


Figure 28 : Illustration des expérimentations de cultures menées en serre en rhizotron, *Photos prises lors des expérimentations*

début de l'expérience et l'enrichissement en ^{15}N de la fraction organique. Les enrichissements isotopiques des différents compartiments (tissus végétaux et sol) ont été déterminés grâce à un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) de la plateforme PLATIN (Plateau d'Isotopie de Normandie). Aussi, différents traits fonctionnels des plantes ont également été mesurés.

L'estimation des quantités d'N issues de la fixation symbiotique a nécessité la mise en place d'une autre expérimentation visant à déterminer pour chaque espèce la discrimination isotopique contre le ^{15}N ayant lieu lors de la fixation du N atmosphérique (Peoples *et al.*, 2015). Cette culture a été réalisée sur un mélange de substrat de sable et de vermiculite (50:50). Les plantes ont été inoculées avec leurs rhizobia spécifiques et arrosées automatiquement avec une solution nutritive Hoagland ¼ modifiée sans N (**Tableau 3**). Les résultats de ces travaux feront l'objet du **Chapitre IV. B.**

3. Etude de l'exsudation du C et des acides organiques en relation avec l'architecture racinaire et la disponibilité du P dans le sol

Cette expérimentation a été réalisée dans l'objectif de déterminer le lien entre l'exsudation racinaire du C, l'architecture racinaire et les teneurs dans les principaux composés phosphorés du sol. Pour cela, les différentes Fabacées ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment (présentées dans la partie 2) dans des rhizotrons jusqu'au stade végétatif uniquement (**Figure 28**). Le sol utilisé est celui d'une grande culture (lin) de la commune de Saint-Georges sur fontaine (Seine maritime, France). Un marquage $^{13}CO_2$ a été réalisé dans la chambre phytotronique 24h avant la récolte. Les tissus végétaux ont été collectés et différents traits fonctionnels des plantes ont été mesurés. Les racines ont été échantillonnées en vue d'une analyse de la morphologie racinaire (WinRhizo) et des mesures isotopiques (%C, ^{13}C). Des échantillons de sol homogènes sont collectés pour les mesures isotopiques, des dosages d'acides organiques et de composés phosphorés par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Ces travaux seront présentés dans le **Chapitre IV. C.**

4. Rhizodéposition du C, activités enzymatiques et dynamique des éléments nutritifs dans le sol

L'objectif de cette expérimentation était d'étudier le déterminisme des activités enzymatiques et la dynamique des éléments nutritif C, N et P dans le sol sous différents couverts de Fabacées. Le dispositif expérimental mis en place était similaire à celui de l'étude de la rhizodéposition du C et de l'N en double marquage présenté dans la partie 2. En plus des mesures des traits fonctionnels des tissus végétaux et des analyses IRMS (%C et ^{13}C sur plante

Figure 29 : Illustration des dispositifs expérimentaux de culture des plantes et de marquage isotopique au $^{13}CO_2$ en phytotron. *Photos prises lors des expérimentations*

et sol), les taux de C, N total, de P Olsen et un panel d'activités enzymatiques ont également été réalisées sur les échantillons de sol.

Les activités enzymatiques mesurées dans cette étude sont impliquées dans les différents cycles biogéochimiques *via* la dégradation de composés organiques avec différents niveaux de complexité. Les activités mesurées sont : l'activité β-glucosidase (BG ; EC : 3.2.1.21) Pour le cycle C, les activités N-acétyl-glucosaminidase (NAG ; EC : 3.2.1.30) et arylamidase (ARYLN ; EC : 3.5.1.5) pour le cycle N, les phosphatases totales (PHO ; EC 3.1.4.1), les phosphatases acides et alcalines (ACP ; EC 3.1.3.2 et AKP ; EC 3.1.3.1) Pour le cycle P. Ces activités ont été mesurées par spectrophotométrie en microplaques suivant un protocole miniaturisé (ISO 20130:2018 ; Cheviron *et al.*, 2021). Afin de relier la réponse de ces activités enzymatiques aux besoins en ressources des microorganismes, la stœchiométrie enzymatique a été étudiée par l'analyse des ratios des activités enzymatiques impliquées dans les différents cycles biogéochimiques (Hill *et al.*, 2012). Deux autres indices décrits par Moorhead *et al.* (2013) ont également été étudiés. L'ensemble de ces indices illustrent les limitations métaboliques microbiennes en énergie C et nutriments N par rapport au P sur la base des ratios des activités enzymatiques. Ces travaux seront présentés dans le **Chapitre IV. D.**

5. Evaluation de la diversité du microbiome rhizosphérique et racinaire

L'objectif de cette expérimentation était d'étudier la diversité des microorganismes de la rhizosphère capable d'utiliser les exsudats racinaires issues des différentes plantes et de caractériser en parallèle le microbiome associé aux racines des plantes. La démarche expérimentale de cette étude était une combinaison d'approches de marquage isotopique (Cliquet *et al.*, 1990, Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007) et de biologie moléculaire par la technique du DNA- SIP (DNA stable isotope probing) (Haichar *et al.*, 2008, Guyonnet *et al.*, 2018, Achouack *et al.*, 2019). En effet, cette technique permet la distinction, entre l'ADN provenant des microorganismes impliqués activement dans l'utilisation des exsudats racinaires et celui des microorganismes non impliqués ou dormants (Radajewski *et al.*, 2000). Le DNA-SIP offre ainsi la possibilité d'étudier par la suite la diversité de ces communautés par le séquençage à haut débit par métabarcoding. Pour cela, trois espèces ont été utilisées dans cette expérimentation, il s'agissait de la féverole, du trèfle incarnat et du blé. Ces plantes ont été cultivées en serre, puis introduites dans la chambre de marquage sous une atmosphère enrichie en ^{13}C (mélange de CO_2 contenant 50% de ^{13}C) (**Figure 29**). Des récoltes sont réalisées après3, 6 et 10 jours de marquage. Des mesures de traits fonctionnels sont réalisées sur les tissus végétaux, et des échantillons de racines ainsi que de sol rhizosphérique ont été collectés et leur contenu en ADN a été extrait. Les ADNs extraits des racines ont été traités comme représentatif

des communautés microbiennes actives à l'intérieur et à la surface des racines (Bressan *et al.*, 2009). Les extraits d'ADNs du sol ont été par la suite soumis à une ultracentrifugation sur un gradient de chlorure de césium (CsCl) pendant 72h. Cette étape a consisté à créer un gradient de densité continu pour séparer les molécules d'ADN marquées au ^{13}C de celles non marquées. Pour pouvoir identifier avec précision les fractions marquées de celles non marquées, des mises au point ont été réalisées avec deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) cultivées en présence ou non de marquage ^{13}C. Ces travaux seront présentés dans le **Chapitre IV. E.**

Chapitre IV :

Résultats

Chapitre IV A :

Approches méthodologiques pour l'estimation de l'azote du sol provenant de la rhizodéposition chez différente espèce de Fabacées.

Les travaux de ce chapitre ont en partie été réalisés lors du stage de M1 de Biologie-Agrosciences de l'université de Caen de Théophile Modena (2018-2019) que j'ai co-encadré avec Jean-Bernard Cliquet.

Préambule

Les différentes méthodes de marquage isotopiques recensées dans la littérature offrent un large panel d'opportunités expérimentales afin d'estimer le flux d'azote dans un contexte d'utilisation des Fabacées pour leur potentiel d'enrichissement du sol en azote *via* la rhizodéposition. Dans cette étude, deux approches de marquage isotopiques ont été comparées afin de déterminer la méthode la mieux adaptée pour comparer des Fabacées ayant des morphologies différentes. Il s'agit du marquage des feuilles avec de l'urée marquée ^{15}N et de la méthode de dilution isotopique du ^{15}N du sol par l'azote atmosphérique.

Principaux résultats

- Les deux approches de marquage testées permettent de mesurer l'azote provenant de la rhizodéposition, mais présentent toutes les deux certaines limites.

- Le marquage des feuilles est fortement dépendant de la capacité d'absorption du ^{15}N par l'organe marqué et sa distribution dans la plante. L'application à long terme de la solution de marquage par les feuilles provoque également la nécrose des tissus marqués.

- L'approche par dilution isotopique permet de mesurer l'azote issu de la fixation de N_2. Elle permet également un apport du marquage ^{15}N : (i) proche entre des espèces différentes et (ii) applicable sur une longue période. Cependant, cette méthode est fortement dépendante de l'homogénéité du marquage dans le sol. En cas de répartition hétérogène du ^{15}N dans le sol, cette hétérogénéité doit être prise en compte dans l'estimation de la rhizodéposition de l'N

- L'utilisation de la méthode de dilution isotopique est mieux adaptée pour l'estimation et l'analyse comparative de la rhizodéposition de l'N chez plusieurs espèces de Fabacées.

1. Introduction

Les fertilisants azotés contribuent à la pollution de l'eau et de l'air en particulier en raison du lessivage du nitrate et de la production d'un très puissant gaz à effet de serre, le N_2O. C'est pourquoi l'utilisation des Fabacées connaît un intérêt croissant en agriculture et on les utilise de plus en plus dans les rotations, en culture intermédiaire, dans les mélanges prairiaux ou encore en culture associée (Høgh-Jensen, 2006; Fustec *et al.,* 2010; Chalk *et al.,* 2014; Génard *et al.,* 2016). Les Fabacées enrichissent le sol en N par la rhizodéposition et constituent une alternative intéressante à l'utilisation d'engrais chimiques (Fustec *et al.,* 2010). La rhizodéposition est un processus impliqué dans le fonctionnement du sol et la nutrition des plantes, constitue un apport essentiel de C et d'N dans le sol et représente une source importante d'énergie pour les microorganismes du sol (Hütsch *et al.,* 2002; Paterson *et al.,* 2007). En raison de l'importance de la rhizodéposition, de nombreuses études ont porté sur la caractérisation qualitative et quantitative des composés libérés par ce processus et leur impact sur les flux de C et N dans le sol (Jones *et al.,* 2004; Dennis *et al.,* 2010; Hupe *et al.,* 2016). L'estimation de la rhizodéposition contribue à l'amélioration des connaissances sur le potentiel de séquestration de C des plantes et sur le bilan N des cultures pour une utilisation en rotation, en culture intermédiaire ou en culture associée (Mayer *et al.,* 2003; Guinet *et al.,* 2019; Rezgui *et al.,* 2020).

La rhizodéposition de l'N par les plantes peut être quantifiée à l'aide de techniques de marquage isotopique qui permettent de différencier l'N dérivé des plantes de celui du sol. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour mesurer la quantité d'N dérivé de la rhizodéposition par marquage de substrat de culture (sol), des racines ou des organes aériens (Wichern *et al.,* 2008; Fustec *et al.,* 2010; Chalk et Smith, 2017). La méthode dite « ^{15}N shoot labeling » est basée sur l'immersion des feuilles ou pétioles dans la solution marquée (Palta *et al.,* 1991; Yasmin *et al.,* 2006; Rasmussen *et al.,* 2019) ou l'injection avec une micro-seringue d'une solution enrichie en ^{15}N dans la tige (Götz et Herzog, 2000). Le marquage des organes aériens peut également être réalisé par la méthode de la mèche de coton (cotton-wick) qui est basée sur le passage d'une mèche de coton à travers un trou dans la tige et dont les deux extrémités trempent dans la solution de marquage (Russell et Fillery, 1996; Wichern *et al.,* 2010). Au niveau du compartiment souterrain l'une des méthodes les plus utilisées est la technique de dilution isotopique du ^{15}N où le sol est directement marqué avec une solution de ^{15}N et permet d'estimer la fixation provenant du ^{14}N. Cette technique est également utilisée pour estimer le transfert d'N d'une culture de Fabacée associée à une autre plante (Paynel *et al.,* 2008 ; Chalk *et al.,* 2014). Une autre technique dite « split-root », consiste à diviser le système racinaire de

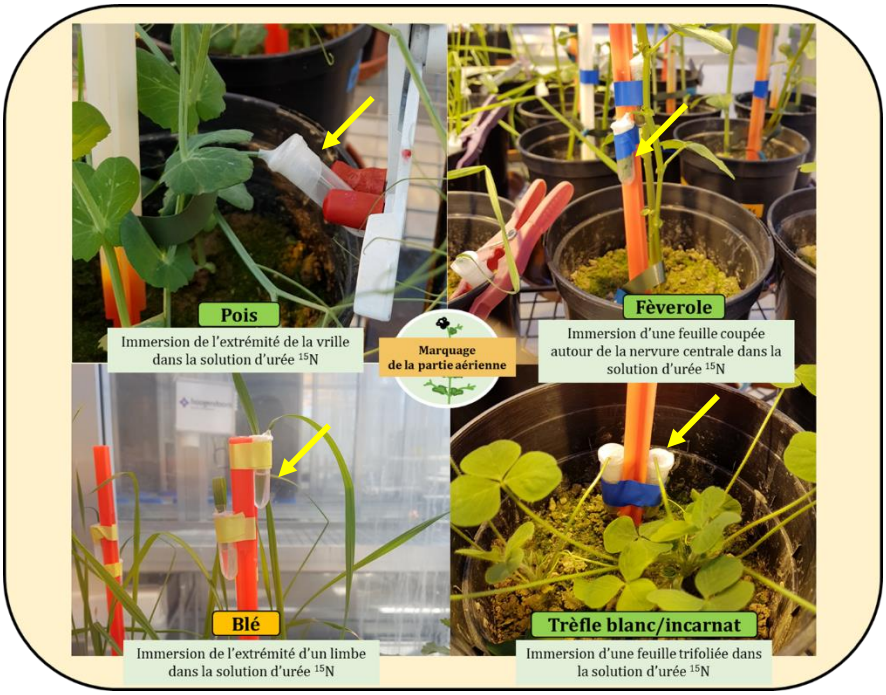


Figure 1 : Présentation de photos pour illustrer l'approche par marquage foliaire réalisé sur le pois, la féverole, les trèfles et le blé. Les tubes Eppendorf sont indiqués par des flèches jaunes.

la plante en deux parties, une partie est immergée dans une solution nutritive enrichie en ^{15}N et l'autre partie dans un substrat solide (Sawatsky et Soper, 1991 ; Merbach *et al.*, 2000). Enfin, il est possible d'exposer les nodules au $^{15}N_2$ et de mesurer la contribution du N_2 fixé au pool d'N rhizosphérique (McNeill *et al.*, 1994 ; Russelle *et al.*, 1994 ; Lesuffleur *et al.*, 2013).

Dans la présente étude, nous nous intéressons à la quantification de la rhizodéposition de l'N en conditions contrôlées chez 4 espèces de Fabacées en utilisant des approches de marquage isotopique au ^{15}N *via* les organes aériens ou le sol. Dans le premier cas, nous avons immergé des feuilles dans de l'urée enrichie en ^{15}N. Dans le second cas, nous avons utilisé un substrat de culture préalablement marqué au ^{15}N (technique de dilution isotopique). L'objectif était de comparer ces deux méthodes isotopiques sur différentes Fabacées afin de mesurer la rhizodéposition de l'N. Nous recherchons en particulier une méthode permettant de comparer des espèces présentant des morphologies et des vitesses de croissance et de développement contrastées.

2. Matériel et méthode

2.1.Espèces végétales

Cette expérimentation a été conduite en utilisant quatre espèces de Fabacées : le pois (*Pisum sativum* L., cv Glauris), la féverole (*Vicia faba* L., cv Fanfare), le trèfle blanc (*Trifolium repens* L., cv RD84), le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.) et une plante de la famille des Poacées : le blé (*Triticum aestivum* L., cv Lennox) utilisée comme référence non-fixatrice de N_2.

2.2. Marquage des parties aériennes

Dans cette expérience, les différentes espèces ont été cultivées en monoculture sur sol et en conditions contrôlées en serre pendant 6 semaines. Les semences ont été mises à germer sur de la perlite pendant 6 à 10 jours selon les espèces puis repiquées dans des pots de 2L. Quatre pots ont été cultivés par espèce dont un pot témoin utilisé pour déterminer l'abondance isotopique naturelle en ^{15}N. Après 4 semaines de croissance en pot, les organes aériens de ces différentes plantes ont été marqués pendant 2 semaines avec une solution d'urée enrichie en ^{15}N (concentration de [0,5 % (poids/volume) (Wichern *et al.*, 2007)] et 99 % atom% ^{15}N). Les organes différaient selon les espèces et ont été marquées par immersion d'une ou plusieurs feuilles dans un tube Eppendorf (2 ml) contenant 1 ml d'urée ^{15}N (**Figure 1**). Pour le pois l'organe marqué était la vrille, l'extrémité de celle-ci a été coupée et immergée dans la solution de marquage. En raison de la largeur des feuilles de la féverole, une coupe a été réalisée autour de la nervure centrale pour faciliter l'insertion dans le tube Eppendorf. Pour les 2 trèfles, une feuille trifoliée est enroulée et immergée dans la solution d'urée. Concernant le blé, le marquage a été réalisé sur l'extrémité d'un limbe coupé. Sur les 2 semaines de marquage, 2 tubes

Eppendorf sont utilisés (1 par semaine) et le deuxième tube a été mis en place sur une autre feuille à la suite du premier.

2.3. Approche par dilution isotopique ^{15}N

Dans cette expérimentation les plantes cultivées et les conditions de culture étaient identiques à la première expérimentation. Cinq pots (1L) par espèces ont été cultivés et dix plantules par espèces ont été collectées au début du repiquage pour déterminer l'abondance naturelle dans les tissus végétaux. Le sol utilisé avait été enrichi en ^{15}N 6 ans auparavant dans le cadre d'une autre expérimentation sous forme de $^{15}NH_4$ $^{15}NO_3$ excès isotopique de 99.7 % pour l'N (10 Kg de $^{15}N.ha^{-1}$). Ce sol avait une abondance isotopique moyenne en ^{15}N de 0.3833 % ($\delta^{15}N$ = 46.57) au début de notre expérimentation. Cette méthode permet de faire une estimation de la rhizodéposition sur la base de la dilution du marquage ^{15}N du sol par le ^{14}N provenant de la fixation du N_2 atmosphérique qui avec une abondance isotopique en ^{15}N de 0.3663 % qui sert de référence pour le $\delta^{15}N$ qui est donc nul.

Des échantillons de sol ont également été utilisés afin d'estimer le contenu en N soluble avec une solution de KCl 1M. Les extraits d'N soluble et le sol restant après extraction sont analysés par IRMS pour estimer la répartition du ^{15}N entre la fraction soluble disponible pour la croissance des plantes et la fraction insoluble. Les delta ^{15}N moyen était de 63.03 pour la fraction soluble et de 40.02 pour la fraction insoluble.

2.4. Récoltes et analyses

Après 6 semaines les plantes sont récoltées et des échantillons homogènes des compartiments aérien et souterrain (racines et sols) sont collectés. Sur ces échantillons, le contenu en ^{15}N a été analysé à l'aide d'un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS). et un bilan massique de l'azote a été réalisé en prenant en compte tous les compartiments :

- ***Approche par marquage foliaire ^{15}N :***

pour chaque compartiment les quantités total d'N et du ^{15}N ont été déterminées selon les équations suivantes :

$$(1)\quad Quantité\ d'N\ (mg) = (Masse\ sèche\ \times\ \%N)\ \div 100$$

$$(2)\quad Quantité\ de\ ^{15}N\ (mg) = (Quantité\ d'N\ (mg)\ \times\ Excès\ isotopique\ ^{15}N)\ \div 100$$

Où l'excès isotopique ^{15}N correspond à la différence d'abondance isotopique (atom%) ^{15}N entre un échantillon et son abondance naturelle.

- ***Dilution isotopique* :**

Le pourcentage de l'accumulation totale d'N dans les Fabacées provenant de la fixation symbiotique du N_2 (%Ndfa) a été calculé en utilisant les teneurs en ^{15}N de la Fabacée (atom%^{15}N Fabacées) et de la plante référence non fixatrice (atom%^{15}N du blé) (Shearer et Kohl, 1986; Khan *et al.*, 2002) :

$$(3)\ \%Ndfa = \frac{(Atom\%\ ^{15}N\ du\ blé\ - Atom\%\ ^{15}N\ de\ la\ Fabacée)}{(Atom\%\ ^{15}N\ du\ blé)}$$

La quantité d'N dérivé de la fixation de N_2 (Ndfa) a ensuite été calculée pour chaque compartiment incluant le sol comme indiqué dans l'équation (4) :

$$(4)\ Ndfa\ (mg) = (\%Ndfa\ \times\ Quantité\ d'N)$$

2.5.Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel R (R Development Core Team, version 3.5.2). Après vérification de la normalité des données (Test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité des variances (Test de Bartlett), les analyses de variance (ANOVAs) ont été appliquées au jeu de données et les comparaisons multiples des moyennes ont été réalisées par le Test de Tukey.

Tableau 1 : Caractéristiques des plantes dans l'approche par marquage foliaire.

Plantes	Biomasse sèche Partie aérienne (g)	Biomasse sèche racines (g)	Shoot:Root ratio	Teneur en N partie aérienne (mg. g^{-1})	Teneur en N Racines (mg. g^{-1})
Blé	0.78 ± 0.27 c	0.43 ± 0.06 b	1.81 ± 0.65 c	9.23 ± 1.18 b	10.10 ± 0.26 c
Fèverole	4.54 ± 0.45 a	2.64 ± 1.25 a	1.94 ± 0.71 c	27.09 ± 1.16 a	26.32 ± 3.72 b
Pois	5.54 ± 0.62 a	0.58 ± 0.02 b	9.54 ± 0.82 a	23.91 ± 0.41 a	36.43 ± 1.72 a
Trèfle blanc	0.78 ± 0.23 c	0.16 ± 0.09 c	5.34 ± 1.45 b	29.43 ± 3.69 a	29.99 ± 2.19 ab
Trèfle incarnat	2.06 ± 0.26 b	0.60 ± 0.09 b	3.44 ± 0.42 bc	27.09± 2.17 a	28.02 ± 5.94 ab
	F= 90.72	*F= 9.52*	*F= 39.71*	*F= 49.83*	*F= 25.09*

Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes (n = 3)

Tableau 2 : Distribution du marquage ^{15}N (excès isotopique ^{15}N) dans les différents compartiments dans l'approche par marquage foliaire.

Plantes	Excès isotopique ^{15}N (%) Partie aérienne	Excès isotopique ^{15}N (%) Racines	Excès isotopique ^{15}N (%) Sol
Blé	1.61 ± 0.16 c	0.91 ± 0.16 c	0.0163 ± 0.0113 b
Fèverole	3.29 ± 0.17 b	1.50 ± 0.24 b	0.0361 ± 0.0038 a
Pois	3.77 ± 0.22 ab	0.43 ± 0.03 d	0.0292 ± 0.0035 a
Trèfle blanc	4.17 ± 0.57 a	2.19 ± 0.30 a	0.0298 ± 0.0022 a
Trèfle incarnat	3.53 ± 0.15 b	1.64 ± 0.35 b	0.0372 ± 0.0076 a
	F = 57.13	*F = 43.67*	*F = 7.85*

Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes (n = 3)

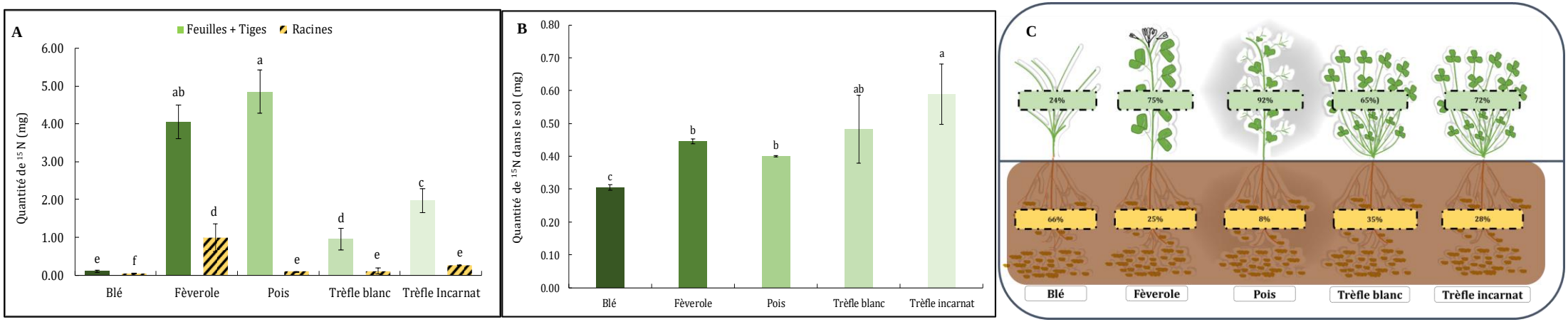


Figure 2 : Bilan massique du ^{15}N (mg) avec l'approche par marquage foliaire dans (A) les compartiments aérien (feuille + tiges) et souterrain (racines) ; (B) quantité de ^{15}N dans le sol ; (C) Répartition du ^{15}N en (%) entre les 2 compartiments [aérien et souterrain (racines + sol)].

Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (n = 3). Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes.

3. Résultats

3.1. Approche Expérimentation par marquage foliaire

3.1.1. Traits des plantes

La production de biomasse varie fortement selon les espèces [(*F = 90,72* pour la partie aérienne et *F = 9,52* pour les racines) **Tableau 1**]. La féverole et le pois produisent significativement plus de biomasse aérienne que les trois autres espèces. Le trèfle blanc présente la plus faible biomasse racinaire et la féverole présente la biomasse racinaire la plus élevée. Cette dernière est ainsi caractérisée par le shoot : root ratio le plus faible avec le blé et le ratio le plus élevé est observé avec le pois. Les deux trèfles se trouvent dans une position intermédiaire. Le contenu en N des tissus des espèces de Fabacées est plus élevé que celui du blé. Aucune différence significative est observée entre les teneurs en N des parties aériennes des différentes Fabacées pour la tandis que pois a la teneur en N racinaire la plus élevée.

3.1.2. Répartition du ^{15}N dans les différents compartiments

Les données IRMS obtenues à partir des échantillons avant et après le marquage ont permis de déterminer l'excès isotopique en ^{15}N de chaque compartiment (**Tableau 2**). Comme attendu, les enrichissements en ^{15}N les plus élevés sont observés dans les parties aériennes et les plus faibles dans le sol. Dans les parties aériennes (feuilles et tiges) l'excès isotopique varie entre 1.61 ± 0.16 % et 4.17 ± 0.57 %, le blé a présenté un enrichissement ^{15}N inférieur à celui des Fabacées. Parmi les Fabacées, l'enrichissement le plus important est observé chez le trèfle blanc. En ce qui concerne les racines, le plus faible enrichissement isotopique est cette fois ci observé chez le pois, et les 3 autres Fabacées sont plus fortement marquées que le blé. Concernant le sol, l'excès isotopique est significativement plus élevé chez les 4 Fabacées étudiées que chez le blé.

3.1.3. Estimation de l'azote du compartiment souterrain

Les résultats IRMS ont permis de faire un bilan massique du ^{15}N dans les différents compartiments (**Figure 2**). Les Fabacées, surtout les protéagineuses, ont incorporé beaucoup plus de ^{15}N que le blé, en particulier dans les organes aériens (**Figure 2 A**). Dans les racines la plus forte quantité de ^{15}N est rencontrée pour la féverole. Au niveau du sol, la quantité de ^{15}N est également plus élevé chez les Fabacées que chez le Blé et les quantités les plus importantes ont été obtenues pour le trèfle incarnat comparativement au pois et à la féverole (**Figure 2 B**). La détermination de la répartition du ^{15}N dans chacun des compartiments par rapport au ^{15}N total (plante + sol) (**Figure 2C**) a montré que chez les Fabacées, la majeure partie du ^{15}N qui représente entre 60 et 92% est retrouvée dans les organes aériens et seulement entre

Tableau 3 : Caractéristiques des plantes dans l'approche par dilution isotopique ^{15}N.

Plantes	Biomasse sèche Partie aérienne (g)	Biomasse sèche racines (g)	Shoot:Root ratio	Teneur en N partie aérienne (mg. g^{-1})	Teneur en N Racines (mg. g^{-1})
Blé	1.56 ± 0.11 b	0.65 ± 0.20 b	2.57 ± 0.84 c	14.42 ± 1.02 d	8.97 ± 1.06 c
Fèverole	1.13 ± 0.61 bc	0.92 ± 0.20 a	1.17 ± 0.52 c	59.61 ± 8.31 a	26.70 ± 1.89 a
Pois	3.65 ± 0.52 a	0.27 ± 0.02 c	13.38 ± 1.67 a	29.11 ± 1.35 c	24.90 ± 1.57 ab
Trèfle blanc	0.66 ± 0.05 c	0.24 ± 0.10 c	3.13 ± 1.32 bc	40.18 ± 7.62 b	23.09 ± 2.87 b
Trèfle incarnat	1.44 ± 0.30 b	0.29 ± 0.04 c	4.99 ± 0.81 b	46.27 ± 3.38 b	24.93 ± 0.82 ab
	F = 43.26	*F = 24.24*	*F = 95.48*	*F = 51.91*	*F = 78.81*

Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes (n = 5)

Tableau 4 : Distribution du marquage ^{15}N (excès isotopique ^{15}N) dans les différents compartiments dans l'approche par dilution isotopique.

Plantes	Excès isotopique ^{15}N (%) Partie aérienne	Excès isotopique ^{15}N (%) Racines	Excès isotopique ^{15}N (%) Sol
Blé	0.0934 ± 0.003 a	0.0870 ± 0.003 a	0.0136 ± 0.003 b
Fèverole	0.0066 ± 0.002 d	0.0132 ± 0.006 c	0.0146 ± 0.001 b
Pois	0.0067 ± 0.000 d	0.0147 ± 0.001 c	0.0218 ± 0.005 a
Trèfle blanc	0.0126 ±0.002 c	0.0198 ± 0.002 c	0.0202 ± 0.004 a
Trèfle incarnat	0.0234 ± 0.004 b	0.0284 ± 0.002 b	0.0150 ± 0.004 b
	F = 805.7	*F = 346.9*	*F = 10.83*

Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes (n = 5)

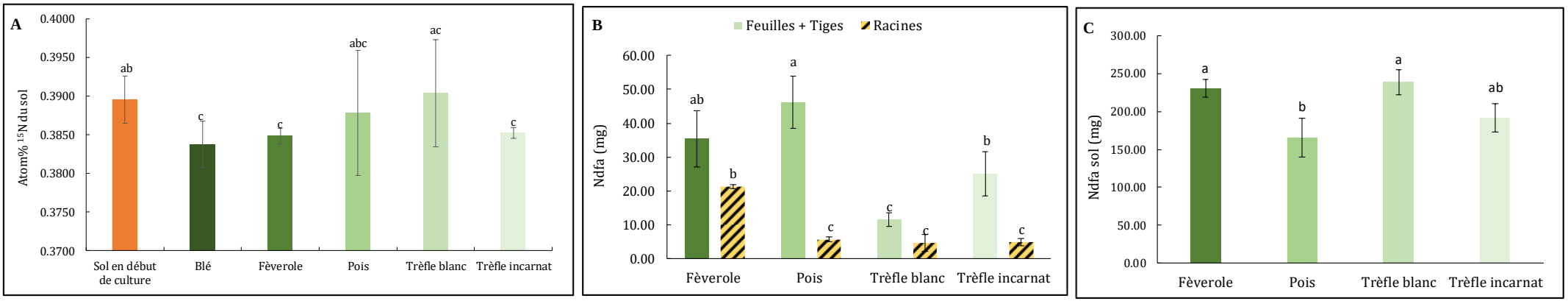


Figure 3 : Présentation de l'abondance isotopique en ^{15}N (atom% ^{15}N) dans le sol en début de culture et après la récolte des différentes espèces avec l'approche par dilution isotopique (A). Les quantités d'azote issues de la fixation symbiotique chez les différentes Fabacées dans les différents compartiments (B) les compartiments aérien (feuille + tiges) et souterrain (racines) ; (C) dans le sol.

Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (n = 5). Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes

8 et 35% de ce ^{15}N est retrouvée dans le compartiment souterrain. Le blé présente une répartition bien différente avec 24% seulement du ^{15}N dans les parties aériennes et 66% dans le compartiment souterrain.

3.2. Expérimentation par dilution isotopique ^{15}N

3.2.1. Traits des plantes

La répartition de la biomasse entre la partie aérienne et les racines est assez contrastée entre les espèces au regard du shoot : root ratio [(F = 95.48) **Tableau 3**]. En effet, comme dans l'expérimentation précédente, le pois présente le ratio le plus élevé entre les 2 compartiments en raison d'une plus forte production de biomasse aérienne que les autres espèces. La féverole présente une fois encore la biomasse racinaire la plus importante suivie du blé. Le pois et les deux trèfles ont eu les biomasses racinaires les plus faibles. Concernant les teneurs en N, la plus faible teneur est observée dans les tissus du blé.

3.2.2. Répartition du ^{15}N dans les différents compartiments

L'incorporation du N_2 atmosphérique à faible teneur en ^{15}N a entraîné une réduction de l'excès isotopique ^{15}N dans les organes des Fabacées (**Tableau 4**). Ainsi, le blé qui n'utilise que l'N du sol a des tissus plus riches en ^{15}N comparativement aux Fabacées. Concernant le sol, les excès isotopique ^{15}N les plus faibles sont observés chez le blé, la féverole et le trèfle incarnat.

3.2.3. Estimation de l'azote issu de la fixation atmosphérique par dilution isotopique

Concernant cette approche par dilution isotopique, la détermination de l'abondance isotopique en ^{15}N en début de culture et après la récolte pour les différentes espèces (**Figure 3A**) a montré une dilution du marquage ^{15}N dans les sols de culture de la féverole et du trèfle incarnat, mais également de façon surprenante dans le sol du blé. Concernant le pois et le trèfle blanc, l'abondance isotopique ^{15}N n'a pas évolué significativement pendant la culture. Le blé a été utilisé pour mesurer l'abondance isotopique des sources d'N du sol potentiellement absorbé par les plantes et a donc permis de déterminer l'N des plantes d'origine atmosphérique, ou Ndfa « N derived from the atmosphere » (**Figure 3 B et 3 C).** Les résultats mettent en évidence des quantités d'N issues de la fixation, plus importantes dans les tissus aériens (feuilles + tiges) du pois et de la f éverole que chez les deux trèfles (**Figure 3 B**). Dans les tissus racinaires, la plus forte quantité de Ndfa a été observée chez la féverole. Dans le sol, l'azote d'origine atmosphérique est plus élevé pour la féverole et le trèfle blanc que pour le pois, tandis que le trèfle incarnat a présenté des valeurs intermédiaires entre le pois et la féverole (**Figure 3 C**).

4. Discussion

Cette étude a permis d'étudier le flux d'N dans le système plante-sol de différentes Fabacées en utilisant deux approches de marquages des compartiments aérien et souterrain. L'utilisation de l'approche par marquage foliaire au ^{15}N a conduit à un enrichissement important des tissus aériens en ^{15}N et notamment chez les protéagineuses. En effet, avec une forte croissance aérienne au moment de l'expérimentation, une part importante du ^{15}N a été allouée aux organes aériens des protéagineux notamment du pois. Ce dernier a présenté un shoot : root ratio élevé et lorsque l'azote est exprimé en proportion du ^{15}N total (plante + sol), seulement 8% du ^{15}N est retrouvé dans le compartiment souterrain alors que 92% est retrouvé dans le compartiment aérien. Les résultats de la rhizodéposition de l'azote, quant à eux, montrent des patrons de variation inverses. En effet, cette rhizodéposition de l'N est plus importante dans le sol sous les Fabacées fourragères et particulièrement chez le trèfle incarnat comparativement aux Fabacées protéagineuses. Conformément à la première hypothèse de l'étude, ces résultats confirment la variation de la rhizodéposition de l'azote en fonction des espèces et de la répartition des ressources entre les organes (Wichern *et al.*, 2008; Fustec *et al.*, 2010; Rasmussen, 2011). Aussi, il est important de noter que la féverole et le pois étaient en début de floraison au moment de la récolte et il est établi que les composés C sont alloués préférentiellement vers les organes reproducteurs à ce stade (Tegeder et Masclaux-Daubresse, 2018), ce qui pourrait réduire les quantités de C rhizodéposées. Parmi ces 2 protéagineuses, la féverole se distingue par une forte production de biomasse racinaire qui peut contribuer fortement l'apport en N dans le sol car il est établi que la rhizodéposition augmente avec la biomasse des racines (De Graaff *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020). La difficulté de cette étude réside dans les différences morphologiques entre les espèces qui peuvent conduire à des apports et des assimilations différents du ^{15}N au niveau des organes aériens. D'après Yasmin *et al*. (2006), il existe une différence d'efficacité dans l'assimilation du ^{15}N en fonction des différents modes de marquage d'organe aérien (feuilles, petiole ou tige). Aussi ce type de marquage est difficile à étendre sur un cycle de culture entier car à chaque marquage un nouvel organe est utilisé, ce caractère destructif de la méthode constitut une autre limite pour l'estimation de la rhizodéposition sur une longue durée.

L'utilisation de l'approche par dilution isotopique du ^{15}N a permis de s'affranchir du biais lié au lien fort entre le résultat du marquage foliaire et le stade phénologique. Alors que cette méthode est couramment utilisée pour mesurer la fixation de l'azote atmosphérique, sur des sols ou des solutions nutritives enrichis ou non en ^{15}N (Rennie, 1982; Varin *et al.*, 2010; Sanyal *et al.*, 2018), elle a été peu utilisée pour mesurer la rhizodéposition ou le transfert

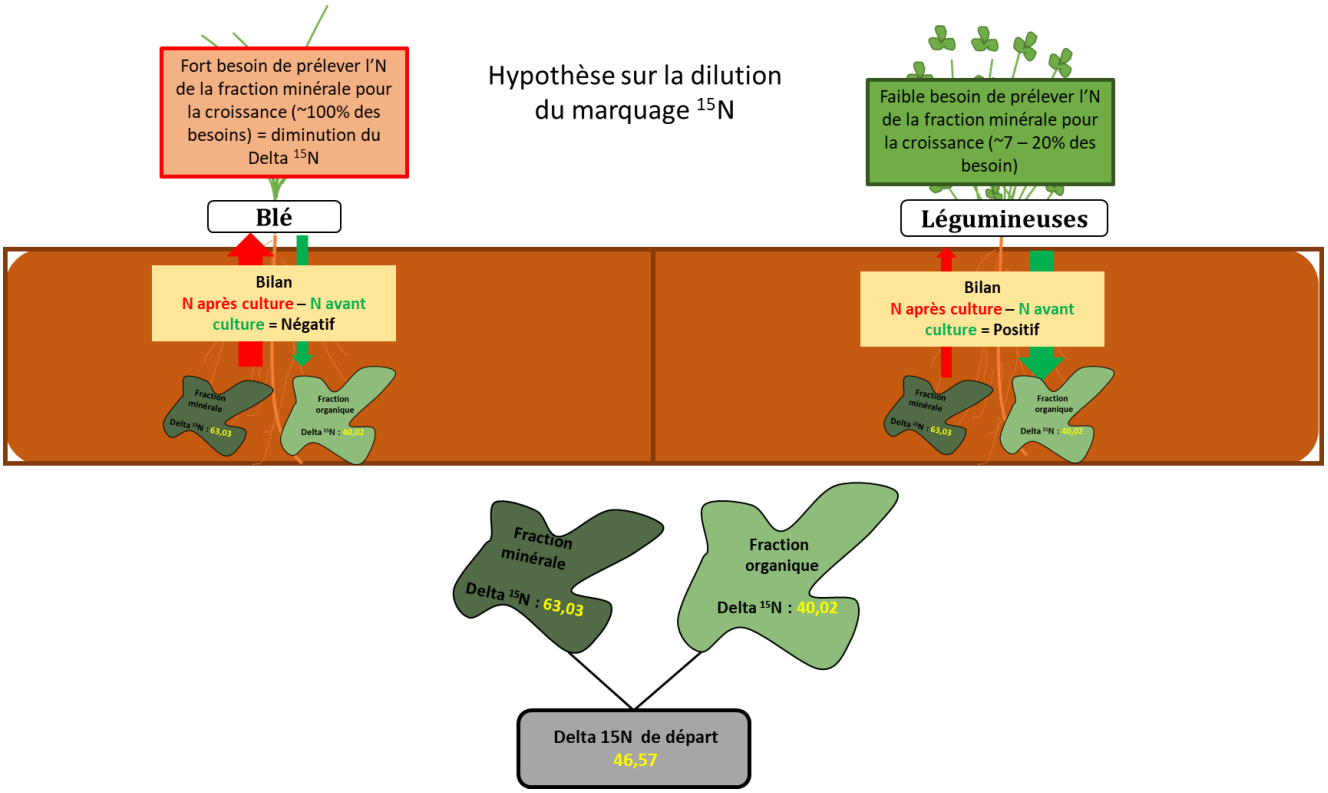


Figure 4 : Schéma hypothétique présentant les facteurs pouvant influencer la dilution du marquage ^{15}N au cours de l'expérimentation et le delta ^{15}N de départ des fractions minérales et organiques du N dans le sol.

La dilution du marquage s'explique d'une part par le prélèvement ^{15}N minéral et d'autre part par la rhizodéposition du ^{14}N par la plante. Sous le blé, la dilution isotopique est essentiellement lié prélèvement du ^{15}N (100% des besoins en N de la plante) et sous les fabacées cela représentait 7-20% des besoin en N.

inter-espèces de l'N (Louarn *et al.*, 2015; Chalk et Smith, 2017). Un bilan massique du N basé sur la capacité physiologique des Fabacées à fixer le N_2 a été possible avec cette approche. Dans le sol, les Ndfa les plus élevés ont été observés chez la féverole et le trèfle blanc, deux espèces qui sont connues pour leur capacité de rhizodéposition de l'N dans le sol (Paynel et Cliquet, 2003; Wang *et al.*, 2020). Cependant, la baisse de la teneur en ^{15}N du sol que nous avons observé dans le sol du blé non fixateur d'N atmosphérique montre que la modification de la proportion de ^{15}N dans le sol n'est pas uniquement liée à la fixation de l'azote atmosphérique par les plantes et son transfert vers le sol. Cette baisse peut provenir d'une part du prélèvement du pool d'N minéral particulièrement riche en ^{15}N et d'autre part la rhizodéposition d'N atmosphérique pauvre en ^{15}N (**Figure 4**). En effet, la mesure de la répartition du marquage entre la fraction minérale soluble et la fraction organique montre que la fraction soluble de l'N du sol était plus enrichie en ^{15}N par rapport à l'N total dans cette expérimentation. D'après la bibliographie, il faut un certain temps de conservation du sol dans des conditions optimales d'humidité et de température pour obtenir un meilleur équilibre ^{15}N minéral/organique [minéralisation/ organisation par les microorganismes (Poth *et al.*, 1986; Giller et Witty, 1987; Giller *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 2002)]. Bien que le sol utilisé dans cette expérimentation ait été marqué au ^{15}N bien avant le début de cette expérimentation, les conditions de conservation, trop sèches, n'ont probablement pas été favorables à l'activité microbienne. Cette absence d'équilibre du ^{15}N entre la fraction minérale et organique pourrait représenter une limite dans l'utilisation de la méthode de marquage par dilution isotopique pour mesurer la rhizodéposition de l'N.

5. Conclusion

Grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, en association avec les bactéries rhizobiacées, les Fabacées enrichissent le sol en azote *via* la rhizodéposition et constituent une alternative intéressante à l'utilisation d'engrais chimiques. L'objectif de cette étude s'inscrit dans ce contexte et vise à développer une méthode qui permette de mesurer et comparer la rhizodéposition de l'azote par différentes Fabacées protéagineuses et fourragères. Dans cette étude, deux méthodes de marquage isotopique ont été comparées, il s'agit du marquage des feuilles avec de l'urée marquée ^{15}N et de la méthode de dilution isotopique. Cette étude a permis de conclure que le recours la méthode de dilution isotopique pour l'estimation et l'analyse comparative de la rhizodéposition de l'N chez plusieurs espèces est à privilégier. En effet, même si les deux méthodes présentent des limites, comparativement à l'approche par marquage foliaire au ^{15}N, la méthode par dilution isotopique permet un apport du marquage ^{15}N identique entre les plantes et peut être appliquée sur un cycle de culture complet. Cependant, cette

méthode nécessite soit d'utiliser un sol possédant des fractions azotées possédant des proportions de ^{15}N proches soit d'estimer les variations des teneurs en ^{15}N liées à l'absorption de l'N soluble par les plantes.

Remerciements

Nous remercions la région Normandie pour le support financier. Nous sommes reconnaissants envers le personnel technique de l'UMR EVA et de AGHYLE UniLaSalle-Rouen pour l'aide technique précieuse qu'ils ont apporté. Nous remercions aussi le plateau d'analyse PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) pour les analyses isotopiques, Théophile Modena pour les extractions et les analyses de l'azote soluble du sol et Cécile Revellin, UMR1347 Agroécologie Agrosup-INRAe-uB, pour la fourniture des souches de Rhizobium.

Références

Chalk PM, Peoples MB, McNeill AM, Boddey RM, Unkovich MJ, Gardener MJ, Silva CF, Chen D (2014) Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of 15N-enriched techniques. Soil Biol Biochem 73: 10–21

Chalk PM, Smith CJ (2017) 15N methodologies for estimating the transfer of N from legumes to non-legumes in crop sequences. Nutr Cycl Agroecosystems 107: 279–301

De Graaff M-A, Six J, Van Kessel C (2007) Elevated CO2 increases nitrogen rhizodeposition and microbial immobilization of root-derived nitrogen. New Phytol 173: 778–786

Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?: Root exudates and rhizosphere bacteria. FEMS Microbiol Ecol 72: 313–327

Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B (2010) Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. Agron Sustain Dev 30: 57–66

Génard T, Etienne P, Laîné P, Yvin J-C, Diquélou S (2016) Nitrogen transfer from Lupinus albus L., Trifolium incarnatum L. and Vicia sativa L. contribute differently to rapeseed (Brassica napus L.) nitrogen nutrition. Heliyon 2: e00150

Giller KE, Ormesher J, Awah FM (1991) Nitrogen transfer from Phaseolus bean to intercropped maize measured using 15N-enrichment and 15N-isotope dilution methods. Soil Biol Biochem 23: 339–346

Giller KE, Witty JF (1987) IMMOBILIZED l5N-FERTILIZER SOURCES IMPROVE THE ACCURACY OF FIELD ESTIMATES OF N,-FIXATION BY ISOTOPE DILUTION. Soil Biol Biochem 19: 459–463

Götz KP, Herzog H (2000) Distribution and Utilization of ^{15} N in Cowpeas Injected into the Stem Under Influence of Water Deficit. Isotopes Environ Health Stud 36: 111–121

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 ? Innov Agron 74: 55–68

Høgh-Jensen H (2006) The nitrogen transfer between plants: An important but difficult flux to quantify. Plant Soil 282: 1–5

Hupe A, Schulz H, Bruns C, Joergensen RG, Wichern F (2016) Digging in the dirt – Inadequacy of belowground plant biomass quantification. Soil Biol Biochem 96: 137–144

Hütsch BW, Augustin J, Merbach W (2002) Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils. J Plant Nutr Soil Sci 165: 397–407

Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytol 163: 459–480

Khan DF, Peoples MB, Chalk PM, Herridge DF (2002) Quantifying below-ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of 15N and non isotopic methods. 13

Louarn G, Pereira-Lopès E, Fustec J, Mary B, Voisin A-S, de Faccio Carvalho PC, Gastal F (2015) The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. Plant Soil 389: 289–305

Mayer J, Buegger F, Jensen ES, Schloter M, Heß J (2003) Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a 15N in situ stem labelling method. Soil Biol Biochem 35: 21–28

Palta JA, Fillery IR, Mathews EL, Turner NC (1991) Leaf Feeding of [15N]Urea for Labelling Wheat With Nitrogen. Funct Plant Biol 18: 627–636

Paterson E, Gebbing T, Abel C, Sim A, Telfer G (2007) Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. New Phytol 173: 600–610

Paynel F, Cliquet JB (2003) N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds. Agronomie 23: 503–510

Poth M, La Favre JS, Focht DD (1986) Quantification by direct 15N dilution of fixed N2 incorporation into soil by Cajanus cajan (Pigeon Pea). Soil Biol Biochem 18: 125–127

Rasmussen J (2011) Why we need to restrict the use of “rhizodeposition” and the Janzen and Bruinsma equation. Soil Biol Biochem 43: 2213–2214

Rasmussen J, Gylfadóttir T, Dhalama NR, 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 Biol Biochem 133: 60–71

Rennie RJ (1982) Quantifying dinitrogen (N_2) fixation in soybeans by ^{15}N isotope dilution: the question of the nonfixing control plant. Can J Bot 60: 856–861

Rezgui C, Riah-Anglet W, Benoit M, Bernard PY, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I (2020) Impacts of the Winter Pea Crop (Instead of Rapeseed) on Soil Microbial Communities, Nitrogen Balance and Wheat Yield. Agriculture 10: 548

Russell CA, Fillery IRP (1996) Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. Aust J Agric Res 47: 1047–1059

Sanyal D, Goos RJ, Chatterjee A (2018) Determining Symbiotic Nitrogen Fixation in Dry Bean Cultivars Using Ureide Method and Isotope Dilution Techniques. Commun Soil Sci Plant Anal 49: 2042–2052

Shearer G, Kohl DH (1986) N2-fixation in field settings: estimations based on natural 15N abundance. Funct Plant Biol 13: 699–756

Tegeder M, Masclaux-Daubresse C (2018) Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. New Phytol 217: 35–53

Varin S, Cliquet J-B, Personeni E, Avice J-C, Lemauviel-Lavenant S (2010) How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (Trifolium repens L.)? J Exp Bot 61: 225–234

Wang X, Yang Y, Pei K, Zhou J, Peixoto L, Gunina A, Zeng Z, Zang H, Rasmussen J, Kuzyakov Y (2020) Nitrogen rhizodeposition by legumes and its fate in agroecosystems: A field study and literature review. Land Degrad. Dev.

Wichern F, Eberhardt E, Mayer J, Joergensen RG, Müller T (2008) Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. Soil Biol Biochem 40: 30–48

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 Soil 329: 105–115

Wichern F, Mayer J, Joergensen RG, Müller T (2007) Rhizodeposition of C and N in peas and oats after 13C–15N double labelling under field conditions. Soil Biol Biochem 39: 2527–2537

Yasmin K, Cadisch G, Baggs EM (2006) Comparing 15N-labelling techniques for enriching above- and below-ground components of the plant-soil system. Soil Biol Biochem 38: 397–400

Chapitre IV B :

Ce chapitre est présenté sous forme d'article intitulé **« Evaluation of C and N rhizodeposition by four legume crops and relationships with plant functional traits »,** Ce chapitre a fait l'objet d'une publication qui a été soumise à Journal of Ecology puis rejetée avec encouragement à resoumettre. C'est la première version non révisée qui est présentée.

Préambule

Le chapitre précédent (**IV A**) ayant montré que la méthode par dilution isotopique ^{15}N semble mieux adaptée pour l'estimation et l'analyse comparative de la rhizodéposition de l'N chez plusieurs espèces de Fabacées, nous avons couplé cette méthode à un marquage isotopique hebdomadaire au $^{13}CO_2$. Le but de cette étude était d'évaluer sur le même échantillonnage les flux de C et de N de l'atmosphère vers le sol à travers la photosynthèse des plantes et la fixation biologique de l'N et d'étudier le lien avec les traits fonctionnels des plantes. Deux Fabacées protéagineuses (le pois et la féverole) et deux Fabacées fourragères (le trèfle blanc et le trèfle incarnat) et une Poacées (le blé) ont été cultivées en conditions contrôlées.

Principaux résultats

- Les Fabacées fourragères (en particulier le trèfle incarnat) et la féverole présentent les apports les plus élevés en C et N issu de la rhizodéposition.
- La rhizodéposition du C augmente proportionnellement à la rhizodéposition de l'N
- La fixation photosynthétique du carbone et la fixation biologique de l'azote sont des déterminants essentiels de la rhizodéposition.
- Les différences observées entre les espèces sont liées aux traits liés à l'architecture des racines qui sont de bons prédicteurs de la rhizodéposition des plantes.

Evaluation of C and N rhizodeposition by four legume crops and relationships with plant functional traits.

Mohamed Kanté[1,2,3], Wassila Riah-Anglet[2,3], Isabelle Trinsoutrot-Gattin[2,3], Jean-Bernard Cliquet[1,3]

[1] Normandie Université, UNICAEN, INRAE, EVA, 14000 Caen, France

[2] UniLaSalle, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, Rouen Team, 3 Rue du Tronquet, F-76134 Mont Saint Aignan, France.

[3] Research Federation NORVEGE Fed4277, Normandy University, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France

Corresponding author: Jean-Bernard Cliquet

E-mail address: jean-bernard.cliquet@unicaen.fr

Phone: +33 (0)2 31 56 53 03

Abstract:

Legumes play a central role in soil C and N cycling. By the process of rhizodeposition they release a significant C and N into the soil, increasing soil organic C and reducing N fertilizer use. Rhizodeposition is known as dynamic process influenced by many factors. The aim of this study was to evaluate on the same sampling C and N fluxes from the atmosphere to the soil through plant photosynthesis and biological-N fixation and study the linkage with plant functional traits. Two grain legumes (pea and faba bean) and two forage legumes (white and crimson clovers) and non-legume (wheat) were grown under controlled conditions. An original approach combining $^{13}CO_2$ labeling and the ^{15}N dilution method was developed to measure plant rhizodeposition all along plant growth. The results demonstrated that forage legumes (especially crimson clover) and faba bean presented the highest C and N rhizodeposition. C rhizodeposition was found to increase proportionally with N rhizodeposition and the differences observed between species were related to the C and N fixation abilities. When specific rhizodeposition is expressed as proportions of C and N fixed, forage legumes were found to be more efficient for C rhizodeposition and pea was the most efficient for N rhizodeposition during reproductive development. Total C and N fixed and traits related to root architecture appeared to be good predictors of plant rhizodeposition.

Keywords: Legumes, Rhizodeposition, $^{13}CO_2$ labeling, ^{15}N dilution, Functional traits

1. Introduction

Legumes in agricultural systems have many benefits through multiple ecosystem services. These services include (i) providing energy-rich food for humans and animals (ii) maintaining pollination (iii) maintaining soil quality (iv) improving water quality (v) contributing to biodiversity and (iv) regulating climate (Altobelli et al., 2016; Voisin et al., 2017; Meena et al., 2018). The use of legumes is therefore recommended for sustainable agriculture as they improve environmental performance (Schneider and Huyghe, 2015). Legumes species have a physiological functioning that allows them to use atmospheric nitrogen (N_2) for their nutrition through a root symbiosis with bacteria of the rhizobiaceae genus (Mylona et al., 1995; Oldroyd et al., 2011). This function allows to reduce the use of N fertilizer and enrich the soil in N (Fustec et al., 2010; Ohyama, 2017; Voisin et al., 2017). In a crop rotation or association system including legumes, the fixed N_2 can be beneficial to the following or associated crop (Chalk et al., 2014; Génard et al., 2016; Rezgui et al., 2020).

Soil N enrichment by legumes plants is performed through the processes of plant shoot litter decomposition and rhizodeposition (Wichern et al., 2008; Fustec et al., 2010). Rhizodeposition is defined as the emission of all types of compounds from plant roots to soil, including root senescence (Uren, 2001). Through this process, a significant source of C is also released into the soil, contributing to increase soil organic C stock (Kuzyakov and Domanski, 2000; Nguyen, 2003; Pausch and Kuzyakov, 2018). C from plants has a high impact on microbial activity, nutrient availability, soil organic matter (SOM) and other soil biological processes (Paterson et al., 2007; Oburger and Jones, 2018; Kanté et al., 2021).

Rhizodeposition is known to be dependent on plant species and environmental factors (Jones et al., 2004). Nguyen (2003) reported that on average 17% of C fixed by plant is rhizodeposited in soil but varies greatly between species. Soluble compounds released by roots, mainly sugars, carboxylic acids and amino acids, may account for 1 to 10% of rhizodeposition (Uren, 2001; Paterson, 2003). Rhizodeposition has long been studied by considering only C compounds but there is increasing evidence that plants release significant amounts of N, particularly in the case of legumes (Wichern et al., 2008). Exudation of soluble N compounds consists of elements such as NO_3-, NH_4^+ and amino acids (6 - 31%) (Merbach et al., 2000; Paynel and Cliquet, 2003; Lesuffleur et al., 2007; Bobille et al., 2016). The amount of rhizodeposited N and the N composition of exudates also vary among species (Wichern et al., 2008; Fustec et al., 2010; Wang et al., 2020). Rhizodeposition of N is estimated to be between 4 and 71% of total N uptake by plant with a median of 16% in legumes and 14% in cereals (Wichern et al., 2008).

Many studies have estimated C and N fluxes in the plant-soil system (Russell and Fillery, 1996; Wichern et al., 2007; Pausch and Kuzyakov, 2018). Labeling techniques are the most effective and suitable approaches to quantify C and N rhizodeposition (Kuzyakov and Schneckenberger, 2004; Wichern et al., 2008; Fustec et al., 2010). The aim is to provide labeling to a plant organ or soil and to monitor the transfer of this labeling in the different compartments. Different studies have quantified C rhizodeposition under controlled or field conditions by using different isotopes including radioactive ^{14}C (Jensen, 1993; Domanski et al., 2001; Rasmussen et al., 2019) and ^{13}C stable isotope (Schmitt et al., 2013; Hupe et al., 2016). Labeling is mainly applied at the aboveground parts and in gaseous form (Hütsch et al., 2002; Ge et al., 2017), this requires specific equipment and it is difficult to apply in the field conditions. Isotope can also be provided in solution form, including immersion of an aboveground organ in the labeled solution (e.g. as glucose) (Hupe et al., 2016; Zang et al., 2018). Due to the large morphological diversity of plants, this method may be difficult to apply to compare multiple species and it is difficult to apply in the long term due to toxicity of the solution for the labeled organ.

As with C, N labeling can be carried out on aboveground part in gaseous form with $^{15}NH_3$ (Janzen and Bruinsma, 1989; Bazot et al., 2008) or in solution form with urea, nitrate, or ammonium (Palta et al., 1991; Zebarth et al., 1991; Schmidt and Scrimgeour, 2001; Wichern et al., 2010)). In belowground part, roots can be labeled using split-root approach, where root system is divided into two parts, one part is immersed in a ^{15}N-enriched nutrient solution and another part is in a solid substrate (Sawatsky and Soper, 1991; Merbach et al., 2000; Veerman et al., 2018). This root separation approach results in disruption of the root system and may lead to overestimation of rhizodeposition (Wichern et al., 2008). In the isotope dilution approach (Poth et al., 1986; Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001; Khan et al., 2002), soil is directly labeled with a ^{15}N solution and ^{14}N coming from the air is measured in plant organs and soil to estimate N_2 fixation by plants and its incorporation into the soil. This approach requires homogeneous soil labeling and has to consider natural ^{15}N isotopic discrimination in plant (Yoneyama et al., 1986; Unkovich, 2013) but is reliable for quantification of rhizodeposition all along plant growth.

Various calculation methods are used to estimate soil C and N derived from rhizodeposition. A method developed by Janzen and Bruinsma (1989) has been applied in many studies. This method is only suitable for homogeneous and consistent labeling of roots and rhizodeposits to avoid over- or underestimation due to dilution or redistribution of labeling. This homogeneity of labeling between different compartments is difficult to achieve, which is a bias for Janzen

and Bruinsma approach (Rasmussen, 2011). Another calculation method that avoids the influence of heterogeneous labeling is applied by Khan et al. (2002). This method includes the distribution of the labeling in all compartments (from plant tissue to soil). Hupe et al. (2016) compared these two methods in their study and showed an overestimation of rhizodeposition with the method of Janzen and Bruinsma (1989). In their study, soil isotopic enrichment increased with increasing root enrichment and this was expected to correspond to an increasing amount of rhizodeposition. However, the Janzen and Bruinsma approach did not reveal this increase, compared to the mass balance approach.

Rhizodeposition studies differ strongly depending on the species studied, their stage of development, the method of labeling and calculation, the type of soil, the growing conditions, etc. (Jones et al., 2004; Wichern et al., 2008; Jones et al., 2009; Hupe et al., 2016). The different labeling possibilities offer interesting experimental opportunities. However, it is difficult to compare multiple species at the same time because successful labeling requires good and homogeneous uptake (Yasmin et al., 2006; Rasmussen, 2011). Labeling can be achieved by continuous labeling and single or multi-pulse labeling. In some studies, pulse labeling is shown to overestimate rhizodeposition (Mahieu et al., 2009; Gasser et al., 2015). In contrast, continuous and multiple pulses labeling approach would result in more homogeneous enrichment of plant tissues (Rasmussen, 2011). Compared to solution labeling, atmospheric labeling allows similar labeling in multi-species experiments and more suitable for continuous labeling. Differences in labeling recovery will thus be related to physiological ability of plants to use atmospheric resources.

The aim of this study was to evaluate on the same sampling C and N rhizodeposition derived from atmospheric fixation of both elements for different legumes cover. For this purpose, various seed and forage legumes were grown under controlled conditions using atmospheric $^{13}CO_2$ labeling coupled with ^{15}N isotope dilution method. The idea is to determine whether forage legumes and seed legumes show contrasting rhizodeposition profiles and to identify the factors modulating the differential rhizodeposition. We hypothesized that (1) C rhizodeposition would increase with N rhizodeposition; (2) The rhizodeposition capacity of species would be associated to their functional traits, including C and N fixation capacity, root traits and tissue quality.

2. Material and methods

2.1. Soil and plant material

Soil used in this study was a loamy soil collected at 0 – 20 cm depth from an arable field in Seine et Marne, France (48° 32′ N 2° 39′ E). Soil was sieved at 5 mm and presented the

following characteristic: pH 7.88 (water), total C 10.56 $g.kg^{-1}$, total N 1.37 $g.kg^{-1}$ and available P (Olsen) 85.51 $mg.kg^{-1}$. The experiment was conducted using four legumes plants: pea (*Pisum sativum* L.cv Glauris); faba bean (*Vicia faba* L.cv Fanfare); white clover (*Trifolium repens* L. cv RD84); crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and one non-legume plant: wheat (*Triticum aestivum* L. Lennox) was used as N_2 non-fixing control. Wheat was also used for the measurement of C rhizodeposition.

2.2. **Growing conditions and experimental design**

The experiment was carried out under controlled conditions in greenhouse until plant reproductive stage. After seed sterilization and ten days of germination, seedlings were transferred in 2L pot (20 cm depth, 12 x 12 cm surface) containing 1.8 kg soil adjusted between 70 – 80% of the soil water holding capacity (WHC). Twenty replicate pots of each species were grown. The seedlings were sown according to their field sowing density adapted to pots surface: 380 $seeds.m^{-2}$ (4 seedlings per pot) for wheat, 40 $seeds.m^{-2}$ for faba bean (1 seedling per pot), 70 $seeds.m^{-2}$ (1 seedling per pot) for pea, 500 $seeds.m^{-2}$ (6 seedlings per pot) for white clover, 600 $seeds.m^{-2}$ (8 seedlings per pot) for crimson clover. Plants were inoculated with their specific rhizobia, pea was inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* P221, faba bean was inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae FH34* and both clover species were inoculated with *Rhizobium trifolii* T354. The first harvest took place one month after the transplantation corresponding to the vegetative stage (VS). We choose to make the second harvest called reproductive stage (RS) when leaves and stem had reached more than 50% of senescence. This harvest took place 13 weeks after transplantation for pea, 14 weeks for wheat, 15 weeks for white and crimson clovers and 16 weeks for faba bean. The pots were automatically watered with a flow rate of 60 $ml.pot^{-1}.day^{-1}$ and was manually adjusted to maintain the WHC between 70-80%. Additional light was provided by sodium lamps (400 W Philips SON T-PIA Agro, providing 400 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ photosynthetic active photons) with a photoperiod of 16 h day at 20°C and 8 h night at 18°C.

In order to determine discrimination occurring against ^{15}N during N_2 fixation and export of fixed N from the nodules to the other organs for each species (Peoples et al., 2015), another experiment was set up with plants grown in a N-free medium. This culture was performed in the same environmental conditions on a mixture of sand and vermiculite substrate (50:50) in 2L pots. Plants were inoculated with their specific rhizobia as described before and were automatically watered with a modified ¼ strength Hoagland nutrient solution without nitrogen. After 6 weeks, plants were harvested, roots and shoots were separated, dried and then ball-milled. These samples were then submitted to IRMS to determine ^{15}N natural abundance.

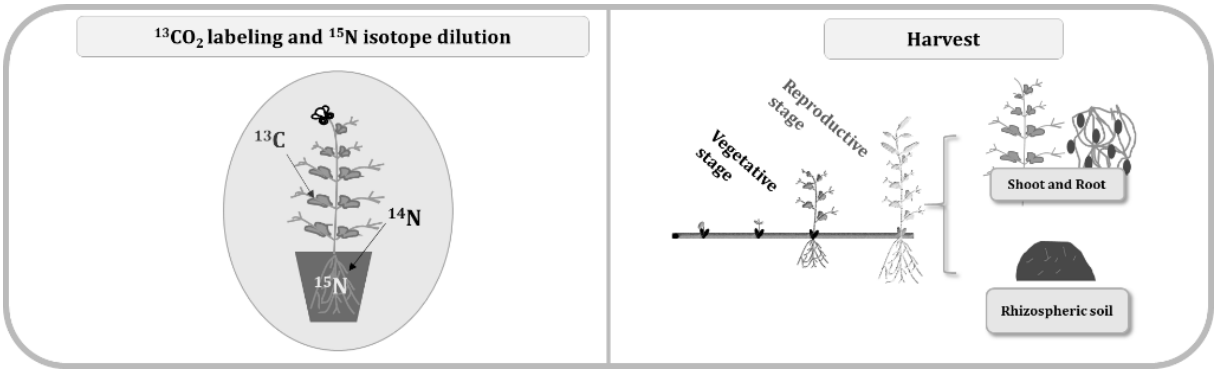


Figure 1: Plant ^{13}C and ^{15}N isotope labeling device and harvesting procedure

2.3. **Atmospheric ^{13}C labeling and ^{13}C natural abundance**

To estimate C rhizodeposition of the different crops, plants were introduced weekly into a growth chamber (starting 3 weeks after transplantation) for $^{13}CO_2$ labeling during 24 hours. This growth chamber is equipped for automatic control of light, temperature, moisture, CO_2 concentration and $^{13}CO_2$ enrichment (Froids et Mesures, Beaucouze, France). The photoperiod and the day and night temperatures were similar to that used in the greenhouse. The labeling device and the protocol used are similar to those used by Kanté et al. (2021). $^{13}CO_2$ was injected into the chamber to reach a CO_2 concentration of 400 ppm and an ^{13}C atom excess of 4.88%.

Five control pots per species for the ^{13}C natural abundance determination in the different compartments were harvested before the beginning of the labeling procedure and sampled as indicated below.

2.4. **^{15}N dilution approach and ^{15}N natural abundance**

Atmospheric N fixation and rhizodeposition were measured with the ^{15}N dilution method (Varin et al., 2010). The ^{15}N-enriched soil was issued from another unpublished study. Six years before the start of the experiment, 4 mg of N per kg of soil was added with a solution of $^{15}NH_4{}^{15}NO_3$ (99.7 atom%^{15}N). Based on the work of Giller et al. (1991), sucrose was incorporated two months before the experiment in order to boost microbial incorporation of ^{15}N in the organic form and stabilize the ^{15}N enrichment of available N. Five replicates of soil samples were collected at the beginning of the experiment, and the average ^{15}N atom excess in the soil was about 0.0200 ± 0.0003 %. The soluble fraction of the soil was extracted with a 1M KCL solution to estimate the ^{15}N enrichment of the soluble N available for plant growth at the start of the experiment (0.0425 ± 0.0025 atom% ^{15}N excess) and the ^{15}N enrichment of the insoluble fraction (0.0188 ± 0.0009 atom% ^{15}N excess).

2.5. **Harvest and analyses**

Five replicates of each species were harvested at both harvest point. Plant aboveground parts were cut at soil surface and total biomass was measured (**Figure 1**). At reproductive stage, seeds (for faba bean, pea and wheat) and flowers (for white and crimson clover) were separated from the rest of aboveground parts. At each harvest (VS and RS), 5 more replicates were harvested to collect the entire root system. An aliquot of this root system was kept in an alcoholic solution and scanned the following day using an EPSON EXPRESSION 10000XL scanner. Winrhizo version 2007d (Regent Instruments Inc., Canada) was used to determine root traits. The harvested plant tissues were then dried at 70°C and weighed for dry mass determination. All tissues were then ball milled. %C, %N, ^{13}C and ^{15}N enrichment were determined using an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) coupled to an

isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Nu Instruments, Manchester, UK). Various plant functional traits were determined: (1) total shoot and root dry biomass (g), (2) Shoot Mass Ratio (SMR ; $g.g^{-1}$) corresponding to the ratio of shoot dry mass to total plant dry mass, (3) Root Mass Ratio (RMR ; $g.g^{-1}$), the ratio of root dry mass to total plant dry mass, (4) Root Dry Matter Content (RDMC; $mg.g^{-1}$), the ratio of total root dry biomass to total root fresh biomass, (5) Root C content (RCC ; $mg.g^{-1}$), the ratio of root C amount to root dry mass, (6) Root N content (RNC ; $mg.g^{-1}$), the ratio of root N amount to root dry mass, (7) shoot and root C:N ratio, (8) root area (cm^2), (9) Root Mass Density (RMD ; $mg.cm^{-3}$), the ratio of root dry mass to the cultivation pot volume (2L), (10) Root Length Density (RLD ; $cm.cm^{-3}$), the ratio of total root length to the cultivation pot volume. Root samples were also used for the determination of Root soluble C and Root Soluble N contents. Extractions were performed by successive treatment of dry root tissue powders with ethanol and hot water (80°C) (Cliquet et al., 1991). The samples were then analyzed by IRMS. Homogeneous soil without roots debris was also collected. Theses soil samples were dried, ball milled and submitted to EA-IRMS to determine total C, N and ^{13}C, ^{15}N enrichment.

2.6. **Determination of ^{13}C and ^{15}N fixation and rhizodeposition**

Data from the IRMS analyses allowed to determine the amounts of C fixed during the labeling period in the different compartments (plant organs and soil) with the following equation:

$$\boldsymbol{Labeled\ C\ (g) = \left(\frac{atom\ excess\ \%\ of\ the\ compartment}{atom\ excess\ \%\ of\ the\ atmosphere}\right) * total\ C\ of\ the\ compartment\ (g)} \quad (1)$$

Where atom excess % of the atmosphere was 4.88% and unlabeled control compartments were used to determine atom excess % of soil. Total C of the compartment was obtained from total Dry Mass and C contents of the compartment. This amount of labeled C was calculated for each harvest. In the soil, this amount was named CdfR for C derived from rhizodeposition.

The percentage of total N accumulation in legumes derived from N_2-fixation (%Ndfa) was calculated using the ^{15}N contents of the legume (atom%^{15}N legume) and non-fixing reference (atom%^{15}N wheat) (Shearer and Kohl, 1986; Khan et al., 2002):

$$\%\boldsymbol{Ndfa_{plant\ organ}} = \frac{(\boldsymbol{Atom\%\ ^{15}Nexcess\ wheat - Atom\%\ ^{15}Nexcess\ legume})}{(\boldsymbol{Atom\%\ ^{15}N\ excess\ wheat})} \quad (2)$$

Where atom% ^{15}N excess were determined using the natural ^{15}N abundance (B) of the organ of the legume of interest grown in the N-free medium so that the plants are fully dependent

upon N_2 fixation. This term B aims to account for isotopic fractionation that may occur during biological N_2 fixation (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2000; Peoples et al., 2015).

The amount of plant N derived from N_2-fixation (Ndfa) and the amount of N derived from the soil (Ndfs) in legumes were then calculated for each organ as indicated in equation (3) and (4) respectively:

Ndfa (mg) = %Ndfa x Total N of the organ (mg) (3)

Ndfs (mg) = Total N in the plant (mg) – Ndfa (mg) (4)

Despite early addition of ^{15}N-fertilizer and sucrose, we found higher ^{15}N enrichment in the soil soluble N compared with total soil N. As a consequence, we hypothesized that the decrease in atom % ^{15}N in soil occurring during plant growth could result from i) plant uptake of ^{15}N-enriched soluble N ii) rhizodeposition of N derived from the air with a low ^{15}N abundance. Assuming that the ^{15}N abundance of the pool of N available for plant uptake by wheat and legumes was similar (Chalk and Ladha, 1999), the atom%^{15}N taking in account the ^{15}N abundance decrease in soil due to plant uptake (Atom%^{15}N normalized) was calculated for each plant as indicated in equation 5:

$$\boldsymbol{Atom\%^{15}N\ normalized} = \frac{(\boldsymbol{Atom\%^{15}N\ T_0\ \ x\ N\ amount\ T_0}) - (\boldsymbol{wheat\ \ Atom\%^{15}N\ x\ Ndfs})}{(\boldsymbol{N\ amount\ at\ T_0\ -\ Ndfs})} \quad (\mathbf{5})$$

Where atom%^{15}N T_0 is the atom% of the soil at the start of the experiment, N amount T_0 the amount of N in each pot at the start of the experiment, and Ndfs the total N derived from soil per plant. To take in account this uptake, the proportion of N derived from N_2 fixation and recovered in soil (%Ndfa) for each harvest was calculated as indicated in equation 6:

$$\%\boldsymbol{Ndfa}_{\boldsymbol{soil}} = \frac{(\boldsymbol{Atom\%^{15}Nexcess\ wheat} - \boldsymbol{Atom\%^{15}N\ excess\ normalized})}{\boldsymbol{Atom\%^{15}Nexcess\ wheat}} \quad (\mathbf{6})$$

Where atom% ^{15}N excess was determined from atom% air (0.3663 %). Finally, the amount of N in the soil due to rhizodeposition (NdfR) of N_2 biologically fixed by the legume was:

$$NdfR\ (mg) = \%Ndfa_{soil}\ x\ Total\ N\ of\ the\ soil\ (mg) \quad (7)$$

The total amount of N derived from the atmosphere (Total Ndfa in mg) was obtained for each pot by adding Ndfa (mg) in the plants and NdfR (mg). The amounts of C and N derived from the atmosphere were also expressed through the estimation of the specific CdfR and specific NdfR to express

Table 1: Functional traits of plants at vegetative stage (VS): Total dry mass, Shoot and Root Mass Ratio (SMR and RMR), Root Dry Matter Content (RDMC), Root C Content (RCC), Root N content (RNC), Root Mass Density (RMD), Root Length Density (RLD) and Root area.

	Vegetative Stage								
	Plant total dry mass (g)	**SMR ($g.g^{-1}$)**	**RMR ($g.g^{-1}$)**	**RDMC ($g.g^{-1}$)**	**RCC ($mg.g^{-1}$)**	**RNC ($mg.g^{-1}$)**	**RMD ($mg.cm^{-3}$)**	**RLD ($cm.cm^{-3}$)**	**Root area (cm^2)**
Wheat	4.70 ± 0.23 a	0.88 ± 0.02 ab	0.11 ± 0.02 bc	0.06 ± 0.02 ab	405.90 ± 4.12 a	9.20 ± 0.63 d	0.28 ± 0.07 b	1.23 ± 0.29 ab	408.2 ± 95.7 b
Faba bean	3.60 ± 0.29 ab	0.58 ± 0.01 c	0.42 ± 0.01 a	0.08 ± 0.01 a	409.21 ± 1.96 a	32.46 ± 0.37 a	0.76 ± 0.07 a	2.30 ± 0.21 a	1151.8 ± 107.4 a
Pea	2.81 ± 0.33 bc	0.81 ± 0.02 b	0.19 ± 0.02 b	0.11 ± 0.01 a	384.69 ± 10.49 a	31.61 ± 0.97 ab	0.28 ± 0.07 b	2.24 ± 0.52 ab	671.7 ± 157.5 ab
White clover	2.69 ± 0.13 c	0.89 ± 0.00 a	0.11 ± 0.00 c	0.04 ± 0.01 b	390.40 ± 15.95 a	27.24 ± 1.41 c	0.14 ± 0.01 b	1.19 ± 0.08 b	346.12 ± 23.3 b
Crimson clover	1.48 ± 0.10 d	0.81 ± 0.01 b	0.19 ± 0.01 b	0.10 ± 0.01 a	409.49 ± 7.76 a	27.78 ± 0.73 bc	0.14 ± 0.01 b	1.35 ± 0.09 b	358.3 ± 24.1 b
	*F=32.90 ****	*F=81.58 ****	*F=81.85 ****	*F=10.26 ****	*F=1.88 ns*	*F=140.3 ****	*F=29.43 ****	*F=4.62 ***	*F=15.70 ****

The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests (± *SE; n = 5; p <0.05*). Common letters on the same vertical line indicate that there is no significant difference between species.

Table 2: Functional traits of plants at reproductive stage (RS): Total dry mass, ears/pods/flowers dry mass, seed dry mass, Shoot and Root Mass Ratio (SMR and RMR), Root Dry Matter Content (RDMC), Root C Content (RCC), Root N content (RNC), Root Mass Density (RMD), Root Length Density (RLD) and Root area.

	Reproductive Stage										
	Plant total dry mass (g)	**Ears/pods/flowers dry mass (g)**	**Seed dry mass (g)**	**SMR ($g.g^{-1}$)**	**RMR ($g.g^{-1}$)**	**RDMC ($g.g^{-1}$)**	**RCC ($mg.g^{-1}$)**	**RNC ($mg.g^{-1}$)**	**RMD ($mg.cm^{-3}$)**	**RLD ($cm.cm^{-3}$)**	**Root area (cm^2)**
Wheat	10.44 ± 0.23 b	1.36 ± 0.06 b	3.79 ± 0.15 c	0.91 ± 0.01 b	0.09 ± 0.01 b	0.23 ± 0.02 a	408.59 ± 12.10 ab	8.36 ± 0.55 b	0.47 ± 0.02 b	4.39 ± 0.22 c	1222.8 ± 60.7 b
Faba bean	36.48 ± 5.38 a	3.34 ± 0.36 a	12.72 ± 0.92 a	0.82 ± 0.02 c	0.17 ± 0.02 a	0.12 ± 0.01 b	401.02 ± 12.09 b	25.71 ± 0.28 a	3.23 ± 0.74 a	11.30 ± 2.60 b	4550.1 ± 1048.3 a
Pea	12.03 ± 1.14 b	1.11 ± 0.15 b	6.77 ± 0.59 b	0.97 ± 0.01 a	0.03 ± 0.01 c	0.18 ± 0.03 ab	428.05 ± 20.60 ab	23.83 ± 1.67 a	0.20 ± 0.05 c	1.60 ± 0.37 d	464.8 ± 108.80 c
White clover	33.29 ± 1.43 a	1.08 ± 0.25 b	_	0.81 ± 0.02 c	0.19 ± 0.02 a	0.16 ± 0.01 b	439.25 ± 9.57 ab	25.21 ± 0.83 a	3.16 ± 0.42 a	41.52 ± 5.47 a	11046.1 ± 1454.7 a
Crimson clover	36.76 ± 1.48 a	4.51 ± 0.56 a	_	0.86 ± 0.01 c	0.14 ± 0.01 a	0.15 ± 0.01 b	430.84 ± 2.89 a	25.22 ± 0.68 a	2.52 ± 0.06 a	30.62 ± 0.74 a	8574.6 ± 208.4 a
	*F=32.37 ****	*F=28.20 ****	*F=146.10 ****	*F=33.21 ****	*F=33.21 ****	*F=8.04 ****	*F=1.97 ns*	*F=81.03 ****	*F=18.84 ****	*F=50.57 ****	*F=40.20 ****

The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests (± *SE; n = 5; p <0.05*). Common letters on the same vertical line indicate that there is no significant difference between species.

rhizodeposition independent of photosynthesis and biological N fixation. As indicated in equation 8 and 9:

Specific CdfR = CdfR (mg)/Total labeled C in the pot (g) (8)

Specific NdfR = NdfR (mg)/ total Ndfa in the pot (g) (9)

2.7. Statistical analyses

Statistical analyzes were carried out using the software R (R Development Core Team, 3.5.0 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. In order to establish relationships between functional traits and C and N rhizodeposition principal component analyses (PCAs) were performed. The Kaiser–Meyer–Olkin measure (KMO) of sampling adequacy and Bartlett's test of sphericity were used to test the validity of PCA. Correlations between functional traits were assessed with Pearson correlation tests. Results with wheat were used for statistics dealing with C fixation and rhizodeposition but not with N rhizodeposition. Linear models were also used to analyze the relationships between the amounts of C and N rhizodeposited and plant traits. The AIC (Akaike Information Criterion) approach was used to obtain an estimation of the best fitting model (Tasset *et al*., 2019).

2. Results

2.1. Plants traits

Total biomass varied strongly among species for both development stages ($F= 32.90; p <0.001$ and $F= 32.37; p <0.001$ respectively) (**Table 1 and 2**). At the vegetative stage (VS), wheat had produced more biomass (4.70 ± 0.23 g) than pea and clovers. Conversely, at the reproductive stage (RS), faba bean, white clover and crimson clover produced more biomass than pea and wheat. Concerning reproductive organs, faba bean produced more seed biomass than pea and wheat. The proportions of biomass allocation to shoot and root parts were also determined. At VS, faba bean allocated the lowest proportion of its biomass to the shoot with the lowest shoot mass ratio (SMR 0.58 ± 0.01 $g.g^{-1}$) and thus a higher biomass allocation to the root (0.42 ± 0.01 $g.g^{-1}$) compared to the other species. At RS, the highest allocation of root biomass was found for white clover, faba bean and crimson clover compared to wheat and pea. RDMC also differed between species and their developmental stage. At RS, wheat (0.23 ± 0.02 g. g-1) had the highest RDMC compared to the other species except for pea. All species exhibited similar Root C Content (RCC) for the first harvest, but differences were observed at RS. Crimson clover presented higher RCC compared to faba bean but was not significantly different from the other species. Regarding the RNC, legumes were found to have higher N

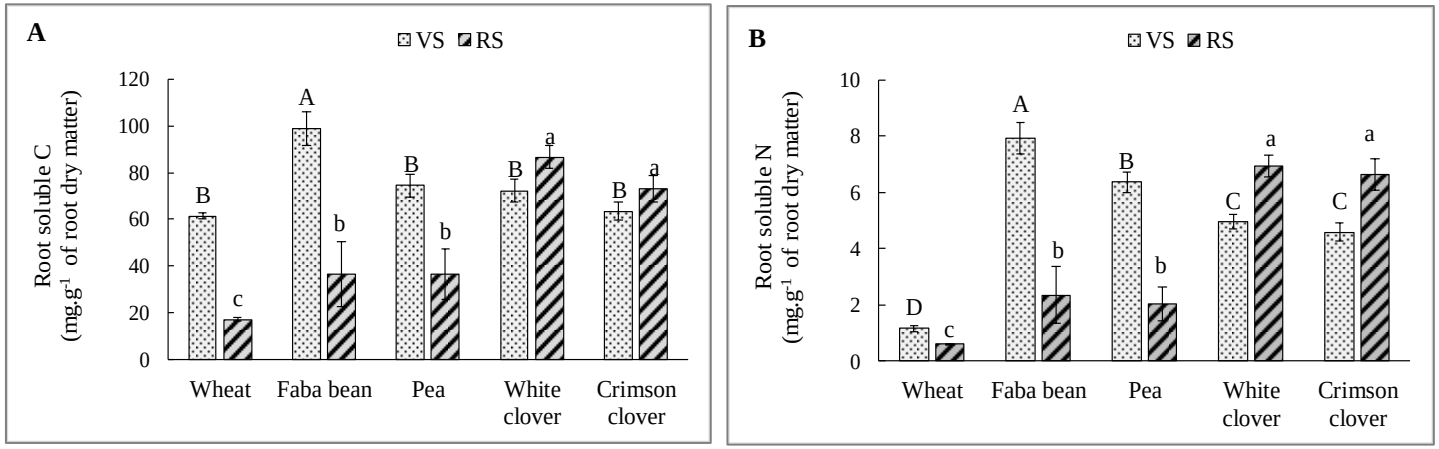


Figure 2: Root soluble C (A) and soluble N content (B) at vegetative stage and reproductive. The histograms show the means ± standard errors (*n = 5*). The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests (*p <0.05*), common letters indicate that there is no significant difference between species (uppercase letters for VS and lowercase letters for RS). VS: Vegetative Stage; RS: Reproductive Stage.

Table 3: ^{13}C and ^{15}N tracer distribution (atom% excess) in the different compartment.

	Shoot		**Ears/pods/flowers**		**Seed**		**Root**		**Soil**	
	VS	**RS**	**VS**	**RS**	**VS**	**RS**	**VS**	**RS**	**VS**	**RS**
^{13}C atom% excess										
Wheat	0.8365 ± 0.0181 a	0.6657 ± 0.0238 b	-	0.7761 ± 0.0100 a	-	0.7829 ± 0.208 b	0.6848 ± 0.0439 ab	0.5400 ± 0.0461 ab	0.0093 ± 0.0014 a	0.0177 ± 0.0018 cd
Faba bean	0.8025 ± 0.0371 a	0.7164 ± 0.0310 ab	-	0.7369 ± 0.0125 ab	-	0.7409 ± 0.0217 b	0.7162 ± 0.0440 ab	0.7046 ± 0.0223 a	0.0050 ± 0.0008 ab	0.0350 ± 0.0053 bc
Pea	0.8606 ± 0.0130 a	0.8344 ± 0.0211 a	-	0.8066 ± 0.0334 ab	-	0.8490 ± 0.0133 a	0.6513 ± 0.0277 b	0.6160 ± 0.0382 ab	0.0038 ± 0.0012 ab	0.0119 ± 0.0016 d
White clover	0.8863 ± 0.0409 a	0.5885 ± 0.0132 c	-	0.6033 ± 0.0482 b	-	-	0.7966 ± 0.0300 a	0.6025 ± 0.0138 b	0.0041 ± 0.0006 b	0.0502 ± 0.0041 ab
Crimson clover	0.9115 ± 0.0277 a	0.5371 ± 0.0246 c	-	0.2989 ± 0.0172 c	-	-	0.7694 ± 0.0353 ab	0.5916 ± 0.0308 ab	0.0032 ± 0.0007 b	0.0673 ± 0.0062 a
	F=2.61	*F=30.38 ****		*F=67.83 ****		*F=10.34 ***	*F=3.28 **	*F=4.27 **	*F=7.61 ****	*F=38.83 ****
^{15}N atom% excess										
Wheat	0.0251 ± 0.0016 a	0.0292 ± 0.0109 abc	-	0.0213 ± 0.0037 a	-	0.0298 ± 0.0029 a	0.0271 ± 0.0022 a	0.0275 ± 0.0051 a	0.0167 ± 0.0004 a	0.0153 ± 0.0008 a
Faba bean	0.0075 ± 0.0015 b	0.0025 ± 0.0005 b	-	0.0010 ± 0.0005 cd	-	0.0009 ± 0.0001 c	0.0094 ± 0.0007 c	0.0102 ± 0.0014 bc	0.0162 ± 0.0010 a	0.0153 ± 0.0013 a
Pea	0.0092 ± 0.0004 b	0.0071 ± 0.0011 a	-	0.0062 ± 0.0016 b	-	0.0032 ± 0.0006 b	0.0120 ± 0.0004 ab	0.0149 ± 0.0012 b	0.0160 ± 0.0003 a	0.0171 ± 0.0004 a
White clover	0.0092 ± 0.0012 b	0.0074 ± 0.0011 a	-	0.0029 ± 0.0005 bc	-	-	0.0133 ± 0.0006 ab	0.0152 ± 0.0012 b	0.0169 ± 0.0002 a	0.0150 ± 0.0006 a
Crimson clover	0.0089 ± 0.0016 b	0.0005 ± 0.0002 c	-	0.0011 ± 0.0001 d	-	-	0.0143 ± 0.0005 b	0.0085 ± 0.0003 c	0.0166 ± 0.0005 a	0.0174 ± 0.0006 a
	*F=38.80 ****	*F=6.82 **		*F=28.22 ****		*F=108.30 ****	*F=46.76 ****	*F=11.06 ****	*F=0.61 ns*	*F=2.47 ns*

The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests (± *SE; n = 5; p <0.05*). Common letters on the same vertical line indicate that there is no significant difference between species.

content than wheat. At VS, faba bean and pea had the highest RNC, followed by crimson and white clovers. At RS, no significant variation was observed between legumes. The highest Root Mass Density (RMD) was observed for faba bean for the first harvest and for the second one faba bean and the clovers presented the highest RMD. The same observations were made with root area. Pea and wheat exhibited very low RMD and Root Length Density for both harvests. Root soluble C and N content were also determined at VS and RS (**Figure 2**). The highest root soluble C content was observed for faba bean at VS (**Figure 2A**) conversely at RS white and crimson clover presented the highest amount. Regarding root soluble N content, the same observation was made (**Figure 2B**). These traits were considerably influenced by the development stage especially for faba bean, wheat and pea ($F= 37.50; p <0.001$ for soluble C and $F= 21.05; p <0.001$).

2.2. ^{13}C and ^{15}N tracer partitioning

The IRMS data obtained from the samples before and after ^{13}C labeling allowed us to determine the atom excess % of each compartment (**Table 3**). Incorporation of atmospheric $^{13}CO_2$ from the atmosphere resulted in an increase of ^{13}C atom % excess in plant organs and soil. As expected, the highest ^{13}C enrichments were observed in plant shoots and the lowest one in the soil. In shoots (leaves and stems), no significant variation was observed at VS. At RS, the highest ^{13}C atom% excess was observed in pea, faba bean and wheat. A similar pattern was observed for reproductive organs (ears/pods/flowers), and the lowest ^{13}C atom% excess was observed for crimson clover. Among the seeds, pea had seeds richer in ^{13}C (0.8490 ± 0.0133 %) compared to wheat and faba bean. At vegetative stage (VS), the soil ^{13}C atom% excesses ranged from 0.0032% to 0.0093%. Wheat presented higher enrichment compared to the clovers but was not significantly different from pea and faba bean. At reproductive stage (RS), the soil was more enriched in ^{13}C under crimson clover (0.0673 ± 0.0062%) followed by white clover (0.0502 ± 0.0041%) and faba bean (0.0350 ± 0.0053%) compared to pea and wheat. Regarding ^{15}N, the incorporation of atmospheric N_2 with a low ^{15}N content resulted in a decrease of ^{15}N atom % excess in legume organs. As a result, the greatest ^{15}N atom excess % was observed in wheat organs in both harvests.

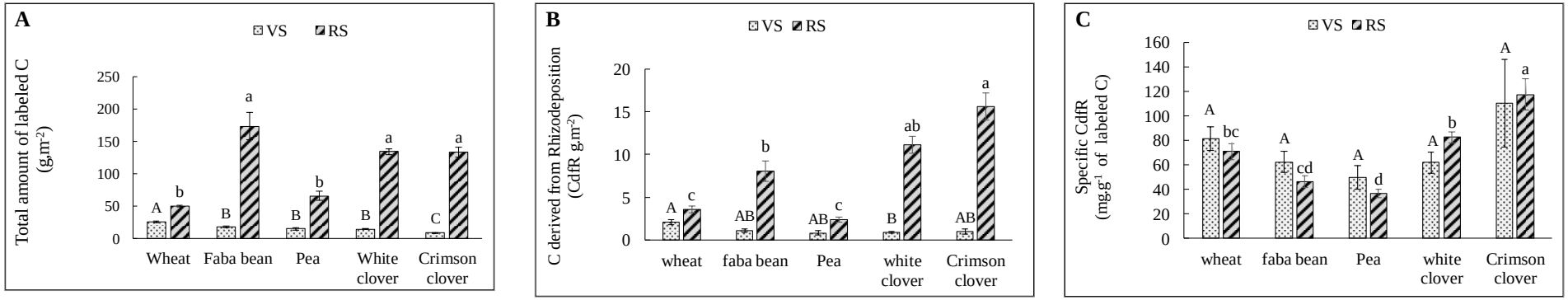


Figure 3: (A) Total amount of labeled C in plant soil system; (B) C derived from rhizodeposition (CdfR) at vegetative stage and reproductive stage per unit area of soil; (C) Specific C derived from rhizodeposition (Specific CdfR) at vegetative stage and reproductive stage per unit of fixed C. The histograms show the means ± standard errors (*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 species (uppercase letters for VS and lowercase letters for RS). VS: Vegetative Stage; RS: Reproductive Stage.

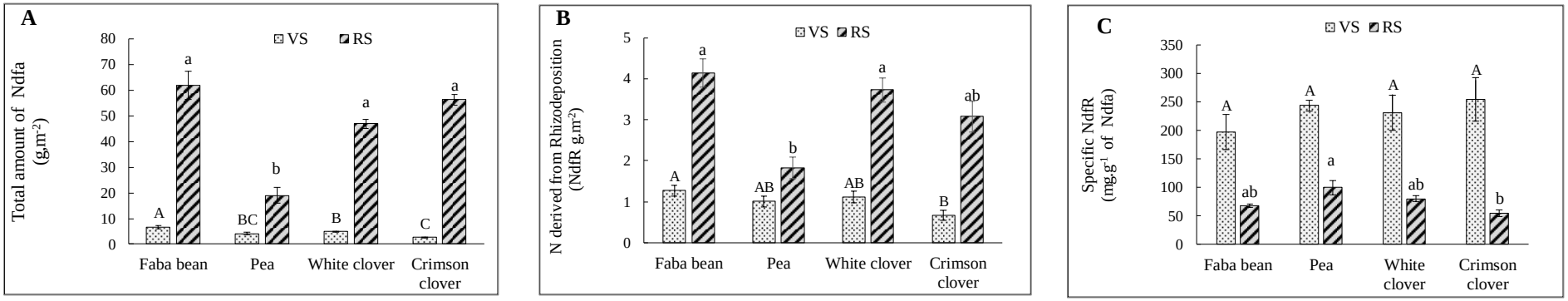


Figure 4: (A) Total amount of fixed N into the plant soil system; (B) N derived from rhizodeposition (NdfR) at vegetative stage and reproductive stage per unit area of soil; (C) Specific N derived from rhizodeposition (Specific NdfR) at vegetative stage and reproductive stage per unit of fixed N. The histograms show the means ± standard errors (*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 species (uppercase letters for VS and lowercase letters for RS). VS: Vegetative Stage; RS: Reproductive Stage.

2.3.Atmospheric C, N fixation and rhizodéposition

$^{13}CO_2$ labeling was performed once a week all along the growing period and was used to estimate total amounts of labeled C in plants and soil. During the vegetative period, wheat presented the highest amount of labeled C (**Figure 3A**), and small variations between species were observed for C exported to the soil at VS per unit of soil area (**Figure 3B**). In contrast, great differences were observed at the end of the growing period (**Figure 3A**). The species with the larger dry mass, faba bean and both clovers, tended to fix more C and export more C to the soil (Figure 3B). The lowest amounts of labeled C were observed for pea (66 ± 7 $g.m^{-2}$) and wheat (50 ± 1 $g.m^{-2}$). The amounts of soil C derived from rhizodeposition (CdfR) were then expressed as proportion of total labeled C (**Figure 3C**) which was designated specific CdfR in $mg.g^{-1}$. At VS, no significant difference was observed between species and there was no effect of development stage ($F= 0.10; p > 0.05$). The highest specific rhizodeposition was observed for crimson clover at RS. C rhizodeposition by wheat was very low when expressed per unit of area (Figure 3B) but similar with faba bean when expressed per amount of labeled C (Figure 3C).

As for C, the amounts of N derived from the atmosphere (Ndfa) increased between the 2 development stages ($F= 721.78; p <0.001$; **Figure 4A**). At the end of the growing period, the highest amounts were observed for faba bean, crimson clover and white clover. The expression of NdfR per unit of pot area, showed that crimson clover presented the lowest NdfR compared to faba bean at VS (**Figure 4B**). Faba bean and white clover had higher NdfR compared to pea at RS (crimson clover was found to be intermediate). The calculation of specific NdfR shows that there was no significant difference at VS (**Figure 4C**) and this NdfR dropped considerably during plant development for each species ($F= 130.72; p >0.001$). In contrast at RS, specific NdfR was higher under pea (99.21 ± 12.09 mg. g^{-1} total Ndfa) compared to crimson clover (57.67 ± 6.13 mg. g^{-1}), the two other species are in the intermediate range.

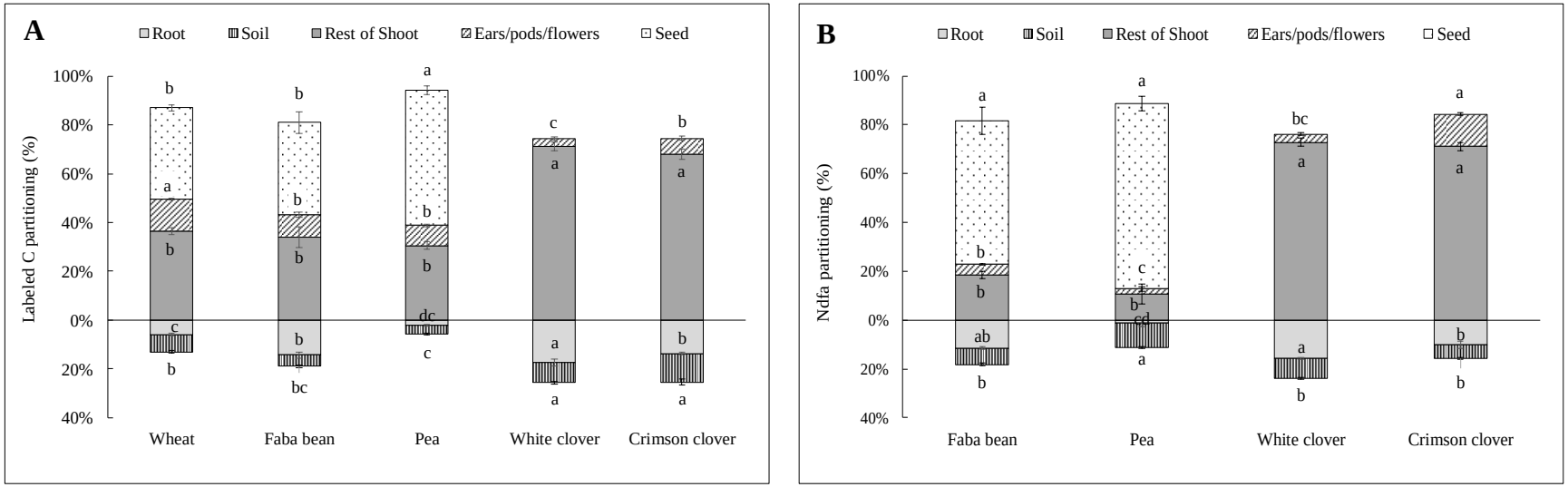


Figure 5: (A) Labled C partitioning among the different compartments; (B) Ndfa partitioning among the different compartments. The letters correspond to mean comparisons of Tukey's tests (*p <0.05*), common letters indicate that there is no significant difference between the compartments.

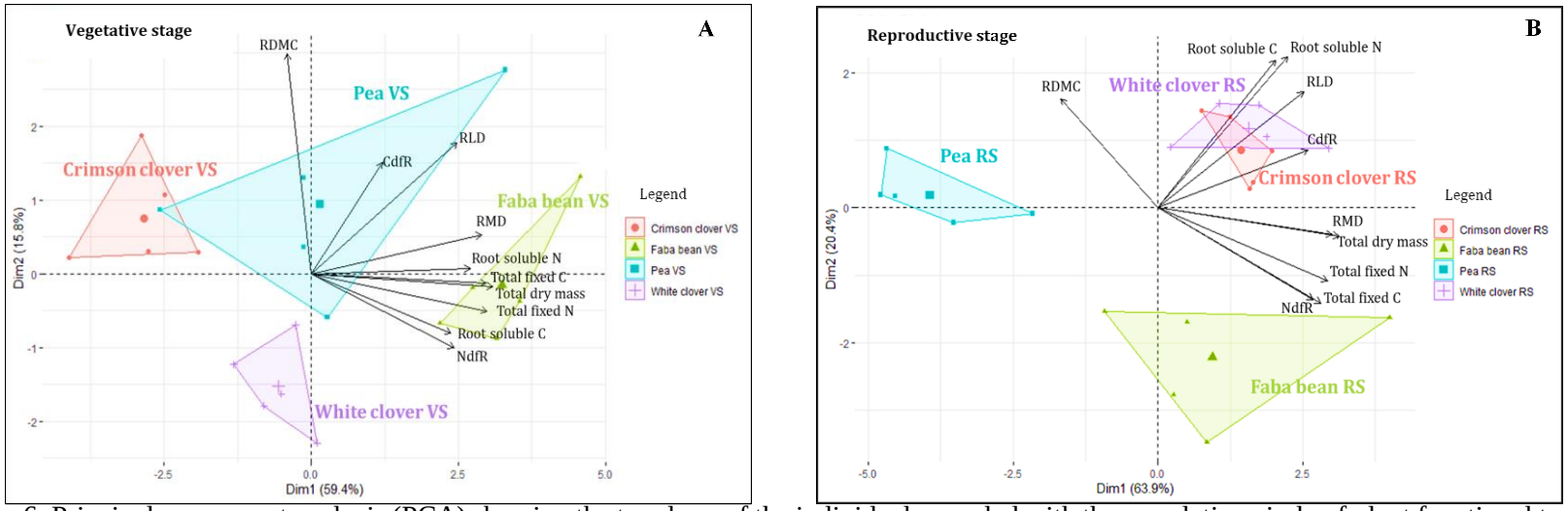


Figure 6: Principal component analysis (PCA) showing the typology of the individuals coupled with the correlation circle of plant functional traits and C and N rhizodeposition (A) at vegetative stage; (B) at reproductive stage. RDMC: Root Dry Matter Content; RMD: Root Mass Density; RLD: Root Length Density; CdfR: C derived from Rhizodeposition; NdfR: N derived from Rhizodeposition; VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. For the data at VS, the Kaiser-Meyer-Olkin measure of sampling adequacy (KMO = 0.69) and Bartlett's test of sphericity was statistically significant (*p < 0.001*). For the at RS, KMO = 0.76 and Bartlett's test of sphericity was also statistically significant (*p < 0.001*).

2.4. Atmospheric C and N partitioning

The proportions of C and N stored in the different compartments were deduced at the end of the growing period from the total amounts of C and N incorporated from the atmosphere **(Figure 5)**. On average between 74 and 94% of the labeled C was found in the aboveground parts of the plants (Figure 5A). With their lower C rhizodeposition, pea and wheat showed the highest proportions of labeled C in their aboveground parts especially in the seeds. Conversely, the clovers incorporated the lowest proportion of C aboveground. In the belowground compartment (roots + soil), white clover (26%), crimson clover (25%) and faba bean (19%) allocated the most proportions of the labeled C to the soil compared to wheat (13%) and pea (6%). In the soil clovers presented the highest proportion of labeled C.

The main sinks for N derived from the atmosphere were also shoots as between 82 and 89% of Ndfa was exported to the shoots during plant growth (Figure 5B). In pea and faba bean, this N was mainly recovered in seeds and in the vegetative organs (leaves and stems) in clovers. Concerning the belowground compartment (roots + soil), we found the lowest proportion of Ndfa under pea (11%) compared to the other species. Conversely, in the soil pea showed the highest proportion of Ndfa.

2.5. Relationship between rhizodeposition and plant Traits

In order to analyze the relationships between rhizodeposition and plant functional traits, a principal component analysis (PCA) was performed for both harvests (**Figure 6**). Regarding the vegetative stage (**Figure 6A**), the first axis of the PCA explains 59.4% of the variability of the data and the second axis explains 15.8%. The first axis separates faba bean from pea and even more from crimson clover. When coupled with the correlation circle, faba bean is found to have a higher NdfR which is mainly associated with fixed C and N, soluble C and N content of roots and biomass produced. Concerning CdfR, white clover tends to have a lower CdfR than other species at the vegetative stage and associated with a low RDMC (second axis). The discrimination of the species differed at the reproductive stage in comparison to the vegetative stage (**Figure 6B**). The first axis of the PCA explains 63.9% of the variation in the data and the second axis contributes to 20.4%. The first axis allows the discrimination between pea and the other species (clovers and faba bean). In particular, it appears that the discrimination of faba bean is related to the NdfR which is linked to the RMD, to the biomass produced, and to the quantities of C and N fixed. This NdfR was negatively correlated with RDMC. Conversely, clovers are distinguished by a higher CdfR associated with root soluble C and N content, RLD and in a lesser extent to total fixed C.

Table 4: Pearson correlation matrix showing plant traits and soil C derived from rhizodeposition (CdfR) relationships according to the development stage.

	Total Dry mass (g)	RDMC ($g.g^{-1}$)	RCC ($mg.\ g^{-1}$)	RNC ($mg.\ g^{-1}$)	Root C:N	RMD ($mg\ .cm^{-3}$)	RLD ($cm.cm^{-3}$)	Root Solube C ($mg.g^{-1}$)	CdfR ($g.m^{-2}$)	Total labeled C (mg)	Specific CdfR ($mg.\ g^{-1}$)
Vegetative Stage											
CdfR ($g.m^{-2}$)	**0.65*** **	-0.17	0.36	**-0.65*** **	**0.75*** **	0.14	0.02	-0.24	1.00		
Total labeled C (mg)	**0.97*** **	-0.26	0.05	**-0.68*** **	**0.76*** **	0.36	0.17	-0.01	**0.71*** **	1.00	
Specific CdfR ($mg.g^{-1}$)	-0.16	0.11	**0.44***	-0.13	0.15	-0.14	-0.11	-0.22	**0.57** **	-0.11	1.00
Reproductive Stage											
CdfR ($g.m^{-2}$)	**0.81*** **	**-0.45***	0.17	**0.49***	**-0.43***	**0.70*** **	**0.80*** **	**0.64** **	1.00		
Total labeled C (mg)	**0.95*** **	**-0.71*** **	-0.15	**0.67*** **	**-0.64*** **	**0.91*** **	**0.54** **	**0.51** **	**0.66*** **	1.00	
Specific CdfR ($mg.g^{-1}$)	0.39	-0.02	0.26	0.04	0.04	0.30	**0.64*** **	**0.43***	**0.83*** **	0.16	1.00

Significant correlations are indicated in bold (*n = 20*): **p < 0.05; **p<0.01; *** p<0.001*. Color code for the correlation coefficients: -1< (light gray) < 0 (white) < -1 (dark gray)

Table 5: Pearson correlation matrix showing plant traits and soil N derived from rhizodeposition (NdfR) relationships according to the development stage.

	Total dry mass (g)	RDMC ($g.g^{-1}$)	RCC ($mg.g^{-1}$)	RNC ($mg.g^{-1}$)	Root C:N	RMD ($g.cm^{-3}$)	RLD ($cm.cm^{-3}$)	Root Soluble N ($mg.g^{-1}$)	NdfR ($g.m^{-2}$)	Total Fixed N (mg)	Specific NdfR ($mg.g^{-1}$)
Vegetative Stage											
NdfR ($g.m^{-2}$)	**0.74*** **	-0.39	-0.19	0.23	-0.36	**0.52***	**0.49***	**0.47***	1.00		
Total Fixed N (mg)	**0.95*** **	-0.32	0.04	**0.46***	**-0.47***	**0.83*** **	**0.59** **	**0.66** **	**0.67** **	1.00	
Specific NdfR ($mg.g^{-1}$)	-0.35	0.04	-0.26	-0.27	0.14	-0.37	-0.15	-0.27	0.29	**-0.46***	1.00
Reproductive stage											
NdfR ($g.m^{-2}$)	**0.79*** **	**-0.61** **	-0.34	**0.50***	**-0.63** **	**0.84*** **	**0.50***	0.26	1.00		
Total Fixed N (mg)	**0.95*** **	**-0.58** **	-0.28	**0.45***	**-0.55***	**0.84*** **	**0.46***	**0.40***	**0.82** **	1.00	
Specific NdfR ($mg.g^{-1}$)	**-0.66** **	0.27	-0.15	-0.26	0.11	**-0.44***	-0.30	**-0.44***	-0.27	**-0.71** **	1.00

Significant correlations are indicated in bold (*n = 20*): **p < 0.05; **p<0.01; *** p<0.001*. Color code for the correlation coefficients: -1< (light gray) < 0 (white) < -1 (dark gray)

Table 6: Linear models for CdfR and NdfR involving functional traits. Only models with the lower AIC are shown (**p < 0.05; **p<0.01; *** p<0.001)*

	Intercept	Total Fixed C (mg)	Total Fixed N (mg)	RLD ($cm.cm^{-3}$)	RMD ($g.cm^{-3}$)	RNC ($mg.g^{-1}$)	Root Soluble C ($mg.g^{-1}$)	Root Soluble N ($mg.g^{-1}$)	R^2	F value
Vegetative Stage										
CdfR ($g.m^{-2}$)	-4.1108	0.0053	-	-	-	-	-0.0117	-	0.69***	15.64
NdfR ($g.m^{-2}$)	0.4264	-	0.0089	-	-	-	-	-	0.44**	14.56
Reproductive stage										
CdfR ($g.m^{-2}$)	-1.4842	0.0056	-	0.2732	ns	-	-	-	0.75***	20.68
NdfR ($g.m^{-2}$)	-1.3502	-	0.0015	0.0359	289.63	0.1310	-	-0.2644	0.88***	20.07

Only models with the lower AIC are shown (**p < 0.05; **p<0.01; *** p<0.001*)

A correlation matrix was established (**Table 4 and 5**) and confirmed the strong link between the amount of photosynthetically fixed C and C rhizodeposition for both harvest (VS *r = 0.71; p<0.001*; RS *r = 0.66; p< 0.001*). Similarly, the link between Biological N fixation and N rhizodeposition was confirmed for both stages (*r = 0.67; p<0.01* and *r = 0.82; p<0.01* for VS and RS respectively). At RS, CdfR was also positively correlated with traits linked to plant growth such as RMD and RLD and also root soluble C content and negatively correlated with RDMC (*r = -0.45, p < 0.05*; not significant at VS). RMD and RLD were also correlated with NdfR for both harvests (**Table 5**), showing the impact of root morphology on N rhizodeposition. The root soluble N content was positively related to NdfR only at VS. Regarding specific CdfR, it was only positively correlated with RCC (r = 0.44; p < 0.05) et RLD (r = 0.64; p < 0.001) respectively at VS and RS. Conversely, the specific NdfR was negatively correlated with most of the plant trait especially to RMD and total Ndfa at RS.

Linear models were used to analyze the relationships between CdfR or NdfR and functional traits. For the first harvest, the best fitting model (i.e. the model with the lowest AIC) included the amount of photosynthetically-fixed C, RCC and Root Soluble C (**Table 6**) and explained 69 % of the variability in CdfR. In this model, Root Soluble C was negatively correlated with CdfR Similarly, variation in NdfR was best explained by a model including only the amount of Biologically-fixed N but explained only 44 % of the variability. For the second harvest, the best fitting model for the estimation of CdfR included the amount of C fixed, RLD and RMD and explained 75 % of the variability. A greater number of root traits was needed to obtain the best fitting model estimating NdfR for the last harvest (Table 6). This model included: Total Fixed N, RLD, RMD, RNC, and Root Soluble N and explained 88% of the variability.

3. Discussion

Four legume species of agronomic interest providing ecosystem services in field crops and pastures were used in this study, and the service of carbon storage and soil nitrogen fertilization by rhizodeposition was addressed. Very few studies have been performed to measure simultaneously rhizodeposition of both C and N (Wichern et al., 2007; Wichern et al., 2008; Hupe, 2016). The methodology developed in the present study allows the measurement of fluxes of C and N from the atmosphere to the soil in controlled conditions all along plant growth. The ^{13}C labeling performed weekly and the ^{15}N dilution method allowed the measurement of C and N fluxes from the atmosphere to the soil through photosynthesis or biological N fixation and their rhizodeposition. Although our study did not estimate C and N rhizodeposited under natural conditions, our experimental design provided accurate comparative data to assess differences among species for both C and N. However, the

methodology developed here did not allow us to measure total rhizodeposition as plant and microbial respiration of ^{13}C were not measured and our results relate to net rhizodeposition (Pausch and Kuzyakov, 2018). The efficiency of rhizodeposition has been commonly reported per unit of plant biomass (total dry mass or root dry mass), but few studies have reported the expression per unit of assimilated C or N (De Graaff et al., 2007; Baptist et al., 2015; Bowsher et al., 2018; Zhou et al., 2020). Various informations concerning rhizodeposition of the various species can be gained through estimation of rhizodeposition per unit of area or through estimation of specific rhizodeposition, where rhizodeposition is expressed per unit of atmospheric C or N incorporated in the plant-soil system. However, estimations per unit area are still questionable because plant density varies strongly with growth conditions and extrapolation of the results to the field must be taken carefully.

3.1. Relationship between C rhizodeposition and N rhizodeposition

As postulated in our first hypothesis, C rhizodeposition was linked with N rhizodeposition. This relationship can be explained with the strong relationship of both C and N rhizodeposition with plant growth. Plants with high growth rate show large C fixation and biological N fixation. In line with previous reports (Nguyen, 2009; Pausch and Kuzyakov, 2018; Semchenko et al., 2021), a strong positive relationship between the ability of plants to fix CO_2 through photosynthesis and the amount of C that they release into the soil is shown with the five species studied here. Similarly, a strong relationship was observed between total amount of N derived from the atmosphere and total amounts of rhizodeposited N by the four legumes. This result support previous studies showing that the release of N into the soil by legumes is also associated with their physiological function allowing them to use atmospheric N (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001; Wichern et al., 2008; Fustec et al., 2010; Chalk et al., 2014). Thus, our study demonstrates that C rhizodeposition is strongly controlled by photosynthesis and that N rhizodeposition is strongly controlled by biological N fixation. As a result, total C rhizodeposition increased with N rhizodeposition.

However, we observed that only small variations of specific C rhizodeposition was observed between VS and RS while a strong decrease of specific N rhizodeposition was observed. This result is consistent with the increasing C:N of rhizodeposits between the 2 development stages (especially with forage legumes) with an average ratio of 1.03 at VS and 2.89 at RS. A recent study on soybean and oats shows a higher C:N ratio in soybean rhizodeposits at maturity and suggests a more C-rich rhizodeposits and N reabsorption during growth (Zang et al., 2018). This finding confirms that plant rhizodeposition is not directly related to nutrient acquisition and it is species dependent (Baptist et al., 2015), as also evidenced on the Principal Component

Analysis, showing that C rhizodeposition during reproductive growth depends on traits related to nutrient acquisition and also traits related to root morphology. Root decomposition is most pronounced during reproductive growth and may contribute greatly to C rhizodeposition in the soil as exudation decreases per unit of root biomass with plant age and, contribution of root senescence to rhizodeposition increases with plant age (Pausch et al., 2013; Baptist et al., 2015; Pausch and Kuzyakov, 2018).

3.2. Rhizodeposition efficiency and plant species

Both C and N rhizodeposition substantially differed across species, especially for the last harvest. Compared with wheat and pea, both clover species and faba bean showed larger amounts of rhizodeposited C and N per m^2 at RS, in line with previous works showing high rhizodeposition of these species (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001; Paynel and Cliquet, 2003; Paynel et al., 2008; Rasmussen et al., 2019; Wang et al., 2020). These differences between species are linked to various abilities for C and N fixation and to other traits related to growth. The low amount of C rhizodeposited by pea during reproductive growth can be explained by the low amount of total C fixed. Similarly, the low amount of N rhizodeposited by this species can also be explained by the low amount of N derived from the atmosphere. However, a low efficiency of C rhizodeposition is also observed for pea and faba bean when results are expressed as a proportion of total C fixed (specific CdfR) during plant growth. In contrast, the specific CdfR showed that forage legumes were the most efficient for C rhizodeposition. These observations suggest that C and N rhizodeposition are controlled by different traits, particularly during reproductive growth. The calculation of specific rhizodeposition, where C and N rhizodeposition was expressed as a proportion of total amounts of the elements incorporated in the plant and soil system allowed us to investigate the impact of these traits independently of C and N fixation.

Works with various species have shown that about 40% of the photosynthetically-fixed C is allocated to the belowground compartment and 11% of this C contributes to rhizodeposition (Kuzyakov and Domanski, 2000; Jones et al., 2009). Only 6 % of labeled C was found belowground at RS for pea compared with 13 % for wheat, 19% for faba bean and 25% and 26% for crimson clover and white clover. This can be explained by the low Root Mass Ratio, linked with the long-term breeding of pea and wheat for aboveground biomass production, resulting in a reduction in belowground C allocation (Pausch and Kuzyakov, 2018). The large allocation of C belowground seen for clover confirms previous studies with pasture plants (Kastovska and Santruckova, 2007; Kuzyakov and Domanski, 2000). Pasture plant are described to allocate more of their assimilated C to the belowground, especially to store reserves

for regrowth, compared to field crops, which export to the aboveground organs (Grayston et al., 1997; Kuzyakov and Domanski, 2000; Pausch and Kuzyakov, 2018). This could explain the efficiency of forage legumes for CdfR as reflected by their high root biomass and soluble C content. We have shown recently that this large rhizodeposition by forage species may stimulate soil microbial communities (Kanté et al., 2021).

A different pattern was observed for N and the specific NdfR showed that pea was the most performant species and the lowest specific NdfR was observed under crimson clover. Regarding the allocation of N to the different compartments, the same trends are observed as for C, in particular for white clover (24%) and faba bean (18%). These proportions are respectively 16% and 11% for crimson clover and pea. Other studies also report various proportions depending on the species, between 11 and 53% (Khan et al., 2007; Mahieu et al., 2007). Specific rhizodeposition estimated in the present work is probably an underestimate of rhizodeposition in the field as root growth may have been constrained by pot size, particularly during plant reproductive development (Hupe et al., 2019). Plant functional traits were investigated to understand the determinism of C and N rhizodeposition.

4.3. Rhizodeposition and plant functional traits

The interspecific differences can be explained by plant functional traits, as shown for grassland species (Baptist et al., 2015; Guyonnet et al., 2018; Henneron et al., 2020). Plant traits are described as morphological, biochemical, physiological, structural and phenological characteristics that are representative of their functioning and influence their performance including growth, survival and reproduction (Violle et al., 2007; Nock et al., 2016). These traits are studied in relation to several ecosystem processes and services (Garnier and Navas, 2012; Garnier et al., 2016; Faucon et al., 2017).

As postulated in the second hypothesis, rhizodeposition was associated with plant morphological and physiological traits, particularly root traits and traits associated with resource acquisition. Clovers showed increased biomass production during reproductive growth, high quality tissues with low C:N ratio and low RDMC. The characteristics of faba bean were close to those of clovers, while pea and wheat exhibited slower growth and higher C:N ratios during this period, associated with seed formation.

It is widely established that root senescence is one of the main processes involved in rhizodeposition (Jones et al., 2019) and this contribution is confirmed by the strong positive correlation between rhizodeposition (CdfR and NdfR) and root mass density. The findings indicated that, as the plants mature, CdfR and NdfR were negatively correlated with RDMC ($r = -0.45, p < 0.05$ for C and $r = -0.61, p < 0.01$ *for N*) suggesting an increase in rhizodeposition

with root senescence. Roots with a lower Dry Matter content tend to exhibit a greater decomposability and RDMC was shown to be negatively correlated with fine root decomposition in a previous study (Prieto et al., 2016). The specific CdfR measured after the second harvest was positively correlated with root soluble C content ($r = 0.43$, $p < 0.05$) supporting the contribution of both root senescence and exudation of soluble compound to the efficiency of C rhizodeposition. Additionally, plants that produce the longest roots tend to export more C and N to the soil as evidenced by the contribution of RLD in the best fitting models, particularly during reproductive development. Because root exudation is known to process along a concentration gradient, it has already been shown that the amount of C exuded by roots is closely related to the concentration of root soluble sugars (Dilkes et al., 2004; Jones et al.; 2009). Both clover species with high root soluble C content and high RLD exhibited a high specific C rhizodeposition during reproductive growth especially with crimson clover. We found no evidence of a relationship between rhizodeposition and root soluble C content during vegetative growth but the correlation observed between Root soluble C content and specific CdfR shows that rhizodeposition may occur also through exudation during reproductive growth.

Slightly different results were obtained concerning specific N rhizodeposition. However, N rhizodeposition appeared also to be controlled by resource acquisition, root exudation and root development. A positive correlation was observed between root soluble N content and NdfR in $g.m^{-2}$ for the first harvest whereas no similar relationship was observed at the second harvest. This result confirms a high contribution of soluble compound through exudation for N rhizodeposition in young legume plants and a lower one for old plants (Arcand et al., 2013). We can hypothesize that during reproductive growth, NdfR is more modulated by root debris, as confirmed by the correlation between root C:N and N rhizodeposition in $g.m^{-2}$. Intriguing negative correlations were observed between the specific NdfR and root traits (RMD, root soluble N) as high soluble N content may increase exudation. It is known that C and N flows in the rhizosphere is bi-directionnal (Jones et al., 2009). High soluble N content observed in both clover species could be explained by efficient reuptake of N compounds, as already shown for white clover (Lesuffleur and Cliquet, 2010). Despite the higher N fixation for faba bean and clovers compared to pea, the latter showed a higher specific NdfR. Considering the belowground compartment, pea NdfR accounted for 91% of the N allocated to belowground (1% in root and 10% in soil) and may explain the efficiency of pea (largely due to root decomposition). This finding is in accordance with the analysis of Arcand et al. (2013) on pea, showing that at maturity, N rhizodeposition was comprised predominantly of N associated with

root and nodule turnover. Some studies also suggest that the rhizodeposition profile of pea shifts at the reproductive stage with a decrease in C rhizodeposition (low allocation of C to the belowground compartment) and an increase in N rhizodeposition (Jensen, 1996; Wichern et al., 2007; Arcand et al., 2013; Romillac, 2015). This suggestion is supported in this study by the lower C:N ratio of rhizodeposits for pea indicating N-rich rhizodeposits compared to the other species. Senescence of N rich nodules may have contributed to this rhizodeposition.

4. Conclusion

We developed in this work a double labeling approach allowing the measurement of C and N fluxes from the atmosphere to the soil through photosynthesis and biological N fixation all along legume growth. Our study demonstrates that C rhizodeposition is strongly controlled by photosynthesis and that N rhizodeposition is strongly controlled by biological N fixation. Because these processes are linked to plant growth C rhizodeposition tended to increase with N rhizodeposition but C:N ratios of rhizodeposits tended to decrease during reproductive growth. High C and N inputs were seen through rhizodeposition by faba bean, white and crimson clovers. The lower C inputs observed for wheat and pea and the lower N input observed for pea was explained by a lower resource acquisition and a low root mass ratio. When the amount of C rhizodeposits is expressed as a proportion of C photosynthetically-fixed forage legumes were found to be more efficient for C rhizodeposition. Conversely, pea was the most efficient for N rhizodeposition during reproductive development. The use of functional traits confirms that rhizodeposition as a complex and dynamic process is mainly modulated by plant growth and resources acquisition patterns and particularly related to root architecture. Traits associated with resource acquisition and roots associated with root architecture can be used to estimate both C and N rhizodeposition. The present study was performed in pots in controlled conditions and future works should focus on investigating C and N rhizodeposition in field conditions.

Acknowledgements

We thank the Région Normandie for financial support. We are grateful to all the technical staff of UMR EVA and AGHYLE UniLaSalle-Rouen laboratory for technical assistance. We also thank the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element and isotope analysis used in this study. We are grateful to Cécile Revellin, UMR1347 Agroécologie Agrosup-INRAe-uB, for providing all Rhizobium strains and Diana Romero for improvement of the English text.

References

Altobelli F, Benedetti A, Calles T, Caon L, Charrondiere R, Gri Shiv P, Grande F, Muthuraman RP, Pisante M, Pramar B, et al (2016) Soils and Pulses: Symbiosis for Life - World. Available online: https://reliefweb.int/report/world/soils-andpulses-symbiosis-life (accessed on 1 October 2021).

Arcand MM, Knight JD, Farrell RE (2013) Temporal dynamics of nitrogen rhizodeposition in field pea as determined by 15N labeling. Can J Plant Sci 93: 941–950

Baptist F, Aranjuelo I, Legay N, Lopez-Sangil L, Molero G, Rovira P, Nogués S (2015) Rhizodeposition of organic carbon by plants with contrasting traits for resource acquisition: responses to different fertility regimes. Plant Soil 394: 391–406

Bardgett RD (2017) Plant trait-based approaches for interrogating belowground function. Biol Environ Proc R Ir Acad 117B: 1–13

Bazot S, Blum H, Robin C (2008) Nitrogen rhizodeposition assessed by a 15NH3 shoot pulse-labelling of Lolium perenne L. grown on soil exposed to 9 years of CO2 enrichment. Environ Exp Bot 63: 410–415

Beck DP, Wery J, Saxena MC, Ayadi A (1991) Dinitrogen Fixation and Nitrogen Balance in Cool-Season Food Legumes. Agron J 83: 334–341

Bobille H, Limami AM, Robins RJ, Cukier C, Le Floch G, Fustec J (2016) Evolution of the amino acid fingerprint in the unsterilized rhizosphere of a legume in relation to plant maturity. Soil Biol Biochem 101: 226–236

Bowsher AW, Evans S, Tiemann LK, Friesen ML (2018) Effects of soil nitrogen availability on rhizodeposition in plants: a review. Plant Soil 423: 59–85

Cellier P, Schneider A, Thiebeau P, Vertes F (2015) Impacts environnementaux de l'introduction de légumineuses dans les systèmes de production. *In* : Schneider A. & Huyghe C., coord. *Les légumineuses pour des systèmes agricoles durables*. Versailles, France : Éditions Quæ, 297-338

Chalk PM, Ladha JK (1999) Estimation of legume symbiotic dependence: an evaluation of techniques based on 15N dilution. Soil Biol Biochem 31: 1901–1917

Chalk PM, Peoples MB, McNeill AM, Boddey RM, Unkovich MJ, Gardener MJ, Silva CF, Chen D (2014) Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of 15N-enriched techniques. Soil Biol Biochem 73: 10–21

Chalk PM, Smith CJ (2017) 15N methodologies for estimating the transfer of N from legumes to non-legumes in crop sequences. Nutr Cycl Agroecosystems 107: 279–301

De Graaff M-A, Six J, Van Kessel C (2007) Elevated CO2 increases nitrogen rhizodeposition and microbial immobilization of root-derived nitrogen. New Phytol 173: 778–786

Dilkes NB, Jones DL, Farrar J (2004) Temporal Dynamics of Carbon Partitioning and Rhizodeposition in Wheat. Plant Physiol 134: 706–715

Domanski G, Kuzyakov Y, Siniakina SV, Stahr K (2001) Carbon flows in the rhizosphere of ryegrass (Lolium perenne). J Plant Nutr Soil Sci 164: 381

Evans J, O'Connor G, Turner G, Coventry D, Fettell N, Mahoney J, Armstrong E, Walsgott D (1989) N2 fixation and its value to soil N increase in lupin, field pea and other legumes in south-eastern Australia. Aust J Agric Res 40: 791

Faucon M-P, Houben D, Lambers H (2017) Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. Trends Plant Sci 22: 385–394

Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B (2010) Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. Agron Sustain Dev 30: 57–66

Garnier E, Navas M-L (2012) A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. Agron Sustain Dev 32: 365–399

Garnier E, Navas M-L, Grigulis K (2016) Plant Functional Diversity: Organism Traits, Community Structure, and Ecosystem Properties. Oxford University Press

Gasser M, Hammelehle A, Oberson A, Frossard E, Mayer J (2015) Quantitative evidence of overestimated rhizodeposition using 15N leaf-labelling. Soil Biol Biochem 85: 10–20

Ge T, Li B, Zhu Z, Hu Y, Yuan H, Dorodnikov M, Jones DL, Wu J, Kuzyakov Y (2017) Rice rhizodeposition and its utilization by microbial groups depends on N fertilization. Biol Fertil Soils 53: 37–48

Génard T, Etienne P, Laîné P, Yvin J-C, Diquélou S (2016) Nitrogen transfer from Lupinus albus L., Trifolium incarnatum L. and Vicia sativa L. contribute differently to rapeseed (Brassica napus L.) nitrogen nutrition. Heliyon 2: e00150

Giller KE, Ormesher J, Awah FM (1991) Nitrogen transfer from Phaseolus bean to intercropped maize measured using 15N-enrichment and 15N-isotope dilution methods. Soil Biol Biochem 23: 339–346

Grayston SJ, Vaughan D, Jones D (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. Appl Soil Ecol 5: 29–56

Guyonnet JP, Cantarel AAM, Simon L, Haichar F el Z (2018) Root exudation rate as functional trait involved in plant nutrient-use strategy classification. Ecol Evol 8: 8573–8581

Henneron L, Cros C, Picon-Cochard C, Rahimian V, Fontaine S (2020) Plant economic strategies of grassland species control soil carbon dynamics through rhizodeposition. J Ecol 108: 528–545

Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (2001) Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. Soil Biol Biochem 33: 439–448

Høgh-Jensen H, Schjoerring JK (2000) Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by 15N leaf feeding compared with indirect dilution of soil 15N. Plant Soil 227: 171–183

Hupe A (2016) A secret world - C and N rhizodeposition of pea, influenced by plant development and growing conditions. 113

Hupe A, Schulz H, Bruns C, Haase T, Heß J, Dyckmans J, Joergensen RG, Wichern F (2019) Get on your boots: estimating root biomass and rhizodeposition of peas under field conditions reveals the necessity of field experiments. Plant Soil. doi: 10.1007/s11104-019-04238-z

Hupe A, Schulz H, Bruns C, Joergensen RG, Wichern F (2016) Digging in the dirt – Inadequacy of belowground plant biomass quantification. Soil Biol Biochem 96: 137–144

Hütsch BW, Augustin J, Merbach W (2002) Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils. J Plant Nutr Soil Sci 165: 397–407

Janzen HH, Bruinsma Y (1989) Methodology for the quantification of root and rhizosphere nitrogen dynamics by exposure of shoots to 15N-labelled ammonia. Soil Biol Biochem 21: 189–196

Jensen B (1993) Rhizodeposition by 14CO2-pulse-labelled spring barley grown in small field plots on sandy loam. Soil Biol Biochem 25: 1553–1559

Jensen ES (1996) Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. Soil Biol Biochem 28: 65–71

Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytol 163: 459–480

Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. Plant Soil 321: 5–33

Kanté M, Riah-Anglet W, Cliquet J-B, Trinsoutrot-Gattin I (2021) Soil Enzyme Activity and Stoichiometry: Linking Soil Microorganism Resource Requirement and Legume Carbon Rhizodeposition. Agronomy 11: 2131

Khan DF, Peoples MB, Chalk PM, Herridge DF (2002) Quantifying below-ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of 15N and non isotopic methods. 13

Kuzyakov Y, Domanski G (2000) Carbon input by plants into the soil. Review. J Plant Nutr Soil Sci 163: 421–431

Kuzyakov Y, Schneckenberger K (2004) Review of estimation of plant rhizodeposition and their contribution to soil organic matter formation. Arch Agron Soil Sci 50: 115–132

Lesuffleur F, Cliquet J-B (2010) Characterisation of root amino acid exudation in white clover (Trifolium repens L.). Plant Soil 333: 191–201

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 Soil 294: 235–246

Mahieu S, Fustec J, Jensen ES, Crozat Y (2009) Does labelling frequency affect N rhizodeposition assessment using the cotton-wick method? Soil Biol Biochem 41: 2236–2243

Mayer J, Buegger F, Jensen ES, Schloter M, Heß J (2003) Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a 15N in situ stem labelling method. Soil Biol Biochem 35: 21–28

Meena RS, Das A, Yadav GS, Lal R (2018) Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Springer

Merbach W, Schulze J, Richert M, Rrocco E, Mengel K (2000) A comparison of different 15N application techniques to study the N net rhizodeposition in the plant-soil system. J Plant Nutr Soil Sci 163: 375–379

Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. Plant Cell 7: 869–885

Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23: 375–396

Nguyen C (2009) Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls. *In* E Lichtfouse, M Navarrete, P Debaeke, S Véronique, C Alberola, eds, Sustain. Agric. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 97–123

Nock CA, Vogt RJ, Beisner BE (2016) Functional Traits. eLS. American Cancer Society, pp 1–8

Oburger E, Jones DL (2018) Sampling root exudates – Mission impossible? Rhizosphere 6: 116–133

Ohyama T (2017) The role of legume-rhizobium symbiosis in sustainable agriculture. Legume Nitrogen Fixat. Soils Low Phosphorus Availab. Springer, pp 1–20

Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011) The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annu Rev Genet 45: 119–144

Palta JA, Fillery IR, Mathews EL, Turner NC (1991) Leaf Feeding of [15N]Urea for Labelling Wheat With Nitrogen. Funct Plant Biol 18: 627–636

Paterson E (2003) Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. Eur J Soil Sci 54: 741–750

Paterson E, Gebbing T, Abel C, Sim A, Telfer G (2007) Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. New Phytol 173: 600–610

Pausch J, Kuzyakov Y (2018) Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. Glob Change Biol 24: 1–12

Pausch J, Tian J, Riederer M, Kuzyakov Y (2013) Estimation of rhizodeposition at field scale: upscaling of a 14C labeling study. Plant Soil 364: 273–285

Paynel F, Cliquet JB (2003) N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds. Agronomie 23: 503–510

Paynel F, Lesuffleur F, Bigot J, Diquélou S, Cliquet J-B (2008) A study of 15N transfer between legumes and grasses. Agron Sustain Dev 28: 281–290

Peoples MB, Chalk PM, Unkovich MJ, Boddey RM (2015) Can differences in 15N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? Soil Biol Biochem 87: 97–109

Poth M, La Favre JS, Focht DD (1986) Quantification by direct 15N dilution of fixed N2 incorporation into soil by Cajanus cajan (Pigeon Pea). Soil Biol Biochem 18: 125–127

Prieto I, Stokes A, Roumet C (2016) Root functional parameters predict fine root decomposability at the community level. J Ecol 104: 725–733

Qiao Y, Miao S, Han X, Yue S, Tang C (2017) Improving soil nutrient availability increases carbon rhizodeposition under maize and soybean in Mollisols. Sci Total Environ 603–604: 416–424

Rasmussen J (2011) Why we need to restrict the use of “rhizodeposition” and the Janzen and Bruinsma equation. Soil Biol Biochem 43: 2213–2214

Rasmussen J, Gylfadóttir T, Dhalama NR, 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 Biol Biochem 133: 60–71

Rezgui C, Riah-Anglet W, Benoit M, Bernard PY, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I (2020) Impacts of the Winter Pea Crop (Instead of Rapeseed) on Soil Microbial Communities, Nitrogen Balance and Wheat Yield. Agriculture 10: 548

Romillac N (2015) Effets de l'introduction du pois dans une succession de cultures sur certaines communautés végétales et bactériennes et leurs fonctions écosystémiques associées. These de doctorat. Université de Lorraine

Russell CA, Fillery IRP (1996) Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. Aust J Agric Res 47: 1047–1059

Sawatsky N, Soper RJ (1991) A quantitative measurement of the nitrogen loss from the root system of field peas (Pisum avense L.) grown in the soil. Soil Biol Biochem 23: 255–259

Schmidt O, Scrimgeour CM (2001) A simple urea leaf-feeding method for the production of ^{13}C and ^{15}N labelled plant material. Plant Soil 229: 197–202

Schmitt A, Pausch J, Kuzyakov Y (2013) C and N allocation in soil under ryegrass and alfalfa estimated by 13C and 15N labelling. Plant Soil 368: 581–590

Semchenko M, Xue P, Leigh T (2021) Functional diversity and identity of plant genotypes regulate rhizodeposition and soil microbial activity. New Phytol 232: 776–787

Shearer G, Kohl DH (1986) N2-fixation in field settings: estimations based on natural 15N abundance. Funct Plant Biol 13: 699–756

Stagnari F, Maggio A, Galieni A, Pisante M (2017) Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. Chem Biol Technol Agric 4: 2

Stevenel P, Frossard E, Abiven S, Rao IM, Tamburini F, Oberson A (2019) Using a Tri-Isotope (13C, 15N, 33P) Labelling Method to Quantify Rhizodeposition. *In* D Reinhardt, AK Sharma, eds, Methods Rhizosphere Biol. Res. Springer Singapore, Singapore, pp 169–195

Tribouillois H, Fort F, Cruz P, Charles R, Flores O, Garnier E, Justes E (2015) A Functional Characterisation of a Wide Range of Cover Crop Species: Growth and Nitrogen Acquisition Rates, Leaf Traits and Ecological Strategies. PLOS ONE 10: e0122156

Unkovich M (2013) Isotope discrimination provides new insight into biological nitrogen fixation. New Phytol 198: 643–646

Uren NC (2001) Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. p. 19–40. R. Pinton et al.(ed.) The rhizosphere: Biogeochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, New York. Types Amounts Possible Funct. Compd. Released Rhizosphere Soil-Grown Plants P 19–40 R Pinton Aled Rhizosphere Biogeochem. Org. Subst. Soil-Plant Interface Marcel Dekker N. Y.

Varin S, Cliquet J-B, Personeni E, Avice J-C, Lemauviel-Lavenant S (2010) How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (Trifolium repens L.)? J Exp Bot 61: 225–234

Veerman L, Kalbitz K, Schoorl JC, Tietema A (2018) Split-root labelling to investigate ^{15}N rhizodeposition by *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. Isotopes Environ Health Stud 54: 16–27

Violle C, Navas M-L, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E (2007) Let the concept of trait be functional! Oikos 116: 882–892

Voisin A-S, Nicolardot B, Cellier P, Jeuffroy M-H (2017) Les services écosystémiques rendus par les légumineuses vis-à-vis du cycle de l'azote. p 4 p.

Wang X, Yang Y, Pei K, Zhou J, Peixoto L, Gunina A, Zeng Z, Zang H, Rasmussen J, Kuzyakov Y (2020) Nitrogen rhizodeposition by legumes and its fate in agroecosystems: A field study and literature review. Land Degrad. Dev.

Wichern F, Eberhardt E, Mayer J, Joergensen RG, Müller T (2008) Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. Soil Biol Biochem 40: 30–48

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 Soil 329: 105–115

Wichern F, Mayer J, Joergensen RG, Müller T (2007) Rhizodeposition of C and N in peas and oats after 13C–15N double labelling under field conditions. Soil Biol Biochem 39: 2527–2537

Yasmin K, Cadisch G, Baggs EM (2006) Comparing 15N-labelling techniques for enriching above- and below-ground components of the plant-soil system. Soil Biol Biochem 38: 397–400

Yoneyama T, Fujita K, Yoshida T, Matsumoto T, Kambayashi I, Yazaki J (1986) Variation in Natural Abundance of 15N among Plant Parts and in 15N/14N Fractionation during N2 Fixation in the Legume-Rhizobia Symbiotic System. Plant Cell Physiol 27: 791–799

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.): C and N rhizodeposition of soya bean and oat. Eur J Soil Sci 69: 625–633

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

Zebarth BJ, Alder V, Sheard RW (1991) In situ labeling of legume residues with a foliar application of a 15N-enriched urea solution. Commun Soil Sci Plant Anal 22: 437–447

Zhou J, Zang H, Loeppmann S, Gube M, Kuzyakov Y, Pausch J (2020) Arbuscular mycorrhiza enhances rhizodeposition and reduces the rhizosphere priming effect on the decomposition of soil organic matter. Soil Biol Biochem 140: 107641

Chapitre IV. C :
Relations entre la morphologie racinaire, l'exsudation du C et les pools d'acides organiques et de composés phosphorés du le sol.

Les travaux de ce chapitre ont en partie été réalisés lors du stage de M1 de Biologie-Agrosciences de l'université de Caen de Joey Habbib (2020-2021) que j'ai co-encadré avec Jean-Bernard Cliquet.

Préambule

Les résultats du chapitre précédent (IV B) ont montré le lien fort entre la rhizodéposition des différentes espèces de Fabacées étudiées et les traits en lien avec la croissance des plantes ainsi que la biomasse racinaire. Cependant, l'architecture des racines a été analysée sur les modalités non marquées et cultivées en parallèle. La culture en pot n'a également pas permis de récolter le système racinaire en entier. Ainsi, le nombre d'apex n'a par exemple pas pu être mesuré. Ce chapitre présente les résultats d'une expérimentation complémentaire conduite en rhizotron pour obtenir des racines entières pendant le stade végétatif des plantes. Un marquage au $^{13}CO_2$ a été réalisée sur 24h afin relier l'exsudation du C récent à l'architecture racinaire et les teneurs en acides organiques et composés phosphorés dans le sol des espèces de Fabacées étudiées.

Principaux résultats

- L'exsudation s'est avérée fortement liée à la photosynthèse et à l'allocation de ressources dans les différents compartiments.
- Le diamètre des racines joue un rôle central dans l'exsudation du C récent, les racines les plus fines semblent exsuder le plus de C particulièrement chez les trèfles.
- Des relations ont été également observées entre l'exsudation spécifique et la longueur spécifique, le volume et la surface des racines.
- Cette étude confirme le lien entre les traits racinaires des plantes et l'exsudation, et suggère que cette exsudation joue un rôle dans le pilotage du pool de P du sol à travers les acides organiques.

1. Introduction

Afin de produire de manière durable, l'utilisation optimale des ressources naturelles est au centre des systèmes agricoles depuis plusieurs années pour rendre le maximum de services écosystémiques profitables à l'homme et son environnement. Cette agriculture doit faire face aux besoins alimentaires et aborde les enjeux tels que le changement climatique, l'érosion des sols, la perte de fertilité et l'appauvrissement de la biodiversité (Lal, 2015; Velten *et al.*, 2015; Lichtfouse, 2018). L'introduction des Fabacées dans les systèmes de culture pour répondre partiellement à ces enjeux est souvent citée comme une des solutions (Meena et Lal, 2018). Celles-ci contribueraient en effet à renforcer la sécurité alimentaire et les services écosystémiques (Schneider et Huyghe, 2015). Parmi les multiples avantages des Fabacées pour les systèmes agricoles, le flux azoté particulier de ces plantes permet d'enrichir le sol en N de manière profitable à d'autres plantes, grâce à la fixation symbiotique du N_2 (Fustec *et al.*, 2010; Guinet *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). En plus d'agir sur les pools d'N, les Fabacées, comme les autres plantes, peuvent modifier la disponibilité du phosphore et contribuent à l'apport en C dans le sol (*Bais et al., 2006; Wichern et al., 2007; Hinsinger et al., 2001,* 2011). Ces modifications des pools de C, N et P passent par la rhizodéposition qui est le processus clé par lequel les plantes émettent différents types de composés dans le sol (Uren, 2001). Mieux connaitre le processus de rhizodéposition contribuerait à l'amélioration de la gestion de la fertilité des sols sous l'intégration des Fabacées.

La classification des différentes composantes de la rhizodéposition varie en fonction des auteurs, mais les principales composantes de la rhizodéposition peuvent être considérées comme le détachement de cellules bordantes, la senescence des tissus racinaires, la sécrétion de mucilage et l'exsudation (Nguyen, 2003). Les composés carbonés les plus abondants dans les exsudats racinaires sont des produits du métabolisme primaire tels que les acides organiques, les sucres ou les acides aminés (Jones *et al.*, 2009). Les acides organiques peuvent agir comme chélateurs de métaux dans la rhizosphère et augmenter la disponibilité du P dans le sol (Santos *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2020; Richardson *et al.*, 2022). En effet, il est présent dans le sol sous des formes très peu disponibles notamment en liaison avec des composés minéraux du sol et constitue un élément limitant pour la nutrition des plantes (Shen *et al.*, 2011; Audette *et al.*, 2020). Pour faire face à cette contrainte, les plantes ont développé diverses stratégies permettant d'augmenter l'acquisition de cette ressource primordiale pour leur développement et leur croissance. En plus de l'exsudation d'acides organiques qui leur permet de solubiliser le P, ces stratégies reposent sur une modification du système racinaire avec notamment une augmentation de la longueur spécifique, du nombre et de la longueur des poils racinaires

Figure 1 : Illustration du dispositif expérimental mis en place

(A) Photo des rhizotrons dans la chambre de marquage et (B) image d'un rhizotron de trèfle blanc ouvert lors de la récolte.

(López-Bucio *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2013). La sécrétion d'enzymes phosphatases (généralement accompagné d'une acidification du milieu local par la plante) permet également de mobiliser le P du sol (Wen *et al.*, 2019; Richardson *et al*., 2022). Une autre stratégie bien connue, pour faire face à cette contrainte, est la colonisation par des champignons mycorhiziens (Smith *et al.*, 2011).

Une meilleure compréhension de l'exsudation des plantes vers le sol et l'influence de la morphologie racinaire constitue un levier important pour l'amélioration de la production végétale. L'objectif de cette étude est de préciser l'impact de la morphologie racinaire sur l'exsudation du C et les pools d'acides organiques du sol ainsi que sur la disponibilité du P dans le sol. Nous avons analysé en détail le lien entre la morphologie racinaire (diamètre des différentes classes de racine, nombre d'apex) et les quantités de C exsudées en utilisant une approche de culture en rhizotron. Nous émettons l'hypothèse que (1) l'exsudation du C ainsi que les teneurs des acides organiques du sol seraient liées aux racines fines et aux nombres d'apex racinaires ; (2) les teneurs en composés phosphorés du sol varient avec l'exsudation du C et avec les teneurs en acides organiques du sol.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Quatre espèces de Fabacées ont été utilisées dans cette étude : (1) deux espèces de Fabacées protéagineuses à graine : la féverole (*Vicia faba* L.cv Fanfare*)* et le pois (*Pisum sativum* L. cv Glauris). Ces dernières se retrouvent majoritairement sous forme de cultures annuelles, bien qu'elles soient aussi très utilisées comme cultures intermédiaires ; (2) Deux espèces de trèfles qui sont des Fabacées fourragères : le trèfle blanc (*Trifolium repens* L. cv RD84) et le trèfle incarnat (*Trifolium incarnatum* L.) Ces dernières sont utilisées majoritairement dans des mélanges prairiaux pour les pâturages ou en couvert végétal.

2.2. Culture et marquage des plantes

Les plantes ont été cultivées en conditions contrôlées, en serre sous lumière additionnelle de 400 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ (lampes au sodium 400 W Philips SON T-PIA Agro) avec un arrosage automatique d'eau osmosée. L'intégralité de la culture a été réalisée en serre jusqu'à la veille du marquage, avec une photopériode de 16h de jour à 20ºC et 8h de nuit à 18ºC. Après la stérilisation des graines et dix jours de germination sur perlite (dont 2 à 3 jours pour l'émergence des plantules), les plantules ont été transférées dans des rhizotrons (**Figure 1**) contenant 1,6 kg de sol ajusté entre 70 et 80% de la capacité de rétention d'eau du sol (WHC). Le sol utilisé dans cette étude a été collecté à une profondeur de 0 - 20 cm dans une parcelle de grande culture (lin) en Seine et Maritime, France (Saint Georges sur Fontaine) et a été tamisé à 5 mm. C'est un sol

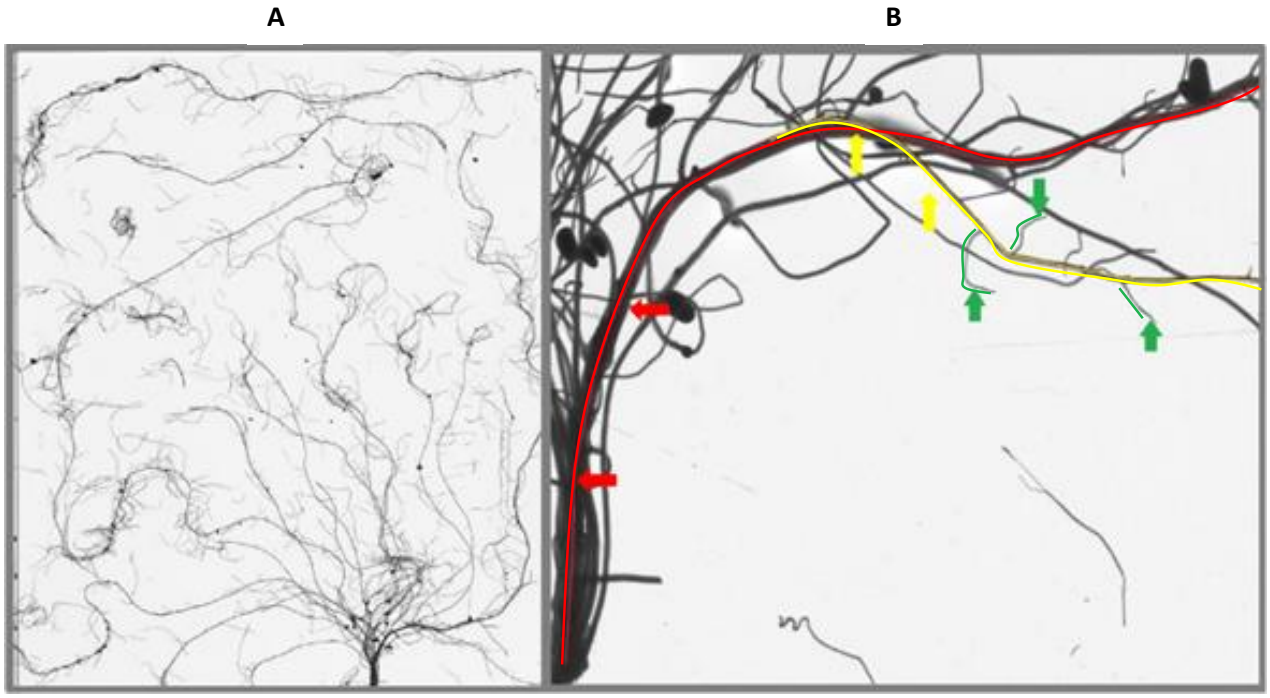


Figure 2 : (A) Image obtenue après le scan d'un système racinaire de pois et (B) représentation agrandie de la même image avec : en rouge, la racine primaire, en jaune, une racine secondaire et enfin, indiqué par des flèches vertes, des racines tertiaires.

limoneux avec un rapport C/N de 9,31 avec 2,42% de MO et 0.07 $mg.kg^{-1}$ de P total. Cinq rhizotrons ont été mis en place pour chaque espèce. La féverole et le pois étaient à une densité d'une plantule par rhizotrons tandis que les trèfles sont chacun à deux plantules. Les plantes ont été ensuite inoculées avec leur rhizobium spécifique, le pois a été inoculé avec *Rhizobium leguminosarum bv viciae* P221, la féverole a été inoculée avec *Rhizobium leguminosarum bv viciae* FH34 et les deux espèces de trèfle ont été inoculées avec *Rhizobium trifolii* T354. Pendant la cinquième semaine de culture, les plantes ont été placées dans un phytotron de $1m^2$ (Froids et Mesures, Beaucouze, France) avec des conditions environnementales similaires à celle de la culture en serre. Un marquage au $^{13}CO_2$ a été réalisé sur 24h dans des conditions de culture détaillées dans Kanté *et al.* (2021). Le $^{13}CO_2$ a été injecté dans la chambre pour atteindre une concentration de CO_2 de 450 ppm et un excès isotopique de 4,88 %. Des plantes cultivées dans les mêmes conditions en serre ont été utilisées pour estimer les abondances naturelles en ^{13}C des différents compartiments.

2.3. Récolte et analyses

2.3.1. Récolte

Les plantes ont été récoltées après 24h de marquage au $^{13}CO_2$ dans le phytotron. Les parties aériennes ont été séparées en tiges et feuilles et les masses fraîches sont mesurées. Les racines ont été dissociées du sol et lavées puis placées dans une solution isotonique de $CaCl_2$ à 3mM afin de minimiser la perte des solutés marqués. Une partie du système racinaire a été placée dans une solution (100mL d'éthanol à 96%, 50mL d'acide acétique et 850mL d'eau distillé) puis stockée à 4°C en attendant les analyses de morphologie racinaire. Une partie des racines ont été séchée à l'étuve (60ºC, 72h) et broyée (mm 400 Vibro-Broyeur, Retsch) pour les analyses isotopiques à l'aide d'un analyseur élémentaire (EA3000, EuroVector, Milan, Italie) couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS, Nu Instruments, Manchester, UK). La surface foliaire totale de la plante a été mesurée à l'aide d'un planimètre (LI-3100C Area Meter, LI-COR). Les feuilles ont été séchées et broyées par la suite en vue d'analyses isotopiques. Nous avons également collecté des échantillons de sol pour les analyses isotopiques et pour les dosages d'acides organiques et de composés phosphorés (sol frais congelé à -80°C).

2.3.2. Morphologie racinaire

La morphologie des racines a été mesurée grâce à deux logiciels, WinRhizo et image J. Les deux logiciels ont été utilisés sur des images obtenues (**Figure 2**) en scannant les systèmes racinaires à l'aide d'un scanner à très haute résolution (EPSON EXPRESSION 10000XL). Le logiciel Image J a été utilisé pour mesurer manuellement les diamètres moyens des différentes

classes de racines et autres paramètres de dispersion (en l'occurrence les quartiles) nécessaires afin de déterminer les classes des mesures obtenues à l'aide du logiciel WinRhizo (Regent Instruments Inc., Canada). En effet, bien que ce dernier permette d'obtenir de nombreux paramètres tels que la longueur racinaire totale ou bien le nombre d'apex des racines, la définition des classes de racine est basée sur le diamètre des racines et non sur des paramètres qualitatifs définissant les classes (primaires, secondaires, etc …). Le logiciel WinRhizo ayant tendance à surestimer le nombre d'apex, nous avons appliqué un facteur de correction. Ce facteur a été obtenu par comparaison des résultats Winrhizo avec des observations à l'œil nu par sur des zones choisies aléatoirement.

2.3.3. Extraction et analyse des acides organiques et des composés P du sol.

Des extractions à partir d'1 g de sol dans du NaOH 0,5M ont été réalisées suivant le protocole de Waithaisong et al. (2015). Les échantillons ont ensuite été centrifugés (10000 RPM pendant 10 min et à 6º C) et filtrés. Nous avons analysé la teneur en anions minéraux et organiques des échantillons obtenus après l'extraction par chromatographie ionique haute performance (Thermo Scientific, ICS 6000). 25 µL d'extrait fut injecté puis élué par un gradient formé d'eau ultrapure et de KOH. Les anions ont été identifiés en fonction de différents standards constitués d'acides organiques (malate, malonate, oxalate et citrate), et de composés phosphorés (phosphate, pyrophosphate, phytate).

2.4. Calculs

L'abondance naturelle en ^{13}C dans les différents compartiments a été obtenue en effectuant les analyses à partir des échantillons non marqués. Cette abondance naturelle a été par la suite utilisée pour obtenir l'excès isotopique (E) correspondant à la différence avec l'abondance isotopique en ^{13}C des échantillons marqués. La quantité de ^{13}C fixée dans les différents compartiments fut estimée avec l'équation suivante :

$$(1) \quad Quantité\ de^{13}C\ issu\ du\ marquage\ (mg) = MS\ (mg) * \frac{C}{100} * \frac{E}{100}$$

où *MS* est la masse sèche du compartiment (en mg), *C* la teneur en carbone (en % de la MS) et *E* l'excès isotopique du ^{13}C (en % du C_{total}).

Tableau 1 : Tableau présentant les traits morphologiques des plantes

Traits	Féverole	Pois	Trèfle blanc	Trèfle incarnat
Biomasse sèche (g)				
Parties aériennes	2 ,09^{b}	2,94^{a}	0,70^{c}	1,25^{c}
Racines	1,58^{a}	0,44^{b}	0,24^{c}	0,33^{c}
Total	3,68^{a}	3,38^{a}	0,95^{b}	1,58^{b}
Surface foliaire (cm^2)	285^{a}	187^{ab}	123^{b}	235 ^{a}
Traits portant sur l'ensemble du système racinaire				
Longueur (m)	52,79^{b}	49,55^{b}	30,62^{b}	98,31^{a}
Volume (cm^3)	20,46^{a}	4,44^{b}	1,87^{c}	5,06^{b}
Surface (cm^2)	1159^{a}	525^{b}	267^{c}	790^{a}
Nombre d'apex (-)	5864 n.s.	5261 n.s.	4052 n.s.	8033 n.s.
Longueur spécifique ($m.g^{-1}$)	33^{c}	112^{b}	122^{b}	298^{a}
Densité ($mg.cm^{-3}$)	79^{b}	101^{b}	148^{a}	70^{b}
Diamètre moyen (mm)	0,72^{a}	0,34^{b}	0,28^{c}	0,25^{c}
Traits des racines tertiaires				
Longueur (m)	43,23^{ab}	43,22^{ab}	22,76^{ac}	61,93^{a}
Volume (cm^3)	10,23^{a}	1,45^{b}	0,52^{b}	1,75^{b}
Surface (cm^2)	693^{a}	324^{b}	111^{b}	340^{b}
Nombre d'apex (-)	5771n.s.	5105 n.s.	3901 n.s.	5637 n.s.
Longueur spécifique ($m.g^{-1}$)	52^{c}	190^{bc}	373^{ab}	547^{a}
Diamètre moyen (mm)	0,73^{a}	0,39^{b}	0,21^{c}	0,22^{c}

Les valeurs qui ne sont pas suivies par des lettres communes sont significativement différentes (n = 5). L'absence de différence significative est indiquée par 'n.s.'.

La quantité de ^{13}C trouvée dans le sol étant estimée comme ne provenant que de l'exsudation uniquement, l'exsudation spécifique est alors calculée comme suit :

$$(1) \quad Exsudation\ spécifique\ (mg/g) = \frac{Quantité\ de^{13}C\ issu\ du\ marquage\ (Sol)(mg)}{Quantité\ de^{13}C\ issu\ du\ marquage\ (Total)(g)}$$

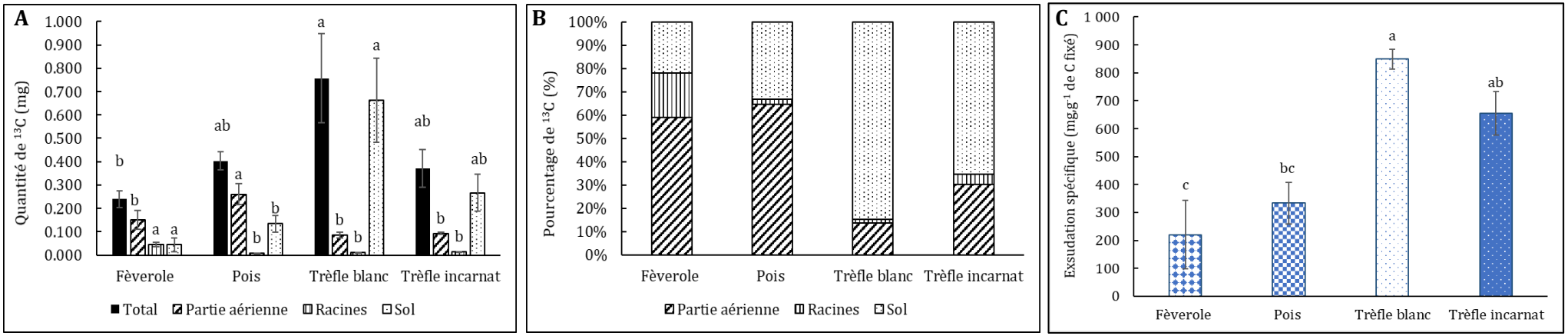
2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 4.0.2 (R Core Team, 2017). Les données ont été analysées par ANOVA après vérification de la normalité des données (test de Shapiro-Wilk, 95%) et de l'homogénéité de la variance (test de Bartlett, 95%). Des comparaisons multiples de moyennes ont ensuite été effectuées avec le test de Tukey. Si les conditions n'étaient pas remplies, alors des tests de Kruskall-Wallis ont été réalisés suivis de tests de comparaison par pair utilisant la méthode de Wilcoxon. Les analyses de corrélation ont été réalisées selon la méthode de Pearson.

3. Résultats

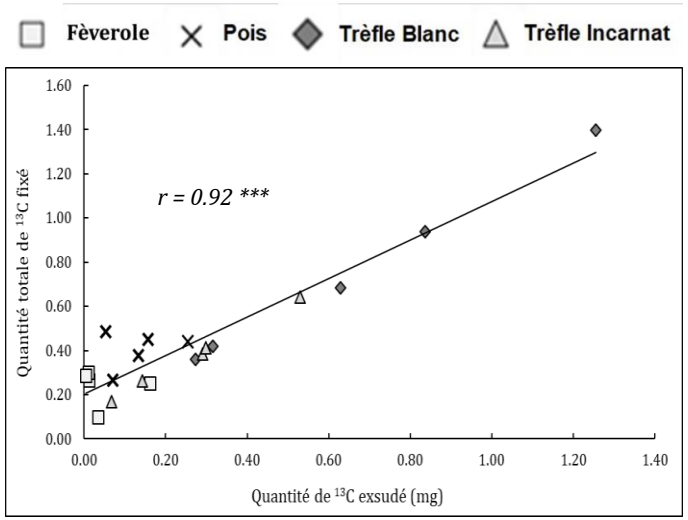
3.1. Traits morphologiques

La féverole et le pois présentent des biomasses supérieures à celles des deux trèfles (**Tableau 1**). Les surfaces foliaires les plus fortes sont observées pour le trèfle incarnat et la féverole et les plus faibles pour trèfle, le pois présentant des résultats intermédiaires. Concernant les traits racinaires, les racines tertiaires contribuent de manière majoritaire au total des traits observés, il a donc été choisi de s'intéresser plus particulièrement à celles-ci. Il est également intéressant de noter que l'analyse du nombre d'apex racinaires montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les espèces. Concernant le diamètre des racines tertiaires, la féverole présente le diamètre moyen le plus important, quasiment deux fois supérieur à celui du pois et 3 fois celui des deux trèfles, qui ne montrent pas de différence significative entre eux. Comme attendu, la longueur spécifique des racines varie à l'inverse, et celle-ci est dix fois plus élevée chez le trèfle incarnat que chez la féverole.



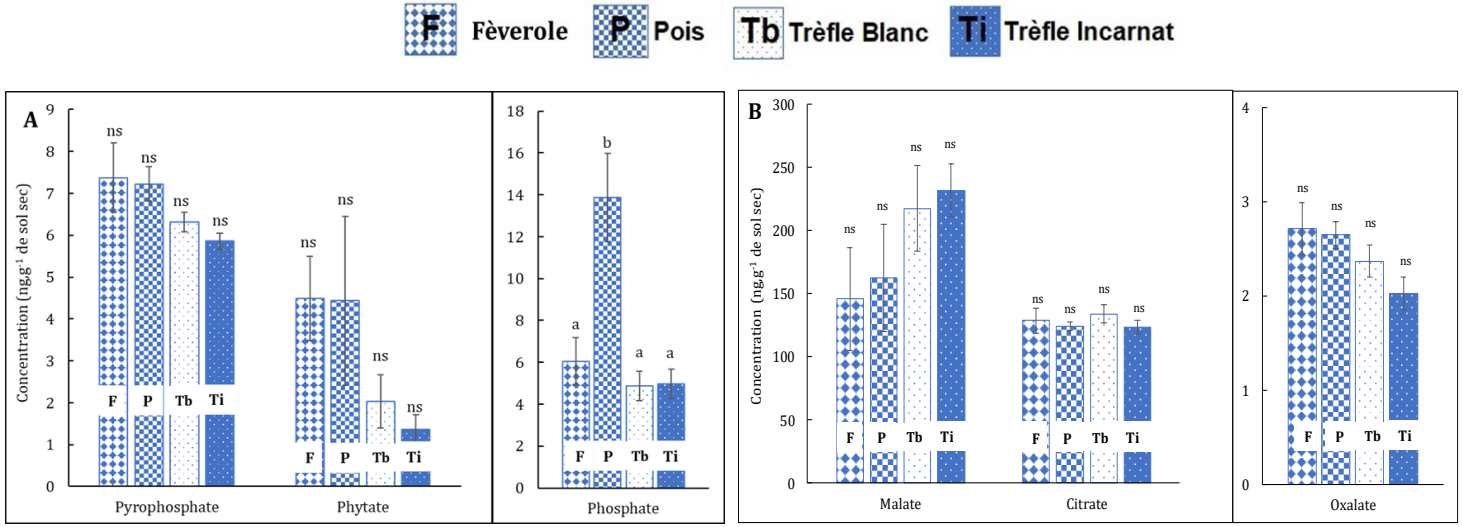
Figures 3 : (A) Quantités de ^{13}C total retrouvées dans les plantes et dans le sol ; (B) Répartition du ^{13}C dans le sol et dans les plantes, exprimé en pourcentage ; (C) Exsudations spécifiques en fonction des espèces

Les histogrammes présentent les moyennes ± les erreurs standards (n = 5). Les lettres correspondent aux comparaisons de moyennes des tests de Tukey (p<0,05) par variable, des lettres identiques indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les espèces.



Figures 4 : Relation entre la quantité totale de ^{13}C fixée par les plantes et la quantité exsudée dans le sol.

Corrélation r de Pearson (n = 20). '' p < 0.05, '**' p < 0.01, '***' p < 0.001.*



Figures 5 : (A) Graphiques présentant les teneurs moyennes des composés P du sol et (B) des acides organiques

Les histogrammes présentent les moyennes ± les erreurs standards (n = 5). Les lettres correspondent aux comparaisons de moyennes des tests de Tukey (p<0,05), des lettres identiques indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les espèces. L'absence de différence significative est indiquée par 'n.s.'

3.2. Exsudation du carbone récent

Le marquage des plantes n'ayant eu lieu que dans les 24H précédents la récolte, nous nous sommes intéressés au C récent et à son exsudation. La détermination des quantités de ^{13}C total dans la plante et dans le sol (**Figure 3 A**), montre que la quantité de ^{13}C assimilée par le trèfle blanc est supérieure à celle assimilée par la féverole mais ne diffère pas significativement du résultat du pois et du trèfle incarnat. La même observation est faite dans le sol. Concernant la répartition du ^{13}C entre les différents compartiments (**Figure 3 B**), la féverole présente une répartition plus équilibrée entre les tissus végétaux et le sol avec une proportion importante de ^{13}C dans les racines que les autres espèces.

Pour s'affranchir du poids de la photosynthèse sur l'exsudation et se concentrer sur les relations possibles entre les traits racinaires et l'exsudation, il a été choisi d'exprimer l'exsudation du C en fonction du C total fixé (exsudation spécifique (**Figure 3 C**)). Le trèfle blanc a exsudé plus de C récent par unité de C fixé comparativement aux deux espèces protéagineuses. Les observations de la **Figure 4** montrent qu'il existe une très forte corrélation entre la quantité de ^{13}C fixé par photosynthèse et celle exsudée dans le sol.

3.3. Dosage des acides organiques et composés P du sol

Les acides organiques les plus abondants dans les sols sont le malate et le citrate (**Figure 5 B**). L'autre acide organique identifié dans les sols est l'oxalate, mais avec des concentrations beaucoup plus faibles. Les teneurs en acides organiques du sol ne varient pas en fonction de l'espèce cultivée (**Figure 5 A**). Le sol du pois présente une teneur en phosphate supérieure aux sols de culture des 3 autres espèces. Les teneurs en pyrophosphate et surtout en phytate, présentées dans la figure 5A, tendent à être plus faibles dans les sols des 2 espèces de trèfle ; néanmoins, la différence n'est pas significative en raison de la forte variabilité. Dans le cas du malate, celui-ci semble avoir une tendance inverse à celle observée dans le cas du phytate, c'est-à-dire que les sols des deux espèces de trèfle tendent vers des teneurs supérieures mais les différences ne sont pas significatives.

Tableau 4 : Matrice de corrélation Pearson entre les traits des racines tertiaires et l'exsudation du C

Traits racines tertiaires	Quantité de ^{13}C dans les racines (mg)	Exsudation spécifique ($mg.g^{-1}$)
Surface	0.85***	-0.76***
Volume	0.93***	-0.74***
Diamètre	0.69***	-0.73***
Nombre d'apex	0.50*	$-0.38^{n.s.}$
Longueur spécifique	-0.48*	0.53*

Les valeurs significatives indiqués par des astérisques : ' ' p > 0.05, '' p < 0.05, '**' p < 0.01, '***' p < 0.001 ; pour toutes les variables, N = 20 toutes espèces confondues.*

Tableau 5 : Matrice de corrélation Pearson entre les composés P, les acides organiques et l'exsudation du C

	Malate	Oxalate	Citrate	Phosphate	Pyrophosphate	Phytate	Exsudation spécifique
Malate	1	-0.43	0.19	-0.14	-0.21	**-0.68*** **	0.37
Oxalate	-	1	0.30	**0.45***	**0.74*** **	**0.58** **	-0.41
Citrate	-	-	1	0.14	**0.50***	-0.06	-0.08
Phosphate	-	-	-	1	**0.60** **	0.17	**-0.47***
Pyrophosphate	-	-	-	-	1	0.29	**-0.56***
Phytate	-	-	-	-	-	1	-0.44
Exsudation spécifique	-	-	-	-	-	-	1

Valeurs significatives indiqués par des astérisques *: ' ' p > 0.05, '*' p < 0.05, '**' p < 0.01, '***' p < 0.001 ; pour toutes les variables n = 20 toutes espèces confondues. Se référer au matériels et méthodes pour les tests statistiques utilisés*

3.4. Relations entre les traits racinaires et l'exsudation du C et les teneurs en acides organiques dans le sol

Afin de déterminer les variables morphologiques explicatives de l'exsudation, une matrice de corrélation a été réalisée (**Tableau 4**). Les observations indiquent que l'exsudation spécifique est très fortement et inversement corrélée à la surface, au volume et au diamètre des racines tertiaires. Nous n'observons pas de corrélation entre le nombre d'apex et l'exsudation du C. Concernant la longueur spécifique, une corrélation positive a été observée avec l'exsudation spécifique. En plus de l'exsudation, le contenu en ^{13}C des racines est positivement corrélé à la surface et au volume des racines tertiaires.

Les résultats des dosages en acides organiques et des composés P du sol ont été reliés à l'exsudation via une matrice de corrélation (**Tableau 5**). Les observations montrent que seuls les résultats des composés P solubles présentent des corrélations significatives avec l'exsudation spécifique. En effet, à l'exception du phytate, une corrélation négative a été observée entre l'exsudation spécifique et le phosphate ainsi que le pyrophosphate. Concernant les relations entre les composés P et les acides organiques, c'est avec l'oxalate que le plus grand nombre de corrélations est observé. Les teneurs en oxalate sont corrélées positivement avec les teneurs en phosphate, pyrophosphate et phytate du sol. La même observation est faite entre les teneurs en citrate et en pyrophosphate. Dans le cas du malate, une corrélation négative a été observée avec le phytate.

4. Discussion

Dans le chapitre précédent de la thèse (Chapitre IV B), le lien entre l'activité photosynthétique et la rhizodéposition a été démontré. Nous avons également montré le lien entre la rhizodéposition du C et certains traits racinaires tels que la densité racinaire ou le contenu en C des racines. Dans l'étude présentée dans ce chapitre, nous nous sommes particulièrement intéressés à la composante exsudation du processus de la rhizodéposition (Jones *et al.*, 2009). Alors que l'étude précédente portait sur le devenir du ^{13}C apporté sur le long terme, et donc sur des plantes marquées une fois par semaine tout au long du cycle de culture, nous avons voulu centrer cette nouvelle étude sur le C nouvellement assimilé. Nous avons donc choisi de faire un seul marquage isotopique au ^{13}C de 24h et de suivre le transfert du C récent de la plante vers le sol afin de réduire la part de la rhizodéposition due à la sénescence et à la perte de cellules bordantes. En effet, la sénescence des tissus métaboliquement actifs ne représente pas un biais pour cette estimation sur une courte durée, il est peu probable que des tissus métaboliquement actifs puissent se dégrader et libérer du ^{13}C dans un intervalle de temps si court (Lesuffleur *et al.*, 2013). Dans le chapitre précédent, nous

avons montré que la photosynthèse est le moteur de la rhizodéposition. Cette nouvelle étude a met en évidence une relation forte entre la fixation du C et la quantité de C exsudée confirmant que la photosynthèse est un moteur important de l'exsudation (Prescott *et al.*, 2020). Pour aller au-delà de cette relation, la détermination de l'exsudation spécifique (C exsudé par unité C fixé) a été utilisée afin d'explorer d'autres variables qui pilotent l'exsudation.

4.1. *Exsudation spécifique et morphologie racinaire*

L'exsudation est souvent exprimée par unité de temps, de biomasse ou longueur racinaire (Paterson *et al.*, 2006; Nguyen, 2013; Dong *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2021) mais ce processus peut également être rapporté à la quantité de C assimilé (Phillips *et al.*, 2009). Dans cette étude, l'exsudation spécifique du C par unité de C atmosphérique assimilé s'est avérée être plus importante chez les deux espèces fourragères particulièrement le trèfle blanc, comparativement aux deux espèces protéagineuses. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les espèces prairiales sont connues pour allouer une part importante de C au compartiment souterrain par rapport aux espèces de grande culture sélectionnées pour leur production de grain (Kuzyakov et Domanski, 2000; Pausch et Kuzyakov, 2018). Au regard des traits racinaires, aucun lien ne semble exister entre exsudation spécifique et le nombre d'apex dans notre étude. Ce résultat est surprenant au vu des données de la littérature obtenues sur d'autres espèces qui ont montré que l'apex racinaire est un lieu privilégié d'exsudation (Jones *et al.*, 2009; Dennis *et al.*, 2010). Chez les espèces étudiées ici, la corrélation positive entre la longueur spécifique racinaire et l'exsudation spécifique, ainsi que la corrélation négative entre le diamètre et cette exsudation montrent que les plantes qui forment des racines longues et fines, tels que les 2 trèfles, sont celles qui exsudent le plus. En effet, les espèces présentant les longueurs spécifiques les plus élevées sont celles qui ont les diamètres moyens les plus faibles. Il a été constaté que plus les racines tertiaires sont fines, plus l'exsudation spécifique est importante. Ce diamètre est le second paramètre qui nous permet d'expliquer les différences d'exsudation entre les espèces étudiées. Ces données sont à rapprocher des études montrant que le flux de l'exsudation est plus important dans les racines fines (Phillips *et al.*, 2009; Akatsuki et Makita, 2020; Sell *et al.*, 2021). La modélisation du flux d'exsudation par unité de biomasse racinaire, montre également une plus forte exsudation dans les racines à faible diamètre (Nguyen, 2013). L'exsudation étant un processus de diffusion passive, il est dépendant à la fois du gradient de concentration et la

résistance rencontrée lors du passage des exsudats des racines vers le sol (Oburger et Jones, 2018). En particulier, la diffusion serait moins importante avec l'augmentation du diamètre racinaire avec un épaississement des parois cellulaires (McCormack *et al.*, 2015). En effet, les racines fines avec une densité plus faible par rapport aux racines à gros diamètre, présentent des flux d'éléments (absorption/émission) plus importants (Jungk, 2001; McCormack *et al.*, 2015).

En plus des traits précédents, une corrélation négative a été observée entre l'exsudation spécifique et le volume ainsi que la surface racinaire. Ces corrélations vont dans le même sens que les observations avec le diamètre en raison de la forte influence de cette variable sur le volume et la surface racinaire, les racines les plus fines sont celles qui présentent les plus faibles surfaces. Ces relations pourraient également s'expliquer par une forte réabsorption des composés exsudés. En effet, de nombreuses études montrent que l'exsudation résulte à la fois de la sortie des composés carbonés (efflux) mais aussi de leur réabsorption (influx) (Jones et Darrah, 1992; Nguyen, 2013). Cette hypothèse est appuyée par l'existence d'une forte relation inverse entre l'exsudation et la quantité de ^{13}C retrouvée dans les racines ($r = -0.61$; $p < 0.05$). Le contenu en ^{13}C des racines est à son tour fortement corrélé à la surface et au volume des racines. Cela suggère que l'exsudation est dépendante de phénomènes physiologiques (allocation des ressources) qui sont eux-mêmes sous la dépendance de la morphologie racinaire.

4.2. *Teneurs en composés P et acides organiques dans le sol*

L'aspect qualitatif dans cette étude a été abordé *via* l'analyse des teneurs acides organiques et des composés phosphorés du sol. L'impact de l'exsudation des acides organiques sur la nutrition P des plantes à fait l'objet de nombreuses études. En effet, il est établi que l'une des stratégies développées par les plantes supérieures pour mobiliser et solubiliser le P du sol est l'exsudation d'acides organiques (Jones, 1998 ; Jones *et al.*, 2001). Nous n'avons pas quantifié dans cette étude l'exsudation des acides organiques, mais l'impact des différentes Fabacées sur la teneur en acides organiques et certains composés P du sol. Au regard des composés phosphorés, une différence significative a été observée uniquement pour les teneurs en phosphate. En effet, le pois s'est distingué des autres espèces par une forte teneur en phosphate du sol. Cette forte teneur ne s'explique pas par une plus forte dégradation du P organique et inorganique (Horii *et al.*, 2013; Hamczyk et Villa-Bellosta, 2018) car le pois n'a pas présenté des teneurs plus faible en phytate et pyrophosphate. Il est donc possible que ce résultat soit lié à une faible capacité d'absorption du phosphate par le pois. Ces résultats sont à rapprocher d'une étude portant sur l'absorption du P montrant que la féverole présente une meilleure capacité de mobilisation du P que le pois et présente des tissus plus riches en P résultant ainsi

d'une meilleure utilisation du P (Nuruzzaman *et al.*, 2005). En outre, les 2 trèfles ont présenté des racines plus fines et des longueurs racinaires spécifiques plus importantes. Ces caractéristiques racinaires sont essentielles au vu de la faible teneur en P dans le sol en début de culture, car l'acquisition de P par la plante dépend fortement d'une exploration efficace du sol (Lynch et Beebe, 1995; Lazali *et al*., 2020). En effet, le diamètre des racines est considéré comme un paramètre déterminant de la stratégies d'acquisition du P par les plantes (Wen *et al.*, 2019; Ding *et al*., 2021), la longueur spécifique est souvent associée à ce processus *(Gruber et al*., 2013; Lugli *et al*., 2020). Seule une étude portant plus précisément sur ces capacités d'absorption et de mobilisation et les teneurs en P des tissus pourrait permettre de confirmer cette hypothèse.

Parmi les composés majoritaires dans les exsudats figurent les sucres, les acides organiques et les acides aminés (Jones, 1998; Paynel *et al*., 2001). La corrélation négative que nous observons entre l'exsudation spécifique et la teneur en phosphate et pyrophosphate pourrait s'explique par un effet de l'exsudation des acides organiques sur la nutrition P (Jones, 1998; Nuruzzaman *et al.*, 2006; Spohn *et al.*, 2013). Une étude mesurant l'enrichissement en ^{13}C des acides organiques pourrait permettre de tester cette hypothèse. Il a également été observé dans cette étude que l'oxalate présente des corrélations fortes avec les composés P rhizosphériques. En effet, la littérature montre le rôle important de cet acide organique dans la désorption des composés P dans les sols et leurs solubilisations permettant ainsi l'absorption par la plante (Fox *et al.*, 1990). Les stratégies d'acquisition du P sont multiples chez la plupart des espèces et certaines d'entre elles peuvent être dominantes par rapport aux autres (Ding *et al.*, 2021). Par exemple, les traits physiologiques de la féverole montrent une réponse plus forte à la carence en P rapport aux traits morphologiques (Zhang *et al.*, 2016). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la féverole avec une faible longueur spécifique aurait eu tendance à compenser avec l'exudation d'oxalate. Différents facteurs morphologiques et physiologiques interviennent ainsi dans l'acquisition du P avec des relations complexes et variables en fonction des espèces. Certaines études démontrent que les plantes se distinguent par le type et quantités d'acides organiques exsudés (Jones, 1998; Pearse *et al.*, 2006; Lazali *et al*., 2020).

5. Conclusion

Dans le chapitre précédent, l'étude de la rhizodéposition dans son ensemble a montré toute la complexité de la compréhension de ce processus et des facteurs qui peuvent la moduler, en fonction des espèces, sur un cycle de culture complet. En s'intéressant à l'exsudation dans cette étude, il s'agissait d'analyser le lien entre l'apport du C récent de la plante vers le sol et les traits racinaires. L'exsudation s'est avérée fortement liée à la photosynthèse et à l'allocation de

ressources dans les différents compartiments. Cette étude montre que les racines les plus fines semblent exsuder plus de C récent que les racines présentant des diamètres plus élevés. Cette étude confirme également les relations existantes entre les teneurs en acides organiques et en P dans le sol. L'effet spécifique des plantes étudiées sur ces teneurs nécessite cependant des analyses plus approfondies.

Remerciements

Nous remercions la région Normandie pour le support financier. Nous sommes reconnaissants envers le personnel technique de l'UMR EVA et de AGHYLE UniLaSalle-Rouen pour l'aide technique précieuse qu'ils ont apporté. Nous remercions aussi le plateau d'analyse PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) pour les analyses isotopiques, Joey Habbib pour les analyses de morphologie racinaire et Cécile Revellin, UMR1347 Agroécologie Agrosup-INRAe-uB, pour la fourniture des souches de Rhizobium.

Références

Akatsuki M, Makita N (2020) Influence of fine root traits on in situ exudation rates in four conifers from different mycorrhizal associations. Tree Physiol 40: 1071–1079

Almeida DS, Delai LB, Sawaya ACHF, Rosolem CA (2020) Exudation of organic acid anions by tropical grasses in response to low phosphorus availability. Sci Rep 10: 1–8

Audette Y, Smith DS, Parsons CT, Chen W, Rezanezhad F, Van Cappellen P (2020) Phosphorus binding to soil organic matter via ternary complexes with calcium. Chemosphere 260: 127624

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol 57: 233–266

C. Nguyen (2013) La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour les plantes. doi: 10.13140/RG.2.2.24365.84969

Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?: Root exudates and rhizosphere bacteria. FEMS Microbiol Ecol 72: 313–327

Ding W, Cong W-F, Lambers H (2021) Plant phosphorus-acquisition and -use strategies affect soil carbon cycling. Trends Ecol Evol 36: 899–906

Dong J, Hunt J, Delhaize E, Zheng SJ, Jin CW, Tang C (2021) Impacts of elevated CO2 on plant resistance to nutrient deficiency and toxic ions via root exudates: A review. Sci Total Environ 754: 142434

Fox TR, Comerford NB, McFee WW (1990) Kinetics of phosphorus release from spodosols: effects of oxalate and formate. Soil Sci Soc Am J 54: 1441–1447

Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B (2010) Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. Agron Sustain Dev 30: 57–66

Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N (2013) Plasticity of the Arabidopsis Root System under Nutrient Deficiencies. Plant Physiol 163: 161–179

Guinet M, Nicolardot B, Voisin A-S (2020) Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling. Eur J Agron 120: 126151

Hamczyk MR, Villa-Bellosta R (2018) Pyrophosphate metabolism and calcification. Aging 10: 3652–3653

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. 23

Hinsinger P, Betencourt E, Bernard L, Brauman A, Plassard C, Shen J, Tang X, Zhang F (2011) P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. Plant Physiol 156: 1078–1086

Horii S, Matsuno T, Tagomori J, Mukai M, Adhikari D, Kubo M (2013) Isolation and identification of phytate-degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil. J Gen Appl Microbiol 59: 353–360

Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant Soil 205: 25–44

Jones DL, Darrah PR (1992) Re-sorption of organic components by roots of Zea mays L. and its consequences in the rhizosphere: I. Re-sorption of 14C labelled glucose, mannose and citric acid. Plant Soil 143: 259–266

Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. Plant Soil 321: 5–33

Jungk A (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. J Plant Nutr Soil Sci 164: 121–129

Kanté M, Riah-Anglet W, Cliquet J-B, Trinsoutrot-Gattin I (2021) Soil Enzyme Activity and Stoichiometry: Linking Soil Microorganism Resource Requirement and Legume Carbon Rhizodeposition. Agronomy 11: 2131

Kuzyakov Y, Domanski G (2000) Carbon input by plants into the soil. Review. J Plant Nutr Soil Sci 163: 421–431

Lal R (2015) Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. Sustainability 7: 5875–5895

Lazali M, Brahimi S, Benadis C, Drevon JJ (2020) Stratégies et mécanismes d'adaptation des légumineuses à la faible disponibilité des sols en phosphore. Rev. Marocaine Sci. Agron. Vét. 8:

Lesuffleur F, Salon C, Jeudy C, Cliquet JB (2013) Use of a 15N2 labelling technique to estimate exudation by white clover and transfer to companion ryegrass of symbiotically fixed N. Plant Soil 369: 187–197

Lichtfouse E, ed (2018) Sustainable Agriculture Reviews 31: Biocontrol. doi: 10.1007/978-3-319-94232-2

López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. Curr Opin Plant Biol 6: 280–287

Lugli LF, Andersen KM, Aragão LEOC, Cordeiro AL, Cunha HFV, Fuchslueger L, Meir P, Mercado LM, Oblitas E, Quesada CA, et al (2020) Multiple phosphorus acquisition strategies adopted by fine roots in low-fertility soils in Central Amazonia. Plant Soil 450: 49–63

Lynch JP, Beebe SE (1995) Adaptation of beans (Phaseolus vulgaris L.) to low phosphorus availability. HortScience 30: 1165–1171

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

Meena RS, Lal R (2018) Legumes and sustainable use of soils. Legum. Soil Health Sustain. Manag. Springer, pp 1–31

Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23: 375–396

Nuruzzaman M, Lambers H, Bolland MD, Veneklaas EJ (2005) Phosphorus benefits of different legume crops to subsequent wheat grown in different soils of Western Australia. Plant Soil 271: 175–187

Nuruzzaman M, Lambers H, Bolland MDA, Veneklaas EJ (2006) Distribution of Carboxylates and Acid Phosphatase and Depletion of Different Phosphorus Fractions in the Rhizosphere of a Cereal and Three Grain Legumes. Plant Soil 281: 109–120

Oburger E, Jones DL (2018) Sampling root exudates – Mission impossible? Rhizosphere 6: 116–133

Paterson E, Sim A, Standing D, Dorward M, McDonald AJS (2006) Root exudation from Hordeum vulgare in response to localized nitrate supply. J Exp Bot 57: 2413–2420

Pausch J, Kuzyakov Y (2018) Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. Glob Change Biol 24: 1–12

Paynel F, Murray PJ, Cliquet JB (2001) Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. Plant Soil 229: 235–243

Pearse SJ, Veneklaas EJ, Cawthray GR, Bolland MDA, Lambers H (2006) Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. Plant Soil 288: 127–139

Phillips RP, Bernhardt ES, Schlesinger WH (2009) Elevated CO2 increases root exudation from loblolly pine (Pinus taeda) seedlings as an N-mediated response. Tree Physiol 29: 1513–1523

Prescott CE, Grayston SJ, Helmisaari H-S, Kaštovská E, Körner C, Lambers H, Meier IC, Millard P, Ostonen I (2020) Surplus Carbon Drives Allocation and Plant–Soil Interactions. Trends Ecol Evol 35: 1110–1118

Richardson AE, George TS, Hens M, Delhaize E, Ryan PR, Simpson RJ, Hocking PJ (2022) Organic anions facilitate the mobilization of soil organic phosphorus and its subsequent lability to phosphatases. Plant Soil. doi: 10.1007/s11104-022-05405-5

Santos SR, Silva E de B, Alleoni LRF, Grazziotti PH (2017) Citric acid influence on soil phosphorus availability. J Plant Nutr 40: 2138–2145

Schneider A, Huyghe C (2015) Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. éditions Quae

Sell M, Ostonen I, Rohula-Okunev G, Rusalepp L, Rezapour A, Kupper P (2021) Responses of fine root exudation, respiration and morphology in three early successional tree species to increased air humidity and different soil nitrogen sources. Tree Physiol tpab118

Sharpley A (2000) Phosphorus availability. Handb Soil Sci D18–D37

Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. Plant Physiol 156: 997–1005

Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. Plant Physiol 156: 1050–1057

Spohn M, Ermak A, Kuzyakov Y (2013) Microbial gross organic phosphorus mineralization can be stimulated by root exudates – A 33P isotopic dilution study. Soil Biol Biochem 65: 254–263

Tang L, Zhan M, Shang C, Yuan J, Wan Y, Qin M (2021) Dynamics of root exuded carbon and its relationships with root traits of rapeseed and wheat. Plant Soil Environ 67 (2021): 317–323

Uren NC (2001) Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. p. 19–40. R. Pinton et al.(ed.) The rhizosphere: Biogeochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, New York. Types Amounts Possible Funct. Compd. Released Rhizosphere Soil-Grown Plants P 19–40 R Pinton Aled Rhizosphere Biogeochem. Org. Subst. Soil-Plant Interface Marcel Dekker N. Y.

Velten S, Leventon J, Jager N, Newig J (2015) What Is Sustainable Agriculture? A Systematic Review. Sustainability 7: 7833–7865

Waithaisong K, Robin A, Martin A, Clairotte M, Villeneuve M, Plassard C (2015) Quantification of organic P and low-molecular-weight organic acids in ferralsol soil extracts by ion chromatography. Geoderma 257–258: 94–101

Wang X, Yang Y, Pei K, Zhou J, Peixoto L, Gunina A, Zeng Z, Zang H, Rasmussen J, Kuzyakov Y (2020) Nitrogen rhizodeposition by legumes and its fate in agroecosystems: A field study and literature review. Land Degrad. Dev.

Wen Z, Li H, Shen Q, Tang X, Xiong C, Li H, Pang J, Ryan MH, Lambers H, Shen J (2019) Tradeoffs among root morphology, exudation and mycorrhizal symbioses for phosphorus-acquisition strategies of 16 crop species. New Phytol 223: 882–895

Wichern F, Mayer J, Joergensen RG, Müller T (2007) Rhizodeposition of C and N in peas and oats after 13C–15N double labelling under field conditions. Soil Biol Biochem 39: 2527–2537

Zhang D, Zhang C, Tang X, Li H, Zhang F, Rengel Z, Whalley WR, Davies WJ, Shen J (2016) Increased soil phosphorus availability induced by faba bean root exudation stimulates root growth and phosphorus uptake in neighbouring maize. New Phytol 209: 823–831

Chapitre IV D :

Ce chapitre est présenté sous forme d'article intitulé **« Soil Enzyme Activity and Stoichiometry: Linking Soil Microorganism Resource Requirement and Legume Carbon Rhizodeposition »,** publié dans Agronomy 2021, 11, 2131. https://doi.org/10.3390/ agronomy11112131

Une partie des résultats sont issus *du stage de M1 de Biologie-Agrosciences de l'université de Caen de Pierre Bergerot (2019-2020) que j'ai co-encadré avec Wassila Riah-Anglet*

Préambule

Le carbone rhizodéposé constitue un apport direct d'éléments organiques dans le sol qui sont utilisés comme source d'énergie primaire pour les microorganismes, stimulent la croissance microbienne dans la rhizosphère. Cet effet de l'apport en éléments organiques est connu sous le nom d'effet « priming » de la rhizosphère. Dans les chapitres précédents, nous avons observé une rhizodéposition contrastée entre les espèces de Fabacées étudiées. Dans ce chapitre, nous avons évalué l'influence de la quantité de C rhizodéposé sur la dynamique des éléments C, N et P dans le sol. Ainsi un panel d'activités enzymatiques (β-glucosidase : BG ; N-acétyl-β-glucosaminidase : NAG ; arylamidase : ARYLN et les phosphatases acides : ACP et alcalines AKP) a été mesuré. Des approches de stœchiométrie enzymatique ont été appliquées pour examiner les limitations métaboliques des communautés microbiennes du sol.

Principaux résultats

- Les espèces ayant présenté les quantités les plus importantes de rhizodépots à savoir la féverole, le trèfle blanc et le trèfle incarnat présentent les niveaux d'activités enzymatiques les plus élevés (BG, NAG, et ACP).

- Les différences d'activités enzymatiques s'expliquent par les traits fonctionnels avec notamment le ratio C : N des organes végétaux, la production de biomasse et la longueur des racines.

- Les microorganismes sont moins limités en ressources P et C pendant le développement reproducteur chez la féverole et les deux trèfles.

agronomy

MDPI

Article

Soil Enzyme Activity and Stoichiometry: Linking Soil Microorganism Resource Requirement and Legume Carbon Rhizodeposition

Mohamed Kanté [1,2,3], Wassila Riah-Anglet [1,3,*], Jean-Bernard Cliquet [2,3] and Isabelle Trinsoutrot-Gattin [1,3]

[1] UniLaSalle, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, Rouen Team, 3 Rue du Tronquet, F-76134 Mont-Saint Aignan, France; mohamed.kante@unicaen.fr (M.K.); Isabelle.GATTIN@unilasalle.fr (I.T.-G.)
[2] Caen-Normandy University (UNICAEN), INRAE, EVA, 14032 Caen CEDEX, France; jean-bernard.cliquet@unicaen.fr
[3] Research Federations NORVEGE Fed4277, Normandy University, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France
* Correspondence: wassila.RIAH-ANGLET@unilasalle.fr; Tel.: +33-2-3282-9198; Fax: +33-2-3505-2740

Abstract: Legumes provide multiple ecosystem services in agricultural systems. The objectives of this study were to evaluate the influence of different legumes through C rhizodeposition on the dynamics of C, N and P in soil and on microbial communities' resource requirements. Legumes pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L.), white clover (*Trifolium repens* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and non-legume wheat (*Triticum aestivum* L.) were grown in pots. Carbon rhizodeposition was quantified by using $^{13}CO_2$ labeling, and six soil enzyme activities were measured: β-glucosidase (BG), arylamidase (ARYLN), N-acetyl-glucosaminidase (NAG), phosphatases (PHO) and alkaline and acid phosphatases (AKP and ACP). Enzyme stoichiometry approaches were applied. The results showed that BG, NAG and ACP activities were positively influenced by faba bean and clovers. Enzyme stoichiometry analysis revealed a limitation of microorganisms in C and P resources at the plant reproductive stage. These results were explained by plant functional traits. Plant biomass production, root total length, the ability of plants to rhizodeposit C and the C and N content of plant tissues were the main explicative factors. This study also shows that N and C nutrient supplies positively contribute to nutritional requirements and the growth of microorganisms and P availability in soil.

Keywords: C rhizodeposition; enzyme activities; microbial communities; C, N, P cycling; legume crops; plants functional traits

Citation: Kanté, M.; Riah-Anglet, W.; Cliquet, J.-B.; Trinsoutrot-Gattin, I. Soil Enzyme Activity and Stoichiometry: Linking Soil Microorganism Resource Requirement and Legume Carbon Rhizodeposition. *Agronomy* **2021**, *11*, 2131. https://doi.org/10.3390/agronomy11112131

Academic Editor: Marisol Berti

Received: 27 September 2021
Accepted: 21 October 2021
Published: date

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

Copyright: © 2021 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/).

1. Introduction

For several decades, the intensification of agricultural activity and the use of chemical fertilizers have generated significant environmental changes, pollution and biological disturbances [1–4]. These negative effects have resulted in the emergence of new sustainable agricultural practices aimed to reduce environmental changes and improve soil quality while ensuring food and nutritional security for a growing population [5–7]. The sustainability of agricultural systems requires better use of ecological functions and a valorization of natural resources through ecological intensification of agriculture [8–12]. Among the agroecological solutions, the integration of legumes in crop rotations contributes to the sustainability of agricultural systems. The presence of legumes in agricultural production provides multiple ecosystem services [13]. Legumes contribute to the increase in soil organic matter, improve soil structure, maintain soil biodiversity and have the ability to fix atmospheric nitrogen (N_2) through root

symbiosis with rhizobiaceae [14–16]. The specific use of N_2 fixed by legume crops for their nutrition can allow the reduction in chemical fertilization and the provision of N to succeeding crops in a rotation [17–19]. The processes by which legumes enrich soil with N include the burial of non-harvested organs and rhizodeposition [20–22]. This process is defined as the emission of a wide range of compounds from plant roots during growth including root senescence, secretion of border cells and exudation of various compounds [23]. In addition to N compounds, rhizodeposition is also the pathway by which carbon compounds enter in the soil [24–26]. On average, 17% of carbon (C) fixed by the plant is allocated to rhizodeposition, and this figure varies widely among plant species [27]. This C may shape microbial community composition, structure and activity [28–30].

Soil microbial communities play an important role in agroecosystem functioning and are essential for plant nutrition and health [31]. They contribute to global element cycling and are involved in turnover processes of organic matter, breakdown and the formation of soil aggregates [31–34]. Soil microbial communities support 80–90% of biochemical reactions in soil [35], largely driven by the presence of enzymes catalyzing the different reactions [36–41]. The enzyme activity of rhizospheric soil is usually higher than that of bulk soil. The higher enzyme activity in the rhizosphere is due not only to the stimulation of root-related microbial activity through rhizosphere deposition but also due to the release of enzymes by the root or by lysing root cells. These enzymes usually catalyze the formation of products absorbed by plant roots or rhizosphere microorganisms [42–44]. Therefore, the enzyme activities at the plant–soil interface may reflect improvement of the highly integrated microorganism–plant associations (symbiotic and plant growth promoting rhizobacteria) and control of plant pathogens and pests. The spectrum of rhizosphere enzyme activities is considered as a footprint of plant–microorganism interactions [45]. Moreover, soil enzyme activities (including rhizosphere ones) can be useful indexes of changes occurring in the microbial functioning in soil, as affected by various and different factors [46–50]. Enzyme activities are controlled by the availability of resources in soil and plants demands. Recent studies have shown that legumes can regulate soil enzymatic activities [51–53]. Legumes such as chickpea and cowpea have been shown to increase phosphatase activities compared with non-legumes [54,55]. Additionally, it has been shown that the activities of β-glucosidase, N-acetyl glucosaminidase and arylamidase are greater under pea, faba bean and vetch crops than under wheat and oat crops [56,57]. Siczek et al. [58] have shown that the activities of dehydrogenase, protease and urease were higher under faba bean than wheat at the reproductive stage.

Soil extracellular enzyme activities and associated enzymatic stoichiometry are considered as sensitive indicators of nutrient availability and microbial substrate limitation [59–61]. Indeed, the partitioning of C between anabolic and catabolic processes affects the rate of C accumulation in soils [62] and also changes the levels of N and P rates, which are limiting factors for the growth of plant and microorganisms in soils [63]. The use of the C:N, C:P and N:P ratios could help to better understand resource allocation in soil–plant interactions [64,65]. Enzymatic stoichiometry ratio of C, N or P-acquiring enzymes can, thus, determine the relationships between microbial nutrient demands and soil nutrient supplies [66,67] and has been suggested as an efficient method for indicating the relative resource limitation of soil microorganisms [68–76]. A meta-analysis conducted by Sinsabaugh et al. [69] concluded that microbial C:N:P acquisition ratios converge on a 1:1:1 scale based on the activities of ln (β-1,4-glucosidase): ln (Leucine-aminopeptidase + β-1,4-*N*-acetylglucosaminidase): ln (phosphatase). Studies dealing with enzymatic stoichiometry have highlighted that using a single enzyme activity as an indicator of nutrient dynamics in soil is not representative of the complexity of metabolic activities in agrosystems. As the degradation of organic matter in soil requires the interaction of several enzymes, it could be more effective and relevant to combine a wide variety of soil enzymes [59,77]. These enzymes include those involved in the decomposition of different substrates with varying complexity in relation to C, N and P cycling.

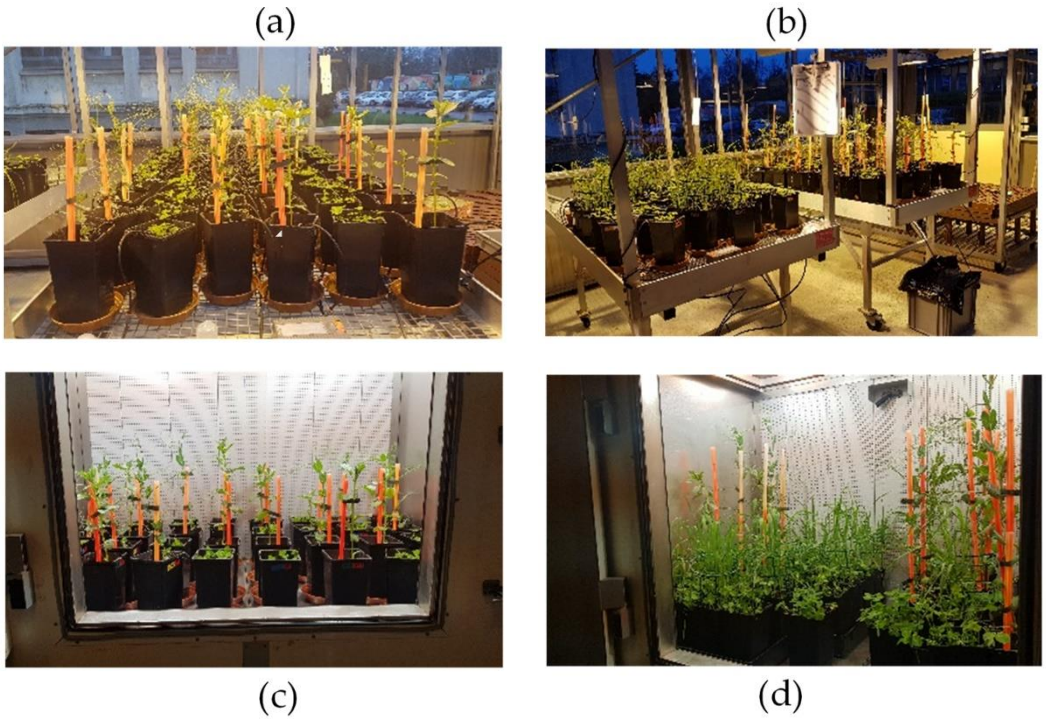


Figure 1. (a) and (b) plant growing in greenhouse; (c) and (d) plants in the growing chamber

The objective of this study was to evaluate the influence of different forage and seed legumes through C rhizodeposition on the dynamics of C, N and P elements in terms of soil and microbial communities' resource requirements. We hypothesized the following: (1) soil enzymatic profiles would differ between legume species, and the variability could be related to their functional trait and rhizodeposition of C and (2) soil microbial communities will be less energy limited (C) and nutrient limited (N, P) due to C rhizodeposition. Therefore, we tried to understand the determinism of enzymatic activities and microorganisms' nutrient limitation under different legumes cover crops. Enzymatic activities related to C, N and P cycling and C rhizodeposition under the different legumes crops were monitored. A study of enzymatic stoichiometry was then carried out to determine the resource limitation of the microorganisms.

2. Materials and Methods

2.1. Soil and Plant Material

Soil used in this study was a loamy soil collected at 0–20 cm depth from an arable soil (Seine et Marne, France 49°33′ N, 0°46′ W) and sieved at 5 mm with the following characteristics: clay 207 $g.kg^{-1}$, silt 706 $g.kg^{-1}$, sand 87 $g.kg^{-1}$, total carbon content 9.03 $g.kg^{-1}$, total nitrogen content 1.06 $g.kg^{-1}$ and available P (Olsen) 85.51 $mg.kg^{-1}$, pH 7.85 (water).

The experiment was conducted using four legume species: pea (*Pisum sativum L.*), faba bean (*Vicia faba* L.), white clover (*Trifolium repens* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) used as a non-N_2 fixing species.

2.2. Growing Conditions and Experimental Design

The experiment was carried out under controlled conditions in a greenhouse until the plant reproductive stage (**Figure 1a,b**). After seed sterilization and ten days of germination (including 2 to 3 days for seedlings emergence), seedlings were transferred to a 2 L pot (20 cm depth) containing 1.8 kg soil adjusted between 70 and 80% of the soil water holding capacity (WHC). Twenty replicates of each species were grown. The seedlings were sown according to their field sowing density adapted to the area of the pots: 380 $seeds.m^{-2}$ (four seedlings per pot) for wheat, 40 $seeds.m^{-2}$ for faba bean (one seedling per pot), 70 $seeds.m^{-2}$ (one seedling per pot) for pea, 500 $seeds.m^{-2}$ (six seedlings per pot) for white clover and 600 $seeds.m^{-2}$ (eight seedlings per pot) for crimson clover. The spacing varied between 3 and 6 cm between the seedlings depending on the species. The plants were grown until the reproductive stage for each species: wheat (14 weeks after transplanting), faba bean (16 weeks), pea (13 weeks) and 15 weeks for white and crimson clovers. The first harvest took place one month after the transplanting corresponding to the vegetative stage (VS), and the second harvest took place at the reproductive stage (RS) when aboveground biomass had reached more than 50% of senescence. The pots were automatically watered with a flow rate of 60 $mL.pot^{-1}.day^{-1}$ and were manually adjusted to maintain the WHC between 70 and 80%. Additional light was provided by sodium lamps (400 W Philips SON T-PIA Agro, providing 400 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ photosynthetic active photons) with a photoperiod of 16 h day at 20 °C and 8 h night at 18 °C.

2.3. $^{13}CO_2$ Labeling of Plants

In order to estimate C rhizodeposition of the different crops, plants were introduced once a week for 24 h into a growth chamber for $^{13}CO_2$ labeling (**Figures 1c,d**). This labeling started 3 weeks after transplanting and lasted for 10 weeks. The growth chamber was equipped for automatic control of light, temperature, moisture, CO_2 concentration and $^{13}CO_2$ enrichment (Froids et Mesures, Beaucouze, France). The photoperiod and the day and night temperatures were similar to those used in the greenhouse. Control soil samples (five replicates) were harvested before the beginning of the labeling for ^{13}C natural abundance determination. Crop labeling lasted for 16 h per day, and the equipment was similar to that used by Cliquet et al. [78]. After labeling, the plants were taken back to the greenhouse. Before beginning labeling, the CO_2 concentration of the chamber was reduced

to 50 ppm by compressing atmospheric air with a compressor and removing CO_2 with a soda cartridge that trapped CO_2 and reinjected air into the chamber. $^{13}CO_2$ was then injected into the chamber to reach a CO_2 concentration of 400 ppm and an ^{13}C atom excess of 4.88%. Constant CO_2 concentrations and ^{13}C enrichment were obtained by continuously mixing a small amount of $^{13}CO_2$ (1 > 99%) with industrial $^{13}CO_2$ (1.07825%^{13}C) through the use of two mass flow controllers. These controllers were piloted by a master box (2MProcess, le Plessis-Trévise, France) connected to an infrared CO_2 analyzer (ADC MGA3000). The final ^{13}C levels of the atmosphere were determined by using triplicate samples of the gas inside the growth chamber collected through an exit valve at 11 a.m. and 16 p.m.

2.4. Harvest and Analyses

At both harvest points (VS and RS with 5 replicates per species at each harvest), plant shoots were cut. Roots were carefully separated from the soil by hand and washed with demineralized water. At each harvest (VS and RS), 5 more replicates were harvested to collect the entire root system. This root system was kept in an alcoholic solution and scanned the following day by using an EPSON EXPRESSION 10000XL scanner. WinRHIZO version 2007d (Regent Instruments Inc., Canada) was used to determine root traits. The harvested plant tissues were then dried at 60 °C for 72 h and weighed for dry mass determination. All tissues were then ball milled. The %C and %N were determined by using an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Nu Instruments, Manchester, UK). Different plant functional traits were determined: (1) total dry mass (g), (2) shoot to root ratio, the ratio of total shoot dry biomass to total root dry biomass, (3) total root length (cm) and (4) shoot and root C:N ratio.

For each harvest, soil was collected, passed through a 5 mm sieve, frozen with liquid N and stored at −80 °C prior to enzymatic activities analyses. Some soil samples were also dried, ball milled and submitted to EA-IRMS in order to determine total C, N and ^{13}C enrichment. Soil extractable phosphates were also determined by extraction in $NaHCO_3$ (P Olsen; according to ISO 11263:1994). Soil C:N, C:P and N:P ratios were then determined.

2.5. C Rhizodeposition Determination

Data from IRMS analyses allowed the determination of the amounts of C present in the soil compartment and were fixed during the labeling period with the following equation.

$$\text{Soil CdfR (mg)} = \left(\frac{\text{atom excess \% of soil}}{\text{atom excess \% of the atmosphere}}\right) \text{x Soil total C (mg)} \quad (1)$$

CdfR was C derived from rhizodeposition, atom excess % of the atmosphere was 4.88% and unlabeled control compartments were used to determine the atom excess % of soil. This amount of labeled C was calculated for each harvest.

2.6. Enzyme Activities and Stoichiometry

The enzymes activities analyzed in this study were involved in C, N and P rich compound degradations. For the C cycle, β-glucosidase activity (BG; EC: 3.2.1.21) was assessed; for the N cycle, N-acetyl-glucosaminidase (NAG; EC: 3.2.1.30) and arylamidase (ARYLN; EC: 3.5.1.5) activities were evaluated. For the P cycle, total phosphatases (PHO; EC 3.1.4.1), acid and alkaline phosphatases (ACP; EC 3.1.3.2 and AKP; EC 3.1.3.1) were assessed. These enzymes activities were measured by using colorimetric substrates in 96-wells in triplicate using the procedure detailed in the ISO 20130:2018. Briefly, 4 g of fresh soil was homogenized for 10 min at 250 rpm with 25 mL of deionized water for BG, NAG and PHO activities or Trizma buffer (50 mM) at pH 7.5 for ARYLN, at pH 5.5 for ACP and at pH 11 for AKP activities. Soil solutions were incubated, respectively, with 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside 0.05 M (301.3 $g.mol^{-1}$, Sigma), 4-N-acetyl-β-D-glucosaminide 0.01 M (342.3 $g.mol^{-1}$, Sigma) and 4-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate 0.05 M

Table 1. Soil chemical characteristics under all studied plants species at the two development stages.

	Total C (g·kg⁻¹)		Total N (g·kg⁻¹)		P Olsen (mg·kg⁻¹)		C:N		C:P		N:P	
	VS	*RS*	*VS*	*RS*	*VS*	*RS*	*VS*	*RS*	*VS*	*RS*	*VS*	*RS*
Wheat	11.77 ± 0.18 b	11.37 ± 0.28 ab	1.77 ± 0.47 b	1.29 ± 0.02 ab	143.5 ± 3.3 a	137.7 ± 2.3 b	6.94 ± 1.56 a	8.80 ± 0.28 a	82.1 ± 1.8 b	82.6 ± 3.1 b	12.40 ± 3.36 b	9.39 ± 0.24 b
Faba bean	11.64 ± 0.22 ab	11.73 ± 0.10 bc	1.36 ± 0.10 a	1.33 ± 0.03 b	147.8 ± 3.2 ab	100.6 ± 5.7 a	8.56 ± 0.52 b	8.78 ± 0.18 a	78.8± 2.3 ab	116.8± 6.0 c	9.22 ± 0.59 a	13.30 ± 0.56 c
Pea	11.25 ± 0.36 a	11.01 ± 0.24 a	1.29 ± 0.11 a	1.28 ± 0.04 a	151.5 ± 3.5 ab	130.9 ± 10.5 b	8.73 ± 0.56 b	8.58 ± 0.28 a	74.3 ± 3.0 a	84.5 ± 7.0 b	8.54 ± 0.80 a	9.83 ± 0.57 b
White clover	11.51 ± 0.18 ab	11.81 ± 0.26 cd	1.25 ± 0.02 a	1.34 ± 0.02 b	150.9 ± 4.1 ab	88.6 + 5.1 a	9.14 ± 0.11 b	8.81 ± 0.14 a	76.3 ± 2.9 a	133.6 ± 6.4 d	8.35 ± 0.37 a	15.16 ± 0.65 d
Crimson clover	11.39 ± 0.26 ab	12.20 ± 0.29 d	1.33 ± 0.07 a	1.39 ± 0.03 c	155.4 ± 7.8 b	92.9 ± 1.9 a	8.54 ± 0.60 ab	8.74 ± 0.12 a	73.4 ± 3.6 a	131.4 ± 3.3 d	8.62 ± 0.49 a	15.02 ± 0.30 d
Plants species × development stages	$F = 9.35$ ***		$F = 5.43$ **		$F = 55.42$ ***		$F = 5.17$ **		$F = 93.85$ ***		$F = 29.64$ ***	

VS: Vegetative stage; RS: Reproductive stage. Statistical data are expressed as means ± SD, ($n = 5$). Means in a column followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$), different letters mean significant difference according to the Tukey test. Two-way ANOVA analysis (F values) showing the effect of the interaction between the plant species and the two development stages on soil chemical characteristics. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

(371.1 g.mol^{-1}, Sigma) for PHO, ACP and AKP. The reaction was stopped with 0.5 M $CaCl_2$ and 0.1 M Tris at pH 12, each plate was centrifuged for five min 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). 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. The activities of soil enzymes were expressed as nmoles of hydrolyzed substrate per minute per gram of dry soil. For each soil sample, the geometric mean (GMea) of enzyme activities was calculated as described by García-Ruiz et al. [79].

$$\text{GMea} = \sqrt[6]{\text{BG x NAG x ARYLN x PHO x AKP x ACP}} \quad (2)$$

Enzymatic stoichiometry was also determined as the ratio of enzyme activities involved in C, N and P compounds degradation (C:N, C:P and N:P acquiring enzyme ratios), according to Hill et al. [71]. Two other indices described by Moorhead et al. [80] were determined. They illustrate the microbial metabolic limitations by plotting the proportional C:N vs. C:P acquiring enzymes. After connecting a line between the plot origin and point represented by these proportions, the length and angle of the vector were used to quantify relative C limitation and relative P vs. N limitations, respectively. The following equations were used:

$$\text{Vector length (L)} = \sqrt{(x^2 + y^2)} \quad (3)$$

$$\text{Vector angle (A)} = \text{DEGREES (ATAN2}(x, y)) \quad (4)$$

where x and y correspond, respectively, to acquiring enzyme C:P and C:N ratios. Longer vector length indicates greater C limitation. A vector angle <45° denotes N limitation; an angle of >45° denotes P limitation.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out by using the software R (R Development Core Team, 3.5.0 version). 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. The effects of the interaction between the plant species and the two development stages (VS and RS) on the measured parameters were tested by using two-way ANOVA. Correlations between plant functional traits, soil characteristics, enzyme activities and stoichiometry components (enzyme, soil C:N:P ratios and vectors) were assessed with Pearson's correlation test. Principal component analyses (PCA) were performed in order to analyze the changes in all the measured data to evaluate the effects of the species and their development stage on soil enzymes activities and microbial resources requirement. The Kaiser–Meyer–Olkin measure (KMO) of sampling adequacy and Bartlett's test of sphericity were used to test the validity of PCA.

3. Results

3.1. Soil Characteristics

The total soil C and N contents and available P were determined at the two development stages using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) and P Olsen extraction, respectively. The results are presented in **Table 1** and showed little variations among plant species regarding total soil C and N contents at the vegetative stage (VS). However, the values of C and N contents varied slightly at the reproductive stage (RS). Indeed, higher soil C and N were observed under crimson clover and the lowest ones

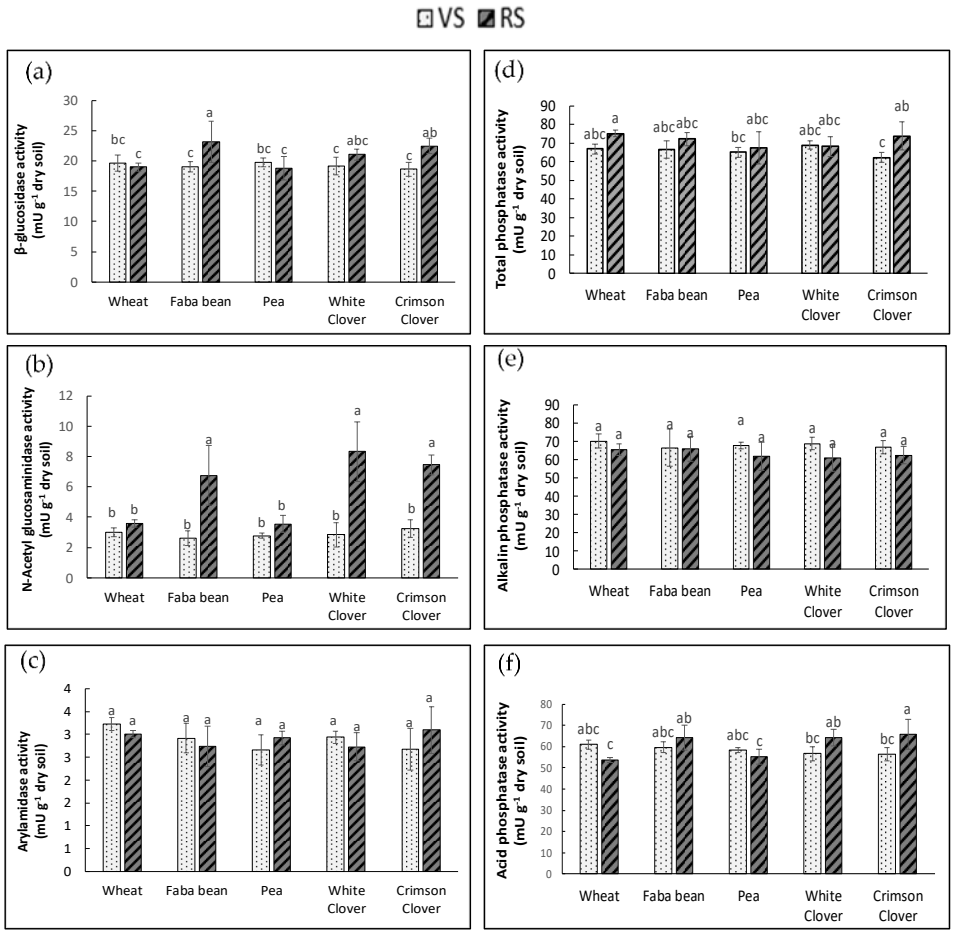


Figure 2. Enzyme activities under all plants species at the two development stages. (a) β-glucosidase, (b) N-acetylglucosaminidase, (c) Arylamidase, (d) Total phosphatases, (e) Alkaline phosphatase, (f) Acid phosphatse. VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. Data are mean ± SD (n = 5). Letters indicate statistically significant difference between plants species and development stages at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

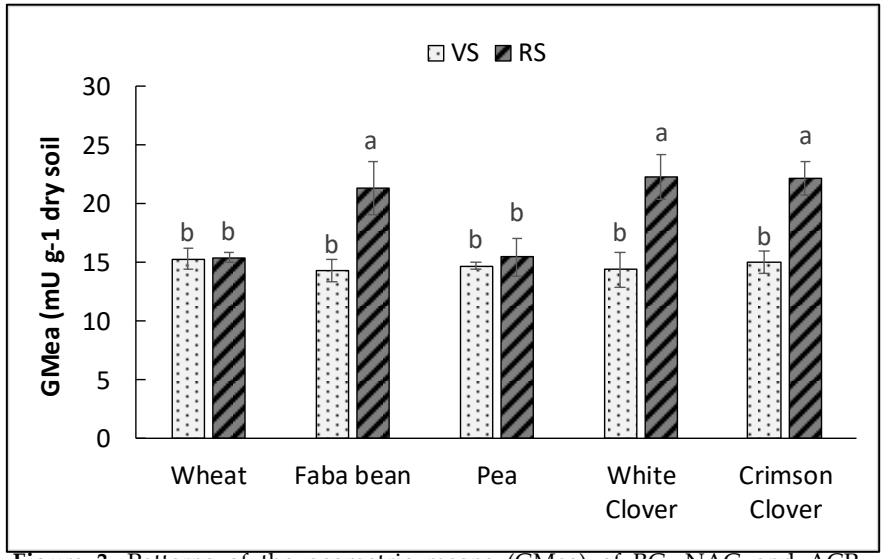


Figure 3. Patterns of the geometric means (GMea) of BG, NAG and ACP activities at the two development stages. BG: β-glucosidase; NAG: N-acetyl-glucosaminidase; ACP: acid phosphatase; VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. GMea was calculated by using only the three enzyme activities that varied according to the plant's species. GMea = $\sqrt[3]{(BG \times NAG \times ACP)}$. Data are mean ± SD (n = 5). Letters indicate statistically significant difference between plants species and development stages at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

under pea and wheat. Regarding phosphorus, P Olsen showed a very different variation pattern and was strongly dependent on the plant phenological stage. At VS, P Olsen was higher under legume crops (on average 149.85 ± 4.49 mg.kg^{-1}) compared to wheat (143.53 ± 3.31). At RS, P Olsen decreased under all crops in comparison to VS. This decrease was more pronounced under faba bean (from 147.84 ± 3.21 to 100.69 ± 5.75 mg.kg^{-1}), white clover (from 150.92 ± 4.16 to 88.63 ± 5.14 mg.kg^{-1}) and crimson clover (from 155.48 ± 7.86 to 92.96 ± 1.91 mg.kg^{-1}). The amount of C, N and P elements were used to determine soil C:N, C:P and N:P ratios. The soil C:N ratios were on average close to 8.57 ± 0.79 and similar for the two development stages, with few differences observed between species (legumes vs. wheat). Soil C:P ratios were higher under wheat than legumes at VS, while at RS, faba bean and the two clovers presented the highest C:P ratios. The same variation patterns were observed for soil N:P ratios.

3.2. Enzymatic Activities

Different enzymatic activities related to C, N and P biogeochemical cycles were measured in the soils under the different plant species at two development stages. The six tested enzymes did not respond in similar ways under the plant species. The BG activity varied between 18.66 ± 1.15 and 23.15 ± 3.41 nmol PNP/min/g dry soil under the different plants and the two development stages (**Figure 2a**). At VS, this activity was similar in all soils, and it was equivalent to 19.24 ± 1.11 nmol PNP/min/g dry soil on average. This activity increased significantly between VS and RS under faba bean and crimson clover.

The NAG activity (**Figure 2b**) varied between 2.62 ± 0.47 and 8.33 ± 1.96 nmol PNP/min/g dry soil. At VS, NAG activity did not vary between plant species (it was on average equivalent to 2.90 ± 0.21 nmol PNP/min/g dry soil). At RS, faba bean and the clovers showed consistently higher NAG activity values compared to VS. ($F = 12.44$, $p < 0.001$). The NAG activity values were three times higher at RS, such as for faba bean (6.76 ± 1.99 nmol PNP/min/g dry soil) and white and Crimson clovers (8.33 ± 1.96 and 7.45 ± 0.64 nmol PNP/min/g dry soil, respectively). ARYLN activity (**Figure 2c**) ranged from 2.66 ± 0.34 to 3.23 ± 0.14 nmol PNP/min/g dry soil and was similar for both development stages (VS and RS) and plants species.

The results of the PHO, AKP and ACP activities are presented in **Figure 2d**, e and f, respectively. The three phosphatase activities showed similar ranges of variation (from 53.83 ± 1.18 to 75.12 ± 1.78 nmol PNP/min/g dry soil), but they presented different response patterns. The AKP activity was not affected by the two development stages (VS and RS) and plant species, while PHO and ACP activities increased significantly only under crimson clover at RS. Among phosphatase, ACP was the sole activity that varied significantly between plant species at RS. Indeed, faba bean and the clovers showed higher ACP activity compared to wheat and pea.

The geometric means (GMea) of the assessed enzymes were used as an integrating index of soil enzyme activities (**Figure 3**). GMea was calculated using only the three enzyme activities that varied according to the plant's species: GMea = $\sqrt[3]{(BG \times NAG \times ACP)}$. At VS, no significant difference was observed between soils under different plants species with an average index of 14.76 ± 1.00 nmol PNP/min/g dry soil. At RS, this index was significantly higher in soils with faba bean and white and crimson clovers ($F = 19.54$, $p < 0.001$). This enzyme index did not vary between the two development stages for soils under wheat and pea.

3.3. Enzyme's Stoichiometry

Enzymatic stoichiometry was also determined by using only enzymes that varied between plants species (BG, NAG and ACP), corresponding to these ratios: BG:NAG (C-acquiring enzymes vs. N-acquiring enzymes) and NAG:ACP (N-acquiring enzymes vs. P-acquiring enzymes). A correlation graph between these ratios was made to determine the resource requirements of microorganisms under the different crops according to Hill et al. [71]. A ratio equal to one was considered as a balance of nutrient demand; when above and below one we consider, for example, a transition of microorganisms from C limitation to N limitation for the ratio BG:NAG (**Figure 4**). This balance point at one was used as a

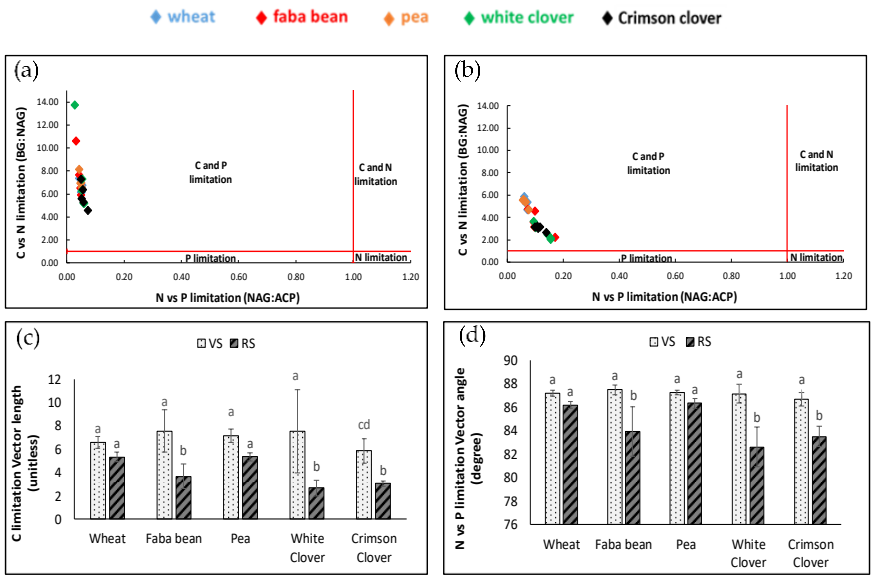


Figure 4. Enzyme stoichiometry under all studied plants species for identifiyng potential ressource limitation at the two development stages. (**a**,**b**) Scatter graphs of enzyme stoichiometry corresponding to the ratio of BG:NAG according the ratio of NAG: ACP at VS (**a**) and RS (**b**). BG: β-glucosidase; NAG: N-acetyl-glucosaminidase; ACP: acid phosphatase; VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. To identify potential ressource limitation in soil according to Hill et al. [71], 1 was used as a horizontal and vertical baseline along the axis of enzyme activity ratios, and four different groups of microbial resource limitations (N limitation, P limitation, C and P limitation and N and P limitation) were categorized. (**c**) Vector length and (**d**) vector angle calculated according to enzymes ratios. Longer vector L indicates greater C limitation. A vector angle of <45° denotes N limitation; angles > 45° denote P limitation. Data are mean ± SD (n = 5). Letters indicate statistically significant difference between plants species at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

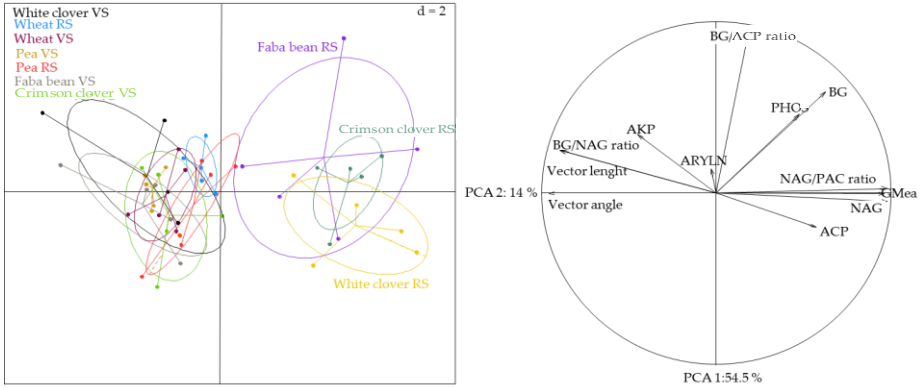


Figure 5. Principal component analysis (PCA) and correlation circle of the enzyme activities and indexes of microbial resource requirement. BG: β-glucosidase; NAG: N-acetyl-glucosaminidase; ACP:acid phosphatase; VS: vegetative stage; RS: reproductive stage; GMea: geometric mean.

Table 2. Plant traits including shoot and root total dry mass per pot, shoot to root ratio and total root length for all studied plants species.

	Shoot Dry Mass (g)		Root Dry Mass (g)		Shoot:Root Ratio		Total Root Length (cm)	
	VS	*RS*	*VS*	*RS*	*VS*	*RS*	*VS*	*RS*
Wheat	4.14 ± 0.35 c	4.34 ± 0.34 a	0.55 ± 0.26 a	0.94 ± 0.09 a	8.63 ± 3.46 b	4.59 ± 0.37 a	2435 ± 1031 a	8961 ± 5223 ab
Faba bean	2.08 ± 0.31 b	13.95 ± 7.77 b	1.52 ± 0.28 b	6.46 ± 2.98 b	1.37 ± 0.13 a	2.12 ± 0.38 a	4569 ± 1070 a	24,329± 13,953 b
Pea	2.25 ± 0.41 b	3.75 ± 0.97 a	0.55 ± 0.26 a	0.39 ± 0.18 a	4.42 ± 1.03 a	10.98 ± 4.79 b	4441 ± 1941 a	3199± 15,292 a
White clover	2.4 ± 0.24 b	25.88 ± 1.60 c	0.28 ± 0.04 a	6.31 ± 1.66 b	8.48 ± 1.14 b	4.31 ± 1.08 a	2379 ± 438 a	82,655± 21,032 c
Crimson clover	1.19 ± 0.18 a	27.21 ± 2.03 c	0.28 ± 0.04 a	5.03 ± 0.24 b	4.19 ± 0.52 a	5.41 ± 0.44 a	2617 ± 860 a	60,859± 6339 c
Plants species × development stages	$F = 52.54$ ***		$F = 17.04$ ***		$F = 12.55$ ***		$F = 42.31$ ***	

VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. Statistical data are expressed as means ± SD, $n = 5$. Means in a column followed by different letters show significant differences ($p < 0.05$)), different letters mean significant difference according to the Tukey test. Two-way ANOVA analysis (F values) showing the effect of the interaction between the plant species and the two development stages on soil chemical characteristics. *** $p \leq 0.001$.

horizontal and vertical baseline along the axis of enzyme activity ratios, and four different groups of microbial resource limitation (N limitation, P limitation, C and P limitation and N and P limitation) were categorized. At VS, microorganisms seemed to be limited in C and P (**Figure 4a**). The same situation was observed at RS (**Figure 4b**), but the C and P limitations were less pronounced (near the baselines).

Other indexes of microbial resource requirement according to Moorhead et al. [80] are presented in **Figure 4c,d**. The vector length (**Figure 4c**) provides an indication of microbial C limitation; as this vector decreases, the C limitation becomes lower. This vector varied from 2.67 ± 0.67 to 7.56 ± 3.56 between species and their developmental stages ($F = 2.82$, $p < 0.05$). At VS, vector length varied slightly between plants (with an average of 6.94 ± 0.72) and was lower under crimson clover. At RS compared to VS, vector length was lower under faba bean (3.66 ± 1.03), white clover (2.67 ± 0.67) and crimson clover (3.05 ± 0.21). These results were in accordance with the stoichiometric analysis, indicating lower C limitation under faba bean and clovers at RS compared to VS. The vector angle (Figure 4d) indicating N limitation (<45°) versus P (>45°) varied from 82.60 ± 1.69° to 87.49 ± 0.43° between plants and development stages ($F = 6.83$, $p < 0.001$), thus indicating a limitation in P. No effect of plant cover was observed at VS. Conversely, at RS, the angle was lower under faba bean and clover, indicating lower P limitation.

In order to reduce the dimensionality of the data set, a PCA was performed to highlight both the effect of plant species and their development stage on soil enzyme activities and their link to C, N and P nutrient limitation for microorganisms (**Figure 5**). Both the Kaiser–Meyer–Olkin measure of sampling adequacy (KMO = 0.578) and Bartlett's test of sphericity (p = 0.000) indicated the validity of PCA. The first two axes of PCA in Figure 5 explained 68.5% of the total variability, as illustrated by the separation of the two distinct clusters along the PCA axes. PCA clearly illustrated how the ACP, NAG, BG and PHO activities; GMea; and indexes of microbial resource requirement (based on enzymes ratios and vectors) classified the plant species according to stage development. The distribution of the clusters along the first axis showed that the faba bean and the two clovers at RS were significantly different from other modalities, which did not present any differentiation.

3.4. Plant Traits and C Rhizodeposition

Biomass production per pot (**Table 2**) differed between species ($F = 197.6$, $p < 0.001$ for shoot biomass and $F = 183.3$, $p < 0.001$ for root biomass) and according to their development stage ($F = 60.66$, $p < 0.001$ for shoot and $F = 29.69$, $p < 0.001$ root). At VS, the highest shoot biomass production was observed for wheat and the lowest one for crimson clover. The biomass production of the three other plants species ranged between wheat and crimson clover. However, at RS, faba bean and the two clovers produced three and five times more much aboveground biomass per pot than wheat and pea. Regarding root biomass, faba bean had the highest biomass (1.52 ± 0.28 g) at VS compared to the other plants. At RS, pea and wheat had the lowest root biomass, which was on average five times less than clovers and faba bean root biomasses. Biomass production resulted in a lower allocation of total plant root biomass under wheat and white clover at VS with higher shoot:root ratios (8.63 ± 3.46 and 8.48 ± 1.14, respectively). Conversely, at RS, pea presented the highest shoot:root ratios (10.98 ± 4.79).

Using WinRHIZO, the total root length was determined for both harvests (**Table 2**). Total root length was similar in all species at VS, but faba bean and both clover species produced much longer roots than wheat and pea did during reproductive growth.

Isotope labeling and isotope mass spectrometry (IRMS) analyses were used to determine the elemental composition of plant tissues and C rhizodeposition. Total C and N contents of the tissues were used to determine the C:N ratios of the plants (**Table 3**). Due to high N concentrations, regardless of development stage, lower C:N ratios were observed in legumes compared to wheat. No significant differences were observed between legume species.

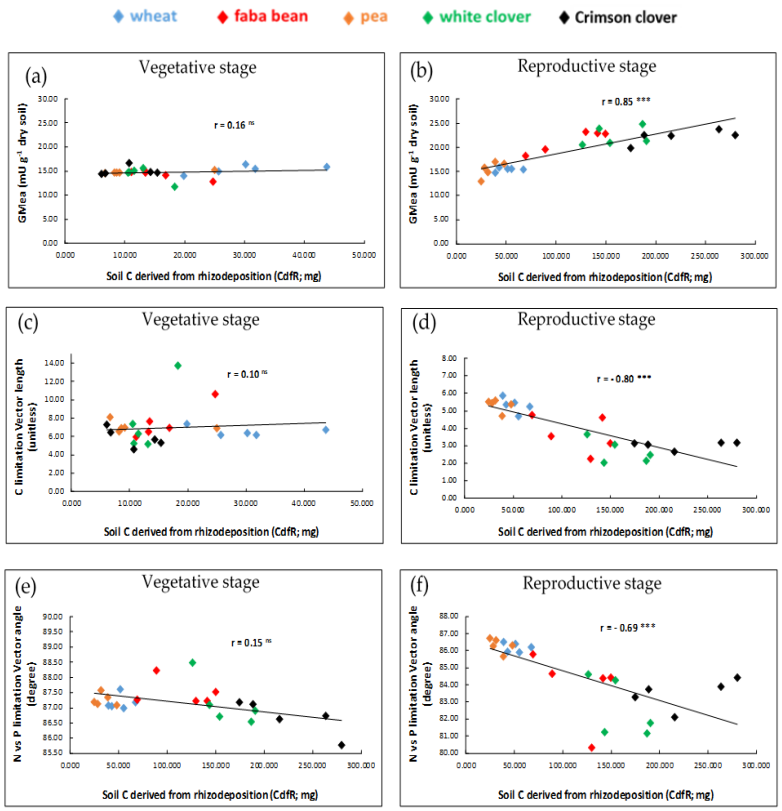


Figure 7. Pearson correlation of soil C derived from rhizodeposition with (**a**,**b**) GMea of enzymes activities. BG: β-glucosidase; NAG: N-acetyl-glucosaminidase; ACP: acid phosphatase; ; (**c**,**d**) vector length; (**e**,**f**) vector angle at vegetative and reproductive stage. Significant correlations ($p < 0.05$; $n = 25$) are shown by * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

Table 3. Shoot and root C:N ratios for all studied plants species.

	Shoot C:N		Root C:N	
	VS	*RS*	*VS*	*RS*
Wheat	34.44 ± 2.16 c	115.92 ± 27.10 b	44.75 ± 6.09 b	49.80 ± 9.46 b
Faba bean	13.67 ± 1.07 a	33.11 ± 7.90 a	12.61 ± 0.29 a	15.61 ± 1.11 a
Pea	17.89 ± 3.10 b	48.15 ± 18.89 a	12.17 ± 0.31 a	18.19 ± 2.78 a
White clover	12.44 ± 1.05 a	21.14 ± 1.90 a	14.37 ± 0.74 a	17.47 ± 1.08 a
Crimson clover	13.05 ± 2.18 a	19.38 ± 1.05 a	14.75 ± 0.66 a	17.12 ± 1.01 a
Plants species × development stages	$F = 19.99$ ***		$F = 0.43$ ns	

VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. Statistical data are expressed as means ± SD, $n = 5$. Means in a column followed by different letters show significant differences. ($p < 0.05$), different letters mean significant difference according to the Tukey test. Two-way ANOVA analysis (F values) showing the effect of the interaction between the plant species and the two development stages on soil chemical characteristics. *** $p \leq 0.001$. ns: non significant.

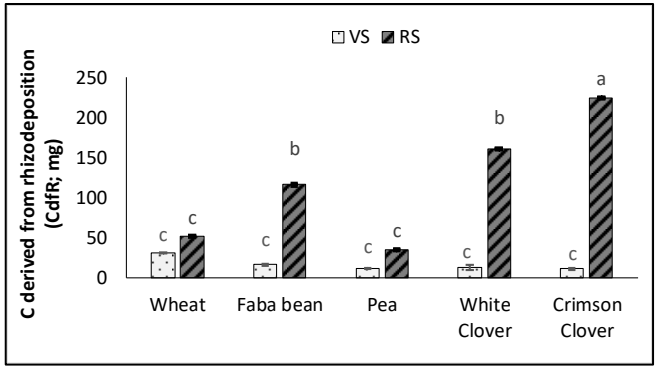


Figure 6. Soil C derived from rhizodeposition (CdfR) under all plants species at the two stages of development (mg.pot^{-1}). VS: vegetative stage; RS: reproductive stage. Data are mean ± SD (n = 5). Letters indicate statistical significant difference between plants species at $p < 0.05$ according to Tukey's test.

Table 4. Pearson correlation matrix showing plant traits, enzyme activities and stoichiometry and soil component relationships among the entire experiment.

	Shoot Dry Mass	Root Dry Mass	Shoot:Root	Root Length	CdfR	Soil C:N	Soil C:P	Soil N:P	ACP	NAG	BG	GMea	BG:NAG	BG:ACP	NAG:ACP	Vector Length	Vector Angle
Shoot dry mass	1.00																
Root dry mass	0.87 ***	1.00															
Shoot:Root	−0.16	−0.39 **	1.00														
Root length	0.94 ***	0.84 ***	−0.23	1.00													
CdfR	0.94 ***	0.81 ***	−0.16	0.86 ***	1.00												
Soil C:N	0.14	0.17	−0.12	0.17	0.14	1.00											
Soil C:P	0.95 ***	0.88 ***	−0.21	0.90 ***	0.93 ***	0.15	1.00										
Soil N:P	0.84 ***	0.75 ***	−0.12	0.77 ***	0.81 ***	−0.32 *	0.88 ***	1.00									
ACP	0.61 ***	0.63 ***	−0.19	0.55 ***	0.65 ***	−0.11	0.62 ***	0.64 ***	1.00								
NAG	0.87 ***	0.81 ***	−0.17	0.83 ***	0.87 ***	0.15	0.88 ***	0.76 ***	0.56 ***	1.00							
BG	0.67 ***	0.76 ***	−0.16	0.54 ***	0.65 ***	0.09	0.64 ***	0.56 ***	0.59 ***	0.57 ***	1.00						
GMea	0.90 ***	0.87 ***	−0.18	0.83 ***	0.91 ***	0.11	0.91 ***	0.81 ***	0.70 ***	0.97 ***	0.72 ***	1.00					
BG:NAG	−0.69 ***	−0.62 ***	0.09	−0.66 ***	−0.71 ***	−0.04	−0.73 ***	−0.65 ***	−0.42 **	−0.84 ***	−0.33 *	−0.82 ***	1.00				
BG:ACP	0.19	0.26	−0.01	0.10	0.13	0.22	0.14	0.03	−0.29 *	0.13	0.59 ***	0.16	0.03	1.00			
NAG:ACP	0.83 ***	0.75 ***	−0.15	0.79 ***	0.82 ***	0.17	0.84 ***	0.72 ***	0.40 **	0.98 ***	0.50 **	0.92 ***	−0.84 ***	0.20	1.00		
Vector lenght	−0.69 ***	−0.62 ***	0.09	−0.65 ***	−0.71 ***	−0.04	−0.73 ***	−0.65 ***	−0.42 **	−0.84	−0.33 *	−0.82 ***	0.99 ***	0.03	−0.84 ***	1.00	
Vector angle	−0.83 ***	−0.75 ***	0.15	−0.79 ***	−0.82 ***	−0.17	−0.84 ***	−0.71 ***	−0.40 **	−0.98 ***	−0.51 **	−0.92 ***	0.84 ***	−0.20	−0.99 ***	0.84 ***	1.00

BG: β-glucosidase; ACP: acid phosphatase; NAG: N-acetyl-glucosaminidase; GMea: geometric mean; CdfR: carbon derived from rhizodeposition. Significant correlations are shown in bold (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; $n = 50$).

Plant species rhizodeposited similar amounts of C before flowering, but faba bean and both clover species rhizodeposited more C during reproductive growth than wheat and pea did ($F = 37.92$, $p < 0.001$ between species and their developmental stage). The highest C rhizodeposition during reproductive growth was observed under crimson clover (**Figure 6**).

3.5. Linking Plant, Soil and Microbial Components

A correlation matrix was set up to analyze the link between plant traits (including rhizodeposition), soil characteristics and resource requirements of microorganisms through enzyme activities and their stoichiometry (**Table 4**). Plant traits linked to plant growth such as biomass production and total root length were positively correlated with soil C:P and N:P ratios as well as with enzyme activities (BG, NAG and ACP). The same observation was made with GMea. Positive correlations were also observed between soil C derived from rhizodeposition (CdfR) and plant traits. Regarding enzyme ratios, negative correlations were observed between BG:NAG ratio and plant traits. These negative correlations were also observed with vector indexes (length and angle). Regarding C rhizodeposition, GMea was positively correlated with CdfR, and vectors were inversely correlated with CdfR.

Taking these correlations according to developmental stages (**Figure 7**), at VS, no correlation was observed between GMea and CdfR ($r = 0.16$, $p > 0.05$) and similarly for vector length (C limitation; $r = 0.10$, $p > 0.05$) and the vector angle (N vs. P limitation; $r = 0.15$, $p > 0.05$). At RS, GMea was positively correlated with CdfR ($r = 0.85$, $p < 0.05$). Vector length ($r = -0.80$, $p < 0.05$) and vector angle ($r = -0.69$, $p < 0.05$) were negatively correlated with CdfR.

4. Discussion

In this study, the objective was to evaluate the influence of different forage and seed legumes through C rhizodeposition on the dynamics of C, N and P elements in the soil and microbial communities resource requirements. The variation patterns of enzyme activity and microorganism limitations on C, N and P nutrients were linked to plant functional traits and C rhizodeposition. This reflects strong dependence on microbial communities and their activities on C, N and P sources in soils.

4.1. Variability of Enzymatic Activities According to Plant Cover Crops

As postulated in our first hypothesis, this study shows that soil enzymatic activities may differ strongly between legume crops. Soil enzymes have been reported as useful soil-state bioindicators because they provide information on soil's ability to perform biogeochemical reactions [81,82]. We have chosen to measure β-glucosidase (BG), N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG), arylamidase (ARYLN) and phosphatases activities (PHO, AKP and ACP), which decompose various substrates with varying complexity [81]. The BG enzyme is related to the C cycle, acting in the cleavage of cellobiose into glucose molecules [82]. The ARYLN enzyme catalyzes the hydrolysis of N-terminal amino acids from arylamides [83]. The NAG enzymes catalyze 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 major roles in N mineralization in soils [84,85]. On the other hand, phosphatases are closely related to P mineralization.

This study revealed that both plant species and plant age can modify soil enzymatic activities. At the end of crop growth, compared to wheat and pea, faba bean and the two clovers increased the activities of BG, NAG and ACP involved in the degradation of C, N and P resources, respectively. Similarly, an integrative enzyme index calculated using BG, NAG and ACP activities through the geometric mean [79] showed higher levels of enzyme activities in the soil of these three legumes compared with wheat and pea. These results are in agreement with other works showing high enzyme activities in legume rhizosphere [86–88]. Maltais-Landry [56] also showed a stimulating effect of legumes on BG and NAG

activities with species such as pea, faba bean and vetch compared with wheat and oats. It has also been shown that, in addition to BG, the presence of legumes increases the activity of ACP [89]. Similarly, Nuruzzaman et al. [90] demonstrated increasing ACP activity in the rhizosphere of lupin followed by faba bean, pea and wheat. These results highlighted the stimulation of legume crops on enzyme activities and partially confirmed the first hypothesis. However, it should be noted that pea, which is a legume crop, did not induce a significant difference on the enzymatic activities compared to wheat. This could be explained by the pea variety used and the functional traits developed by this species. During this study, pea exported most of the C and N resources to the aboveground part (data not shown) and produced less root biomass. A lower rhizodeposition of C was observed for pea and wheat compared with the other legume species; therefore, less resources were available in the belowground part compared to the other legumes.

The variation pattern in enzymatic activities according to the plant species seems to be explained by plant traits. Indeed, plant traits defined as morphological and physiological characteristics are studied in relation to many processes and ecosystem services [91]. Considered as important regulators of ecosystem processes, the functional traits of plants influence soil characteristics, soil resources dynamic and the abundance and diversity of microorganisms [92,93]. The differences observed between legumes and cereals are related to particular physiological functioning that allows them to fix atmospheric N_2, to have N-rich tissues and to enrich the soil in N such as those reported in the literature [20,94,95]. For example, ACP activity in the soil is produced and released by both roots and microorganisms. Similarly to proteins, phosphatases have relatively high N concentrations and may represent a significant investment of N. Therefore, increased N availability may raise the extracellular phosphatase activity of plants [96] and especially of legumes due to their N-rich tissues, which can explain the difference with wheat. In our study, positive correlation was observed between root N content (data not shown) and ACP activity ($r = 0.65$, $p < 0.001$), which is in line with the previous statement and confirms the observation made by Maltais-Landry. [56]. A positive correlation was found between root N content and BG ($r = 0.76$, $p < 0.001$) as well as NAG ($r = 0.79$, $p < 0.001$), highlighting the contribution of the physiological trait of legumes relative to the increase in soil enzyme activities of different enzymes in soil.

In this study, plant primary production (above and belowground biomass) was positively correlated with GMea ($r = 0.90$, $p < 0.001$ and $r = 0.87$, $p < 0.001$, respectively). The level of soil enzyme activities also appeared to increase with root length ($r = 0.83$, $p < 0.001$). Forage legumes, which produce long and thin roots, increase the volume of soil exploration. According to previous studies [97,98], this property contributes by indirectly regulating the decomposition of soil organic matter (SOM) by destabilizing soil matrix, which protects organic carbon in aggregates. In contrast, faba bean produces large root diameter, and it can be hypothesized that faba bean could impact soil structures such as the forage legumes. These traits contribute to the increased availability of resources [97] for eventual degradation by enzymes. Faba bean, white clover and crimson clover, which presented higher relative growth rates (RGR) between VS and RS (data not shown) and the longest roots, stimulated markedly soil enzyme activities. These species with greater N-rich tissues had the lowest C:N ratios. Taken together, their characteristics are consistent with traits of exploitative species that grow rapidly, with high tissue and exudate quality in contrast to conservative species that grow slowly and have low tissue and exudate quality [99–101]. These exploitative species are also associated with microbial communities dominated by bacteria and higher tissues decomposition rates due to their chemical composition and lower C:N ratio [102,103]. In this study, legumes species (except pea) presented the lowest C:N ratio in their tissues compared to wheat, and shoot C:N ($r = -0.66$, $p < 0.001$) and root C:N ($r = -0.56$, $p < 0.01$) were negatively correlated with GMea at RS.

Another important physiological trait is the ability of plants to input C in soil through the process of rhizodeposition. Soil C derived from rhizodeposition (CdfR) was positively correlated with GMea ($r = 0.91$, $p < 0.001$) and with each enzyme's individual activity (BG;

NAG; ACP). Clovers (particularly crimson clover) and faba bean rhizodeposited the most C into the soil and resulted in higher levels of enzyme activities. This C source represents an important energy supply for the activity of microorganisms, which is essential in nutrient cycling [24,100,104,105]. Rhizodeposition also has a positive priming effect on SOM decomposition, and some studies have shown the positive effect of root C supply on enzyme activities in the soil [106–108]. Since the supply of C from the roots to the soil is rich in sugar compounds, it has been shown that BG activities is positively influenced by the presence of glucose-rich exudate [109]. Root C contributes to the substrate supply for the activity of some enzymes and could be used as a good indicator to evaluate the impact of different plant species on soil enzyme activities [100,110].

4.2. Microbial Resource Requirement under the Different Crops

In addition to the determination of the variation of enzymatic activities in soil, the second objective of this study was to better understand the resource requirements of microorganisms under different plant species. Enzymatic activity being a response to metabolic needs, different indexes including measured activities and inspired by ecological stoichiometry were determined [64,65,111]. The approach detailed in Hill et al. [71], including enzyme ratios BG:NAG (C limitation vs. N limitation) and NAG:ACP (N limitation vs. P limitation), was used to evaluate C, N and P limitations of microorganisms under different plant cover crops according to their stage of development. In the present study, P and C limitations were less pronounced at RS, especially under faba bean and clovers. This was confirmed using other indexes. In fact, these three plants species presented the lowest vector length (indicating C limitation) and vector angle (corresponding to P limitation when angle > 45°). The variation in C and P limitation of microorganisms among plants is explained by their functional traits. The lower C and P limitations under faba bean and both clover species are related to their strong growth, root length and their ability to rhizodeposit C in the soil. During VS, no significant correlations were observed between plant traits and measured limitation indexes, showing that these plants had little impact on soil activities during vegetative growth. However, at RS, vector length and angle were negatively correlated with plant traits. More precisely, when the amounts of C rhizodeposited by plants increased, the vectors length and angle decreased, showing that the microorganisms were less limited in C and P. The lower resource limitation also seemed to be influenced by the N and C content of the roots. Indeed, vector length was negatively correlated with the N and C content of the roots ($r = -0.73$, $p < 0.001$ and $r = -0.78$, $p < 0.001$, respectively). The same observations were made for vector angle with $r = -0.59$, $p < 0.001$ for roots N and $r = -0.64$, $p < 0.001$ for roots C. Taken together, these results confirm that plant cover crops modulate enzymatic activities and microorganism growth, particularly in the context of legume cultivation. Indeed, changes in plant communities can influence microorganism and enzyme activities [49,112–114]. This finding is consistent with previous works showing that plant resources and their stoichiometry may strongly influence microbial traits [63,64,115,116]. Using soil enzyme vector analysis, Xiao et al. [61] indicated that the microbial community was co-limited by C and P during secondary plant succession in a natural grassland. These limitations were mainly associated with soil nutrient status.

The resource limitation of microorganisms is essentially related to the availability and stoichiometry of these resources in soil [61,67], and these resources are influenced by the plant species. In this study, vector length was negatively correlated with soil C:P ($r = -0.72$, $p < 0.001$) and soil N:P ($r = -0.65$, $p < 0.001$). The same observations were made with vector angle. Faba bean and clover species had the highest soil C:P and N:P. Accordingly, Cui et al. [67] found similar correlations between C and P limitation of microorganisms (vectors length and angle) and soil resources in alpine ecosystem. The ability of legumes such as faba bean and clovers to enrich soil with N and C explains the lower microorganisms' C and P limitation under these plants compared to others. Since the production of enzymes is made from amino acids, their synthesis requires a cost in N, C and also small amounts of P [64,117]. These elements must be available for the synthesis

of enzymes. According to Allison and Cheaters [118], a microbe absorbing 100 units of P and allocating one unit to the production of enzymes would need 200 units of C and 57 units of N due to the C:N:P stoichiometry of enzymes. Thus, when C and N are in abundance, enzyme production could favor the acquisition of P resources. Based on a model developed by Allison and Cheaters [118], the addition of C, N and P substrates results in different ways changes can occur during microorganism growth, rate of enzyme synthesis and nutrient availability. Indeed, various substrate availability resulted in a decrease in the amounts of C-acquiring, N-acquiring and P-acquiring enzymes. The increase in C substrate would increase the growth of microorganisms and the synthesis of P and N enzymes. Consequently, microorganisms may switch to N limitation when C is in excess. Conversely, when N is present in excess, there is a strong synthesis of C and P acquiring enzymes that become limiting when related to N. These observations are in line with the results of this study, as C and N supply by plants under the faba bean and clovers mainly favored the decrease in P limitation at the end of plant growth. Our results show that the decrease in C limitation may be related to the increase in C availability through plant rhizodeposition. However, C limitation seems to be more complex, since at a certain threshold of C in the soil, there was a shift from C limitation to N limitation [119]. The increasing input of C and N under faba bean and clovers also contributes to greater microbial growth.

5. Conclusions

This study confirms the impact of plant species and their development stage on soil enzyme activities in relation to the dynamics of C, N and P. BG, NAG and ACP enzyme activities were positively influenced by the presence of faba bean and clovers compared to pea and wheat. A stoichiometric analysis of enzymes activities revealed a limitation of microorganisms in C and P resources at the end of plant growth, but strong differences were observed between legume species. These limitations in C and P were lower in the presence of faba bean and forage legumes (white clover and crimson clover). The variations of enzyme activities and C, N and P microorganism limitations were explained by plant functional traits. Indeed, plant biomass production, total root length, the ability of plants to rhizodeposit C and C and N contents of plant tissues were the main explicative factors of the observed variations. Faba bean and clovers were more effective in C rhizodeposition than compared to pea and wheat. It is known that N and C nutrient supplies positively contribute to nutritional requirements and growth of microorganisms and P availability in soil. The stoichiometric approach used in this study and by several authors is a useful tool for linking different levels of biological organization in order to better understand soil/plant/microorganisms interactions. This study also highlighted the strong connection between C, N and P nutrient cycling in soil and the factors modulating nutrients demand and the production patterns of soil enzymes.

Author Contributions: M.K.: experiment execution, data analysis, presentation of results and original draft manuscript preparation; W.R.-A.: contribution to original draft manuscript preparation, review and editing; J.-B.C.: identification of the research topic, study design, C rhizodeposition and plants functional traits analyses, review and supervision; I.T.-G.: 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 RhizoComm and BEER projects.

Data Availability Statement: the data presented here are part of the results of a phD thesis and will be available only after 2023

Acknowledgments: We are grateful to all the technical staff of UMR EVA and AGHYLE UniLaSalle-Rouen laboratory for technical assistance. We also thank the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element and isotope analysis used in this study. Thanks to Pierre Bergerot for the analysis of the enzymatic activities. **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Matson, P.A.; Parton, W.J.; Power, A.G.; Swift, M.J. Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. *Science* **1997**, *277*, 504–509.
2. Howden, S.M.; Soussana, J.-F.; Tubiello, F.N.; Chhetri, N.; Dunlop, M.; Meinke, H. Adapting Agriculture to Climate Change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19691–19696.
3. Burney, J.A.; Davis, S.J.; Lobell, D.B. Greenhouse Gas Mitigation by Agricultural Intensification. *PNAS* **2010**, *107*, 12052–12057. https://doi.org/10.1073/pnas.0914216107.
4. Emmerson, M.; Morales, M.B.; Oñate, J.J.; Batáry, P.; Berendse, F.; Liira, J.; Aavik, T.; Guerrero, I.; Bommarco, R.; Eggers, S.; et al. Chapter Two—How Agricultural Intensification Affects Biodiversity and Ecosystem Services. In *Advances in Ecological Research*; Dumbrell, A.J., Kordas, R.L., Woodward, G., Eds.; Large-Scale Ecology: Model Systems to Global Perspectives; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; Volume 55, pp. 43–97.
5. Lal, R. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. *Sustainability* **2015**, *7*, 5875–5895. https://doi.org/10.3390/su7055875.
6. Velten, S.; Leventon, J.; Jager, N.; Newig, J. What Is Sustainable Agriculture? A Systematic Review. *Sustainability* **2015**, *7*, 7833–7865. https://doi.org/10.3390/su7067833.
7. DeLonge, M.S.; Miles, A.; Carlisle, L. Investing in the Transition to Sustainable Agriculture. *Environ. Sci. Policy* **2016**, *55*, 266–273. https://doi.org/10.1016/j.envsci.2015.09.013.
8. Wezel, A.; Jauneau, J.-C. Agroecology—Interpretations, Approaches and Their Links to Nature Conservation, Rural Development and Ecotourism. In *Integrating Agriculture, Conservation and Ecotourism: Examples from the Field*; Campbell, W.B., Lopez Ortiz, S., Eds.; Issues in Agroecology—Present Status and Future Prospectus; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2011; pp. 1–25, ISBN 978-94-007-1309-3.
9. Kremen, C.; Miles, A. Comparing Biologically Diversified with Conventional Farming Systems: What Is Known about Environmental Benefits, Externalities and Tradeoffs among Crop Productivity and Ecosystem Services? *Ecol. Soc.* **2012**, *17*, 40.
10. Griffon, M. L'agroécologie, Un Nouvel Horizon Pour l'agriculture. *Études* **2014**, *12*, 31–39.
11. Tittonell, P. Ecological Intensification of Agriculture—Sustainable by Nature. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* **2014**, *8*, 53–61.
12. Wezel, A.; Brives, H.; Casagrande, M.; Clément, C.; Dufour, A.; Vandenbroucke, P. Agroecology Territories: Places for Sustainable Agricultural and Food Systems and Biodiversity Conservation. *Agroecol. Sustain. Food Syst.* **2016**, *40*, 132–144. https://doi.org/10.1080/21683565.2015.1115799.
13. Schneider, A.; Huyghe, C. *Les Légumineuses Pour Des Systèmes Agricoles et Alimentaires Durables*; éditions Quae: Versailles, France, 2015.
14. Mylona, P.; Pawlowski, K.; Bisseling, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **1995**, *7*, 869–885. https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.869.
15. Meena, R.S.; Das, A.; Yadav, G.S.; Lal, R. *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018.
16. Altobelli, F.; Benedetti, A.; Calles, T.; Caon, L.; Charrondiere, R.; Gri Shiv, P.; Grande, F.; Muthuraman, R.P.; Pisante, M.; Pramar, B.; et al. Soils and Pulses: Symbiosis for Life—World **2016**. Available online: https://reliefweb.int/report/world/soils-and-pulses-symbiosis-life.
17. Adeboye, M.K.A.; Iwuafor, E.N.O.; Agbenin, J.O. Rotation Effects of Grain and Herbaceous Legumes on Maize Yield and Chemical Properties of an Alfisol in the Northern Guinea Savanna, Nigeria. *Niger. J. Soil Environ. Res.* **2005**, *6*, 22–31. https://doi.org/10.4314/njser.v6i1.28392.
18. Vertès, F.; Jeuffroy, M.-H.; Louarn, G.; Voisin, A.-S.; Justes, E. Légumineuses et prairies temporaires : Des fournitures d'azote pour les rotations. *Fourrages* **2015**, *223*, 221–232.
19. Rezgui, C.; Riah-Anglet, W.; Benoit, M.; Bernard, P.Y.; Laval, K.; Trinsoutrot-Gattin, I. Impacts of the Winter Pea Crop (Instead of Rapeseed) on Soil Microbial Communities, Nitrogen Balance and Wheat Yield. *Agriculture* **2020**, *10*, 548. https://doi.org/10.3390/agriculture10110548.
20. Fustec, J.; Lesuffleur, F.; Mahieu, S.; Cliquet, J.-B. Nitrogen Rhizodeposition of Legumes. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2010**, *30*, 57–66. https://doi.org/10.1051/agro/2009003.
21. 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. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010.
22. Chalk, P.M.; Peoples, M.B.; McNeill, A.M.; Boddey, R.M.; Unkovich, M.J.; Gardener, M.J.; Silva, C.F.; Chen, D. Methodologies for Estimating Nitrogen Transfer between Legumes and Companion Species in Agro-Ecosystems: A Review of 15N-Enriched Techniques. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *73*, 10–21. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.02.005.
23. Uren, N.C. Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants. In *The Rhizosphere*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2001; pp. 35–56.
24. Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 233–266. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.
25. Wichern, F.; Mayer, J.; Joergensen, R.; Müller, T. Evaluation of the Wick Method for in Situ 13C and 15N Labelling of Annual Plants Using Sugar-Urea Mixtures. *Plant Soil* **2010**, *329*, 105–115. https://doi.org/10.1007/s11104-009-0138-3.
26. Lupwayi, N.Z.; Kennedy, A.C. Grain Legumes in Northern Great Plains: Impacts on Selected Biological Soil Processes. *Agron. J.* **2007**, *99*, 1700–1709. https://doi.org/10.2134/agronj2006.0313s.
27. Nguyen, C. Rhizodeposition of Organic C by Plants: Mechanisms and Controls. *Agronomie* **2003**, *23*, 375–396. https://doi.org/10.1051/agro:2003011.

28. Pausch, J.; Kuzyakov, Y. Carbon Input by Roots into the Soil: Quantification of Rhizodeposition from Root to Ecosystem Scale. *Glob. Chang. Biol.* **2018**, *24*, 1–12. https://doi.org/10.1111/gcb.13850.
29. El Haichar, F.Z.; Marol, C.; Berge, O.; Rangel-Castro, J.I.; Prosser, J.I.; Balesdent, J.; Heulin, T.; Achouak, W. Plant Host Habitat and Root Exudates Shape Soil Bacterial Community Structure. *ISME J.* **2008**, *2*, 1221–1230. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80.
30. Paterson, E.; Gebbing, T.; Abel, C.; Sim, A.; Telfer, G. Rhizodeposition Shapes Rhizosphere Microbial Community Structure in Organic Soil. *New Phytol.* **2007**, *173*, 600–610.
31. Gattinger, A.; Palojärvi, A.; Schloter, M. Chapter 3.4—Soil Microbial Communities and Related Functions. In *Perspectives for Agroecosystem Management*; Schröder, P., Pfadenhauer, J., Munch, J.C., Eds.; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2008; pp. 279–292, ISBN 978-0-444-51905-4.
32. Ravi, R.K.; Anusuya, S.; Balachandar, M.; Muthukumar, T. Microbial interactions in soil formation and nutrient cycling. In *Mycorrhizosphere and Pedogenesis*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 363–382.
33. Condron, L.; Stark, C.; O'Callaghan, M.; Clinton, P.; Huang, Z. The role of microbial communities in the formation and decomposition of soil organic matter. In *Soil Microbiology and Sustainable Crop Production*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 81–118.
34. Anderson, C.R.; Condron, L.M.; Clough, T.J.; Fiers, M.; Stewart, A.; Hill, R.A.; Sherlock, R.R. Microorganisms and Their Roles in Fundamental Biogeochemical Cycles. *Pedobiologia* **2011**, *54*, 309–320.
35. Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G. Microbial Diversity and Soil Functions. *Eur. J. Soil Sci.* **2003**, *54*, 655–670.
36. Tabatabai, M.A. Soil Enzymes. *Methods Soil Anal. Part 2 Microbiol. Biochem. Prop.* **1994**, *5*, 775–833.
37. Alkorta, I.; Aizpurua, A.; Riga, P.; Albizu, I.; Amézaga, I.; Garbisu, C. Soil Enzyme Activities as Biological Indicators of Soil Health. *Rev. Environ. Health* **2003**, *18*, 65–73.
38. Bowles, T.M.; Acosta-Martínez, V.; Calderón, F.; Jackson, L.E. Soil Enzyme Activities, Microbial Communities, and Carbon and Nitrogen Availability in Organic Agroecosystems across an Intensively-Managed Agricultural Landscape. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *68*, 252–262. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.004.
39. Dotaniya, M.L.; Aparna, K.; Dotaniya, C.K.; Singh, M.; Regar, K.L. Chapter 33—Role of Soil Enzymes in Sustainable Crop Production. In *Enzymes in Food Biotechnology*; Kuddus, M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 569–589, ISBN 978-0-12-813280-7.
40. Rao, M.A.; Scelza, R.; Gianfreda, L. Soil Enzymes. In *Enzymes in Agricultural Sciences*; OMICS Group: Foster City, FL, USA, 2014; pp. 10–24.
41. Adetunji, A.T.; Ncube, B.; Mulidzi, R.; Lewu, F.B. Potential Use of Soil Enzymes as Soil Quality Indicators in Agriculture. In *Frontiers in Soil and Environmental Microbiology*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2020; pp. 57–64.
42. Harvey, P.J.; Xiang, M.; Palmer, J.M. Extracellular Enzymes in the Rhizosphere. *Biotechnol. Bioeng* **2002**, *44*, 1132–1139.
43. Chroma, L.; Mackova, M.; Kucerova, P.; In Der Wiesche, C.; Burkhard, J.; Macek, T. Enzymes in Plant Metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnol.* **2002**, *22*, 35–41.
44. Gramss, G.; Voigt, K.-D.; Kirsche, B. Oxidoreductase Enzymes Liberated by Plant Roots and Their Effects on Soil Humic Material. *Chemosphere* **1999**, *38*, 1481–1494.
45. Vandana, U.K.; Rajkumari, J.; Singha, L.P.; Satish, L.; Alavilli, H.; Sudheer, P.D.V.N.; Chauhan, S.; Ratnala, R.; Satturu, V.; Mazumder, P.B.; et al. The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. *Biology* **2021**, *10*, 101. https://doi.org/10.3390/biology10020101.
46. Dick, R.P. Soil Enzyme Activities as Indicators of Soil Quality. *Defin. Soil Qual. A Sustain. Environ.* **1994**, *35*, 107–124.
47. Dick, R.P. Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, editors. Biological Indicators of Soil Health. Wallingford, USA7 *CAB Internat.* **1997**, 121–156..
48. Gianfreda, L. Enzymes of Importance to Rhizosphere Processes. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2015**, *15*, 283–306. https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000022.
49. Egamberdieva, D.; Renella, G.; Wirth, S.; Islam, R. Enzyme Activities in the Rhizosphere of Plants. In *Soil Enzymology*; Shukla, G., Varma, A., Eds.; Soil Biology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; Volume 22, pp. 149–166, ISBN 978-3-642-14224-6.
50. Yin, R.; Deng, H.; Wang, H.; Zhang, B. Vegetation Type Affects Soil Enzyme Activities and Microbial Functional Diversity Following Re-Vegetation of a Severely Eroded Red Soil in Sub-Tropical China. *CATENA* **2014**, *115*, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.catena.2013.11.015.
51. Kwiatkowski, C.A.; Harasim, E.; Feledyn-Szewczyk, B.; Antonkiewicz, J. Enzymatic Activity of Loess Soil in Organic and Conventional Farming Systems. *Agriculture* **2020**, *10*, 135. https://doi.org/10.3390/agriculture10040135.
52. Mndzebele, B.; Ncube, B.; Fessehazion, M.; Mabhaudhi, T.; Amoo, S.; du Plooy, C.; Venter, S.; Modi, A. Effects of Cowpea-Amaranth Intercropping and Fertiliser Application on Soil Phosphatase Activities, Available Soil Phosphorus, and Crop Growth Response. *Agronomy* **2020**, *10*, 79.
53. Harasim, E.; Antonkiewicz, J.; Kwiatkowski, C.A. The Effects of Catch Crops and Tillage Systems on Selected Physical Properties and Enzymatic Activity of Loess Soil in a Spring Wheat Monoculture. *Agronomy* **2020**, *10*, 334. https://doi.org/10.3390/agronomy10030334.
54. Liu, Y.; Mi, G.; Chen, F.; Zhang, J.; Zhang, F. Rhizosphere Effect and Root Growth of Two Maize (Zea Mays L.) Genotypes with Contrasting P Efficiency at Low P Availability. *Plant Sci.* **2004**, *167*, 217–223.

55. Maseko, S.T.; Dakora, F.D. Plant Enzymes, Root Exudates, Cluster Roots and Mycorrhizal Symbiosis Are the Drivers of P Nutrition in Native Legumes Growing in P Deficient Soil of the Cape Fynbos in South Africa. *J. Agric. Sci. Technology. A* **2013**, *3*, 331.
56. Maltais-Landry, G. Legumes Have a Greater Effect on Rhizosphere Properties (PH, Organic Acids and Enzyme Activity) but a Smaller Impact on Soil P Compared to Other Cover Crops. *Plant Soil* **2015**, *394*, 139–154. https://doi.org/10.1007/s11104-015-2518-1.
57. 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.
58. Siczek, A.; Frąc, M.; Kalembasa, S.; Kalembasa, D. Soil Microbial Activity of Faba Bean (Vicia Faba L.) and Wheat (Triticum Aestivum L.) Rhizosphere during Growing Season. *Appl. Soil Ecol.* **2018**, *130*, 34–39. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.012.
59. Liu, J.; Chen, J.; Chen, G.; Guo, J.; Li, Y. Enzyme Stoichiometry Indicates the Variation of Microbial Nutrient Requirements at Different Soil Depths in Subtropical Forests. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0220599. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220599.
60. Bai, X.; Dippold, M.; An, S.; Wang, B.; Zhang, H.; Loeppmann, S. Extracellular Enzyme Activity and Stoichiometry: The Effect of Soil Microbial Element Limitation during Leaf Litter Decomposition. *Ecol. Indic.* **2021**, *121*, 107200. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107200.
61. Xiao, L.; Liu, G.; Li, P.; Li, Q.; Xue, S. Ecoenzymatic Stoichiometry and Microbial Nutrient Limitation during Secondary Succession of Natural Grassland on the Loess Plateau, China. *Soil Tillage Res.* **2020**, *200*, 104605. https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104605.
62. Sinsabaugh, R.L.; Shah, J.J.F.; Findlay, S.G.; Kuehn, K.A.; Moorhead, D.L. Scaling Microbial Biomass, Metabolism and Resource Supply. *Biogeochemistry* **2015**, *122*, 175–190. https://doi.org/10.1007/s10533-014-0058-z.
63. Zechmeister-Boltenstern, S.; Keiblinger, K.M.; Mooshammer, M.; Peñuelas, J.; Richter, A.; Sardans, J.; Wanek, W. The Application of Ecological Stoichiometry to Plant–Microbial–Soil Organic Matter Transformations. *Ecol. Monogr.* **2015**, *85*, 133–155.
64. Sterner, R.W.; Elser, J.J. *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*; Princeton University Press: Princeton, NJ, USA, 2002; ISBN 978-0-691-07491-7.
65. Elser, J.J.; Urabe, J. The Stoichiometry of Consumer-Driven Nutrient Recycling: Theory, Observations, and Consequences. *Ecology* **1999**, *80*, 735–751. https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0735:TSOCDN]2.0.CO;2.
66. Sinsabaugh, R.L.; Hill, B.H.; Follstad Shah, J.J. Ecoenzymatic Stoichiometry of Microbial Organic Nutrient Acquisition in Soil and Sediment. *Nature* **2009**, *462*, 795–798. https://doi.org/10.1038/nature08632.
67. Cui, Y.; Bing, H.; Fang, L.; Jiang, M.; Shen, G.; Yu, J.; Wang, X.; Zhu, H.; Wu, Y.; Zhang, X. Extracellular Enzyme Stoichiometry Reveals the Carbon and Phosphorus Limitations of Microbial Metabolisms in the Rhizosphere and Bulk Soils in Alpine Ecosystems. *Plant Soil* **2021**, *458*, 7–20. https://doi.org/10.1007/s11104-019-04159-x.
68. Waring, B.G.; Weintraub, S.R.; Sinsabaugh, R.L. Ecoenzymatic Stoichiometry of Microbial Nutrient Acquisition in Tropical Soils. *Biogeochemistry* **2014**, *117*, 101–113. https://doi.org/10.1007/s10533-013-9849-x.
69. 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. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x.
70. Peng, X.; Wang, W. Stoichiometry of Soil Extracellular Enzyme Activity along a Climatic Transect in Temperate Grasslands of Northern China. *Soil Biol. Biochem.* **2016**, *98*, 74–84. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.04.008.
71. Hill, B.H.; Elonen, C.M.; Seifert, L.R.; May, A.A.; Tarquinio, E. Microbial Enzyme Stoichiometry and Nutrient Limitation in US Streams and Rivers. *Ecol. Indic.* **2012**, *18*, 540–551. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.01.007.
72. Sinsabaugh, R.L.; Follstad Shah, J.J.; Hill, B.H.; Elonen, C.M. Ecoenzymatic Stoichiometry of Stream Sediments with Comparison to Terrestrial Soils. *Biogeochemistry* **2012**, *111*, 455–467. https://doi.org/10.1007/s10533-011-9676-x.
73. Chen, H.; Li, D.; Xiao, K.; Wang, K. Soil Microbial Processes and Resource Limitation in Karst and Non-Karst Forests. *Funct. Ecol.* **2018**, *32*, 1400–1409. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13069.
74. Hill, B.H.; Elonen, C.M.; Jicha, T.M.; Kolka, R.K.; Lehto, L.L.P.; Sebestyen, S.D.; Seifert-Monson, L.R. Ecoenzymatic Stoichiometry and Microbial Processing of Organic Matter in Northern Bogs and Fens Reveals a Common P-Limitation between Peatland Types. *Biogeochemistry* **2014**, *120*, 203–224. https://doi.org/10.1007/s10533-014-9991-0.
75. Fanin, N.; Moorhead, D.; Bertrand, I. Eco-Enzymatic Stoichiometry and Enzymatic Vectors Reveal Differential C, N, P Dynamics in Decaying Litter along a Land-Use Gradient. *Biogeochemistry* **2016**, *129*, 21–36. https://doi.org/10.1007/s10533-016-0217-5.
76. Pei, Z.; Leppert, K.N.; Eichenberg, D.; Bruelheide, H.; Niaus, P.A.; Buscot, F.; Gutknecht, J.L.M. Leaf Litter Diversity Alters Microbial Activity, Microbial Abundances, and Nutrient Cycling in a Subtropical Forest Ecosystem. *Biogeochemistry* **2017**, *134*, 163–181. https://doi.org/10.1007/s10533-017-0353-6.
77. Ghosh, A.; Singh, A.B.; Kumar, R.V.; Manna, M.C.; Bhattacharyya, R.; Rahman, M.M.; Sharma, P.; Rajput, P.S.; Misra, S. Soil Enzymes and Microbial Elemental Stoichiometry as Bio-Indicators of Soil Quality in Diverse Cropping Systems and Nutrient Management Practices of Indian Vertisols. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *145*, 103304. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.06.007.
78. Cliquet, J.-B.; Deléens, E.; Bousser, A.; Martin, M.; Lescure, J.-C.; Prioul, J.-L.; Mariotti, A.; Morot-Gaudry, J.-F. Estimation of Carbon and Nitrogen Allocation during Stalk Elongation by 13C and 15N Tracing in Zea Mays L. *Plant Physiol.* **1990**, *92*, 79–87. https://doi.org/10.1104/pp.92.1.79.
79. García-Ruiz, R.; Ochoa, V.; Hinojosa, M.B.; Carreira, J.A. Suitability of Enzyme Activities for the Monitoring of Soil Quality Improvement in Organic Agricultural Systems. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 2137–2145.

80. Moorhead, D.L.; Rinkes, Z.L.; Sinsabaugh, R.L.; Weintraub, M.N. Dynamic Relationships between Microbial Biomass, Respiration, Inorganic Nutrients and Enzyme Activities: Informing Enzyme-Based Decomposition Models. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00223.
81. Sinsabaugh, R.L.; Follstad Shah, J.J. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2012**, *43*, 313–343. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414.
82. Almeida, R.F.; Naves, E.R.; da Mota, R.P. Soil Quality: Enzymatic Activity of Soil β-Glucosidase. *Glob. J. Agric. Res. Rev.* **2015**, *3*, 146–150.
83. Dodor, D.E.; Tabatabai, M.A. Arylamidase Activity as an Index of Nitrogen Mineralization in Soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2007**, *38*, 2197–2207.
84. Ekenler, M.; Tabatabai, M.A. Arylamidase and Amidohydrolases in Soils as Affected by Liming and Tillage Systems. *Soil Tillage Res.* **2004**, *77*, 157–168.
85. Jian, S.; Li, J.; Chen, J.I.; 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.
86. Siczek, A.; Lipiec, J. Impact of Faba Bean-Seed Rhizobial Inoculation on Microbial Activity in the Rhizosphere Soil during Growing Season. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 784. https://doi.org/10.3390/ijms17050784.
87. Skujins, J. History of Abiontic Soil Enzyme Research. *Soil Enzym. Academic Press, New York, USA.* **1978**., *1-49.*
88. Zhou, Y.; Qin, Y.; Liu, X.; Feng, Z.; Zhu, H.; Yao, Q. Soil Bacterial Function Associated With Stylo (Legume) and Bahiagrass (Grass) Is Affected More Strongly by Soil Chemical Property Than by Bacterial Community Composition. *Front Microbiol.* **2019**, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00798.
89. García-Palacios, P.; Maestre, F.T.; Gallardo, A. Soil Nutrient Heterogeneity Modulates Ecosystem Responses to Changes in the Identity and Richness of Plant Functional Groups. *J. Ecol.* **2011**, *99*, 551–562.
90. Nuruzzaman, M.; Lambers, H.; Bolland, M.D.A.; Veneklaas, E.J. Distribution of Carboxylates and Acid Phosphatase and Depletion of Different Phosphorus Fractions in the Rhizosphere of a Cereal and Three Grain Legumes. *Plant Soil* **2006**, *281*, 109–120. https://doi.org/10.1007/s11104-005-3936-2.
91. Faucon, M.-P.; Houben, D.; Lambers, H. Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 385–394. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.005.
92. Garnier, E.; Navas, M.-L.; Grigulis, K. *Plant Functional Diversity: Organism Traits, Community Structure, and Ecosystem Properties*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2016; ISBN 978-0-19-875736-8.
93. Tang, X.; Bernard, L.; Brauman, A.; Daufresne, T.; Deleporte, P.; Desclaux, D.; Souche, G.; Placella, S.A.; Hinsinger, P. Increase in Microbial Biomass and Phosphorus Availability in the Rhizosphere of Intercropped Cereal and Legumes under Field Conditions. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *75*, 86–93. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.04.001.
94. Wang, X.; Yang, Y.; Pei, K.; Zhou, J.; Peixoto, L.; Gunina, A.; Zeng, Z.; Zang, H.; Rasmussen, J.; Kuzyakov, Y. Nitrogen Rhizodeposition by Legumes and Its Fate in Agroecosystems: A Field Study and Literature Review. *Land Degrad. Dev.* **2020**, *32*, 410–419.
95. Paynel, F.; Lesuffleur, F.; Bigot, J.; Diquélou, S.; Cliquet, J.-B. A Study of 15N Transfer between Legumes and Grasses. *Agron. Sustain. Dev.* **2008**, *28*, 281–290. https://doi.org/10.1051/agro:2007061.
96. Treseder, K.K.; Vitousek, P.M. Effects of Soil Nutrient Availability on Investment in Acquisition of N and P in Hawaiian Rain Forests. *Ecology* **2001**, *82*, 946–954.
97. Giehl, R.F.H.; Wirén, N. von Root Nutrient Foraging. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 509–517. https://doi.org/10.1104/pp.114.245225.
98. Angers, D.A.; Caron, J. Plant-Induced Changes in Soil Structure: Processes and Feedbacks. *Biogeochemistry* **1998**, *42*, 55–72. https://doi.org/10.1023/A:1005944025343.
99. Roumet, C.; Birouste, M.; Picon-Cochard, C.; Ghestem, M.; Osman, N.; Vrignon-Brenas, S.; Cao, K.; Stokes, A. Root Structure–Function Relationships in 74 Species: Evidence of a Root Economics Spectrum Related to Carbon Economy. *New Phytol.* **2016**, *210*, 815–826. https://doi.org/10.1111/nph.13828.
100. Guyonnet, J.P.; Cantarel, A.A.M.; Simon, L.; Haichar, F. el Z. Root Exudation Rate as Functional Trait Involved in Plant Nutrient-Use Strategy Classification. *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 8573–8581. https://doi.org/10.1002/ece3.4383.
101. Lin, D.; Yang, S.; Dou, P.; Wang, H.; Wang, F.; Qian, S.; Yang, G.; Zhao, L.; Yang, Y.; Fanin, N. A Plant Economics Spectrum of Litter Decomposition among Coexisting Fern Species in a Subtropical Forest. *Ann. Bot.* **2019**, *125*. https://doi.org/10.1093/aob/mcz166.
102. Birouste, M.; Kazakou, E.; Blanchard, A.; Roumet, C. Plant Traits and Decomposition: Are the Relationships for Roots Comparable to Those for Leaves? *Ann. Bot.* **2012**, *109*, 463–472. https://doi.org/10.1093/aob/mcr297.
103. Bardgett, R.D. Plant Trait-Based Approaches for Interrogating Belowground Function. *Biol. Environ. Proc. R. Ir. Acad.* **2017**, *117B*, 1–13. https://doi.org/10.3318/bioe.2017.03.
104. Hütsch, B.W.; Augustin, J.; Merbach, W. Plant Rhizodeposition—An Important Source for Carbon Turnover in Soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2002**, *165*, 397–407. https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C.
105. Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G.; Valori, F. Microbial Diversity and Microbial Activity in the Rhizosphere. *Cienc. Suelo* **2007**, *25*, 89–97.
106. Weintraub, M.N.; Scott-Denton, L.E.; Schmidt, S.K.; Monson, R.K. The Effects of Tree Rhizodeposition on Soil Exoenzyme Activity, Dissolved Organic Carbon, and Nutrient Availability in a Subalpine Forest Ecosystem. *Oecologia* **2007**, *154*, 327–338. https://doi.org/10.1007/s00442-007-0804-1.
107. Cheng, W. Rhizosphere Priming Effect: Its Functional Relationships with Microbial Turnover, Evapotranspiration, and C–N Budgets. *Soil Biol. Biochem.* **2009**, *41*, 1795–1801. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.04.018.

108. Brzostek, E.R.; Greco, A.; Drake, J.E.; Finzi, A.C. Root Carbon Inputs to the Rhizosphere Stimulate Extracellular Enzyme Activity and Increase Nitrogen Availability in Temperate Forest Soils. *Biogeochemistry* **2013**, *115*, 65–76. https://doi.org/10.1007/s10533-012-9818-9.
109. Zhang, X.; Dippold, M.A.; Kuzyakov, Y.; Razavi, B.S. Spatial Pattern of Enzyme Activities Depends on Root Exudate Composition. *Soil Biol. Biochem.* **2019**, *133*, 83–93. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.010.
110. Steinauer, K.; Chatzinotas, A.; Eisenhauer, N. Root Exudate Cocktails: The Link between Plant Diversity and Soil Microorganisms? *Ecol. Evol.* **2016**, *6*, 7387–7396. https://doi.org/10.1002/ece3.2454.
111. Van de Waal, D.B., Elser, J.J., Martiny, A.C., Sterner, R.W., Cotner, J.B. *Progress in Ecological Stoichiometry*, Eds.; Frontiers Research Topics; Frontiers Media SA: Lausanne, Switzerland, 2018; ISBN 978-2-88945-621-5.
112. Gao, Y.; Zhou, P.; Mao, L.; Zhi, Y.; Zhang, C.; Shi, W. Effects of Plant Species Coexistence on Soil Enzyme Activities and Soil Microbial Community Structure under Cd and Pb Combined Pollution. *J. Environ. Sci.* **2010**, *22*, 1040–1048. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60215-1.
113. Sanaullah, M.; Blagodatskaya, E.; Chabbi, A.; Rumpel, C.; Kuzyakov, Y. Drought Effects on Microbial Biomass and Enzyme Activities in the Rhizosphere of Grasses Depend on Plant Community Composition. *Appl. Soil Ecol.* **2011**, *48*, 38–44. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.02.004.
114. Elfstrand, S.; Hedlund, K.; Mårtensson, A. Soil Enzyme Activities, Microbial Community Composition and Function after 47 Years of Continuous Green Manuring. *Appl. Soil Ecol.* **2007**, *35*, 610–621. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.09.011.
115. Bell, C.; Carrillo, Y.; Boot, C.M.; Rocca, J.D.; Pendall, E.; Wallenstein, M.D. Rhizosphere Stoichiometry: Are C : N : P Ratios of Plants, Soils, and Enzymes Conserved at the Plant Species-Level? *New Phytol.* **2014**, *201*, 505–517. https://doi.org/10.1111/nph.12531.
116. Bragazza, L.; Fontana, M.; Guillaume, T.; Scow, K.M.; Sinaj, S. Nutrient Stoichiometry of a Plant-Microbe-Soil System in Response to Cover Crop Species and Soil Type. *Plant Soil* **2021**. https://doi.org/10.1007/s11104-021-04853-9.
117. Allison, S.D.; Vitousek, P.M. Responses of Extracellular Enzymes to Simple and Complex Nutrient Inputs. *Soil Biol. Biochem.* **2005**, *37*, 937–944.
118. Allison, S.D. Cheaters, Diffusion and Nutrients Constrain Decomposition by Microbial Enzymes in Spatially Structured Environments. *Ecol. Lett.* **2005**, *8*, 626–635. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00756.x.
119. Mooshammer, M.; Wanek, W.; Hämmerle, I.; Fuchslueger, L.; Hofhansl, F.; Knoltsch, A.; Schnecker, J.; Takriti, M.; Watzka, M.; Wild, B.; et al. Adjustment of Microbial Nitrogen Use Efficiency to Carbon:Nitrogen Imbalances Regulates Soil Nitrogen Cycling. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3694. https://doi.org/10.1038/ncomms4694.

Chapitre IV E :

Ce chapitre est présenté sous forme d'article intitulé **« Linking plant exudation to rhizospheric microbiome: Characterization of bacterial and fungal communities directly influenced by root exudates of three plant species »,** en préparation pour soumission à Microorganisms.

Préambule

Les chapitres précédents mettent en évidence des apports différents de carbone issu de la rhizodéposition chez les espèces de Fabacées étudiées et confirment l'effet « priming » des flux de carbone de la plante vers sur le sol. Dans ce chapitre, nous avons cherché à caractériser la structure des communautés bactériennes et fongiques rhizosphériques et racinaires impliquées dans l'assimilation du C rhizodéposé chez une Fabacée fourragère (trèfle incarnat), une Fabacée protéagineuse (féverole) et une Poacée (blé). Le suivi de l'évolution de la structure des communautés microbiennes a été réalisé par la technique du DNA SIP basé sur le traçage par isotope stable de l'ADN.

Principaux résultats

- La différence de rhizodeposition du C entre les espèces végétales entraine des modifications spécifiques dans la diversité des communautés bactérienne et fongique qui utilisent activement les exsudats racinaires.

- La féverole abrite une communauté microbienne active plus abondante et plus diversifiée que celle du trèfle incarnat et du blé.

- La production de biomasse aérienne et racinaire ainsi que le contenu en matière sèche des racines (RDMC) sont les principaux traits explicatifs des différence observées.

microorganisms

Linking plant exudation to rhizospheric microbiome: Characterization of bacterial and fungal communities directly influenced by root exudates of three plant species.

Mohamed Kanté[1,2,4], Isabelle Trinsoutrot-Gattin[1,4], Mélanie Bressan[1,4], Quentin Dupas[3,4], Jean-Bernard Cliquet[2,4], Wassila Riah-Anglet[1,4]*

[1] UniLaSalle, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, Rouen Team, 3 Rue du Tronquet, F-76134 Mont-Saint-Aignan, France; mohamed.kante@unicaen.fr (M.K.); Isabelle.GATTIN@unilasalle.fr (I.T.-G.); Melanie.BRESSAN@unilasalle.fr (M.B)
[2] Normandie University, UNICAEN, INRAE, EVA, CEDEX, F-14032 Caen, France; jean-bernard.cliquet@unicaen.fr (J.-B.C)
[3] Normandy UniversityUNICAEN, Platin', EVA, INRAE F-14032 Caen, France; quentin.dupas@unicaen.fr (Q.D)
[4] Research Federations NORVEGE Fed4277, Normandy University, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France

* Correspondence: wassila.RIAH-ANGLET@unilasalle.fr; Tel.: +33-2-3282-9198; Fax: +33-2-3505-2740.

Abstract: Legumes and poaceous are known to have contrasting carbon inputs through rhizodeposition, resulting in contrasting soil enzyme activities profiles and microbial resource limitation. In this study, we aimed to characterize the structure of the rhizospheric and root bacterial and fungal communities of two legumes, faba bean and crimson clover and wheat. We used the DNA- SIP method to study the incorporation of plant-exuded ^{13}C into microbial communities in relation to plant functional traits. We observed a common microbial community in the different rhizospheric soils, but a strong effect of plant species on some communities was also showed. The bacterial major phyla were Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Chloroflexi, Germmatimonadetes. The fungal major phyla included Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Mortierellomycota and Mucoromycota. At genus level, we found bacterial genera more actively assimilating root-derived compounds such as *Pseudomonas, Noviherbaspirillum* (for faba bean), *Cupriavidus* and *Polyangiales* (for wheat), *Geobacter* and *Nitrosomonadaceae* (for crimson clover). Fungal active genera were constituted mostly of mycorrhizal fungi *Archaespora*. The root microbial communities were represented by N-fixing bacteria and mycorrhizal fungi which were more abundant for legume roots. The use of functional traits also provided further explanations for the observed differences. In particular, biomass production, specific leaf area and root dry matter content that were associated with the specific microbial communities.

Keywords: bacterial and fungal diversity; root exudates; DNA-SIP approach, rhizospheric microbiome; ^{13}C stable isotope labeling; legume crops.

1. Introduction

The rhizosphere is a highly complex and dynamic soil zone both temporally and spatially under the influence of roots [1–3]. The rhizosphere is continuously shaped by the interaction between plant, soil, and microorganisms [4,5]. Roots provide different microhabitats in the rhizosphere including (i) the endorhizosphere (the endodermis and cortical layers within the root) (ii) the rhizoplane (the root surface with a polysaccharide layer), and (iii) the ectorhizosphere (soil particles beyond the root surface that are in contact with the root exudates)[6]. These authors suggest that in the bulk soil the composition of microbial communities is influenced by soil characteristics and the profile of previous vegetation. Then as microorganisms pass into the ectorhizosphere the microbial community

composition is influenced by root exudates. With increasing proximity to the root surface, a specific microbial community is observed depending on the plant species [6]. At the rhizoplane the microorganisms are under a polysaccharide complex and the endorhizosphere presents microorganisms that have penetrated and colonized the root according to signals exchange and specific microbial traits [7,8].

Root exudates are known to drive many interactions in the soil and perform various functions in soil ecology [1,9–11]. As source of energy for microorganisms, they are rapidly consumed in the rhizosphere and stimulate the activities of microbial communities [12,13]. The quantity and quality of root exudates are dependent on several factors, including plant species, soil characteristics, and environmental conditions [14,15]. Addition of glucose and mucilage to bulk soil may stimulate rhizospheric activities and increase microbial abundance in the soil [16]. The proportion of cultivable bacteria in bulk soil is reported to be less than 1% compared to rhizospheric soil where this proportion is between 2 and 7% [17]. The greater development of rhizospheric microbial communities is described as microbial hotspot and reflects more intense biological interactions compared to bulk soil [5,9,18]. Several positive and negative interactions can be found between plants and microorganisms mediated by root exudates [19–21]. Among positive interactions, plant growth can be positively influenced by microorganisms including symbiotic relationships allowing N_2 fixation and mycorrhization [22–24]. Bacteria known as PGPR (Plant Growth Promoting Bacteria) in the rhizosphere also provide benefits for plant development [1,25]. Among negative interactions, some rhizospheric microorganisms are parasitic or pathogenic to plants [26]. Root exudates are also involved in nutrient availability in the soil particularly through enzymatic activities and modification of soil chemical properties [1,27]. A better understanding of such exchanges is essential because they play a key role in soil nutrients dynamics [28,29].

According to Nguyen [12], an average of 17% of plant-fixed C is rhizodeposited in the soil, but this amount varies strongly among species [30]. This C contributes in the increase of microbial biomass (from 4 to 20 fold) and the increase by 3 fold the decomposition rates of organic substrates in the rhizosphere compared to bulk soil [31]. Differences in root exudation between species leads to differences in the composition of rhizospheric microbial communities [32]. Steinauer et al. [33] by applying different mixtures of synthetic exudates into a soil demonstrated significant changes in the biomass and the diversity of soil microorganisms. In addition, C-rich exudates were found to promote soil microbial biomass more than N-rich exudates cocktails. The difference in microbial communities between the rhizospheric soil and bulk soil may also be reflected in a difference in microbial activities. Indeed Siczek et al. [34] have shown higher enzymatic activities and metabolic diversity of microorganisms in the rhizosphere of faba bean compared to wheat. The presence of the fixative symbiosis with rhizobia may also influence these activities [35]. In relation to the composition of root exudates which are quantitatively and qualitatively variable between plant species, the activities and diversity of microorganisms in the soil are thus strongly impacted.

The link between plant exudates and rhizospheric microorganisms can be directly studied using Stable Isotope Probing (SIP) techniques based on ^{13}C stable isotope labeling [36–39]. SIP has been applied to track C transfer from plants to microorganisms through nucleic acids and highlights active microbes that assimilate C substrates [40]. The use of nucleic acids as biomarkers offers a potential to identify a large range of microorganisms [37]. Using RNA-SIP approach, Vandenkoornhuyse et al. [41] demonstrated that *Burkholderiales* affiliated to *Proteobacteria* were a major microbial group metabolizing white clover and bentgrass root exudates. Haichar et al. [42] demonstrated with the DNA SIP methodology that rhizospheres of wheat, maize, rapeseed, and alfalfa host different bacterial communities in relation to root exudate uptake. Others studies have also used this approach to characterize microorganisms involved in the degradation of crop residues [43,44] and Guyonnet et al. [45] demonstrated that plant nutrient resource strategies influence the structure of active microorgamisms involved in root exudate

assimilation and soil organic matter degradation. Because of the many processes involved, the study of plant-soil interactions, specifically between the plant and the wide diversity of soil microorganisms, are important to address challenges in the management of crop production [46]. Particularly in a context of sustainable production optimizing environmental performance, including the legume-based agricultural system that provides numerous benefits (i.e maintaining soil quality, improving biodiversity and nutrients availability) [47–50].

Previous works revealed that forage legumes and seed legumes exhibited contrasting C and N rhizodeposition profiles (Kanté et al, submitted) and soil enzyme activities (Kante et al. [51]). In the present study, we hypothesize that, differences in root exudation between plant species may lead to differences in the diversity of soil rhizospheric microbiome and root microbiome in relation to plant functional traits. The aim of this study was to investigate the rhizosphere using the DNA -SIP approach to characterize soil and roots bacterial and fungal communities of legume and non-legume species under controlled condition using atmospheric $^{13}CO_2$ labeling.

2. Materials and Methods

2.1. Plant growing and ^{13}C labeling

The experiment was conducted using two legume species: faba bean (*Vicia faba* L. cv Fanfare); crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and a poaceous: wheat (*Triticum aestivum* L. cv Lennox). The experiment was carried out under controlled conditions in greenhouse during 2 weeks and in growth chamber during 3 weeks. After seed sterilization and ten days of germination (including 2 to 3 days for seedlings emergence), seedlings were transferred in 1 L pot (10 cm depth, 15 cm diameter) containing 900 g soil adjusted between 70 – 80% of the soil water holding capacity (WHC). Soil used in this study was collected at 0 – 20 cm depth from an arable field in Seine Maritime, France (Saint Georges sur Fontaine) and was sieved at 2 mm. The soil is a loamy soil: clay (146.50 $mg.kg^{-1}$ of dry soil), loam (452.65 $mg.kg^{-1}$) and sand (117.35 $mg.kg^{-1}$) with 9.31 C/N ratio, 2.42% of organic matter content. Four replicates of each plant species were grown. The seedlings were sown according to their field sowing density adapted to the area of the pots as in Kanté et al [51]. Thus, one plant per pot was sown for faba beans, two for wheat and four for crimson clover. The pots were automatically watered with a flow rate of 60 $ml.pot^{-1}.day^{-1}$ and was manually adjusted to maintain the Water Holding Capacity (WHC) between 70-80%. Additional light was provided by sodium lamps (400 W Philips SON T-PIA Agro, providing 400 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ photosynthetic active photons) with a photoperiod of 16 h day at 20°C and 8 h night at 18°C.

To monitor the assimilation of exudates by the soil rhizospheric microbiome, plants were labeled into a growth chamber 4 weeks after transplantation with $^{13}CO_2$ for 10 days. This growth chamber (Froids et Mesures, Beaucouze, France). is equipped for automatic control of light, temperature, moisture, CO_2 concentration and $^{13}CO_2$ enrichment as explained in Kanté et al. [51]The photoperiod and day and night temperatures were similar to those used in the greenhouse. The experimental condition was similar to that described in Kanté et al. [51]. CO_2 was injected into the chamber to achieve a concentration of 400 ppm and a 50% atom excess of ^{13}C.

2.2. Harvest and analyzes

The harvest was carried out after 10 days of labeling. Plants aboveground parts were cut at soil surface and total biomass was measured. Leaf lamina area was measured with an area meter (LI-COR LI-3100, Lincoln, NE, USA). The harvested plant shoot tissues were then dried at 70°C and weighed for dry mass determination. The roots of each pot were manually separated from the soil and then carefully separated from the rest of the fine roots. Roots were washed carefully with distilled water to remove any remaining soil particles. The root and RAS samples were immediately frozen in liquid N_2 and stored at -80 °C for further DNA extraction. Dry biomass was determined on the remaining root tissue. Different plant functional traits were determined: (1) total shoot and root dry biomass (g); (2) Shoot : Root ratio ($g.g^{-1}$) corresponding to the ratio of total shoot dry mass

to total root dry mass, (3) Leaf Dry Matter Content (LDMC, $mg.g^{-1}$) corresponding to the ratio of total leaf dry mass to total leaf fresh biomass; (4) Root Dry Matter Content (RDMC; $mg.g^{-1}$) given by the ratio of total root dry biomass to total root fresh biomass; (5) Specific Leaf Area (SLA; $cm^2.g^{-1}$) determined by the ratio of total leaf area to total leaf biomass.

2.3. DNA extraction and gradient fractionation

DNA extraction was carried out on 100 g of root tissues using the DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Germantown Rd, USA) as described by the manufacturer. For the soil samples, DNA was 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 pot and the DNA extracts were then pooled. The soil DNA concentrations were assessed by fluorimetry using the Fluorescent DNA quantitation Kit Hoechst 33258 (Biorad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer instructions. The DNA solutions were stored at −20 °C until use for gradient fractionation. Root DNA extracts were not submitted to gradient fractionation as they were assumed to be representative of active microorganisms [38].

Cesium chloride (CsCl, Sigma-Aldrich) density gradient centrifugation was performed to separate labeled (^{13}C DNA) and unlabeled (^{12}C DNA) extracted from rhizospheric soil. Approximately 10 µg of DNA were loaded in the density gradient and centrifuged in 4.9 ml polyallomer Optiseal tube in an NVT 90 rotor (Beckman) at 20 °C, 45 000 rpm, for 72 h as in Haichar et al. [52]. Centrifuged gradients were fractionated from the top to the bottom of the Optiseal tube into approximately 250 µl by using 1ml syringes. The density of each fraction was determined by weighing (m/v). Nucleic acids were purified from CsCl salts using Gene Clean kit (MP Biomedical). DNA concentrations were fluorometrically quantified using PicoGreen staining kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) as described by the manufacturer. The ^{13}C isotopic composition of each fraction were determined using an elemental analyzer (EA3000, EuroVector, Milan, Italy) coupled to an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Nu Instruments, Manchester, UK). Briefly, 20 µl of each fraction was placed into a 5 x 12mm tin capsule, dried at 30° C for 24h and submitted to IRMS analysis. The identification of the fraction representative of ^{13}C-labeled DNA ("heavy") and the fraction representative of unlabeled ^{12}C DNA ("light") is done by plotting the amounts of DNA of the fractions with their enrichment in ^{13}C. Three fractions rich in ^{13}C were selected towards the base of the tube and three other fractions were selected in the top of the tube.

The gradient separation step required fine-tuning of the protocol for separating fractions containing labeled and unlabeled DNA [40,53]. For this purpose, two bacterial species were grown in the presence or absence of ^{13}C labeling. *E. coli* growth in the presence of LB medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 1 g of ^{13}C glucose (99 atm%) (Sigma-Aldrich) while *Bacillus subtilis* growth on unlabeled LB medium (Figure S1).

These steps led to the identification of ^{13}C DNA and ^{12}C DNA fractions obtained from faba bean, crimson clover and wheat rhizospheric soils. The obtained ^{13}C and ^{12}C DNA fractions were then stored at - 20 °C until further analyses.

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

Thirty-six samples of DNA extracted from rhizospheric soils and plant roots (3 plant species × 4 replicates × 2 DNA fractions) + (3 plant species roots × 4 replicates × 1 DNA fractions) were analyzed for the bacterial 16S rRNA gene and for the ITS region of fungal gene amplicons by high-throughput sequencing using the Illumina MiSeq. Bacterial community composition and structure was assessed by the sequencing of the V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene, whereas fungal community structure was assessed by the sequencing of the internal transcribed spacer (ITS 2) region of the 18S rRNA gene. The estimation of the absorbance ratio A 260/A 280 attested DNA purity (with values between 1.96 and 2.16, data not showed). Two-step Nextera PCR libraries using the primer pair 341F (5′ - CCT ACG GGN GGC WGC AG-3′) (Miran et al.[54]) and 805R (5′ - GAC TAC

Table 1. Functional traits of plants after 10 days of labeling. Shoot dry mass, Root dry mass, Shoot to Root ratio, Leaf Dry Matter Content (LDMC), Specific leaf area (SLA), Root Dry Matter Content (RDMC).

	Shoot dry mass (g)	**Root dry mass (g)**	**Shoot:Root Ratio**	**SLA ($cm^2.g^{-1}$ of leaf dry mass)**	**LDMC ($g.g^{-1}$ of leaf fresh mass)**	**RDMC ($g.g^{-1}$ of root dry mass)**
Wheat	1.10 ± 0.07 c	0.60 ± 0.06 b	1.84 ± 0.07 c	203.43 ± 10.36 a	324.09 ± 9.69 a	0.22 ± 0.01 a
Faba bean	5.70 ± 0.47 a	2.39 ± 0.33 a	2.43 ± 0.20 b	147.21 ± 8.77 b	242.02 ± 14.75 b	0.07 ± 0.00 b
Crimson clover	2.52 ± 0.59 b	0.61 ± 0.15 b	4.17 ± 0.12 a	217.92 ± 2.95 a	349.67 ± 16.12 a	0.10 ± 0.01 b
	*F= 38.41****	*F= 32.43****	*F= 95.92****	*F= 28.93****	*F= 22.14****	*F= 112.4****

Statistical data are expressed as means ± SD, (n = 4). Means in a column followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$), different letters mean significant difference according to the Tukey test. One-way ANOVA analysis F values are showed. *** $p \leq 0.001$.

HVG GGT ATC TAA TCC -3′) (Miran et al.[54]) and the primer pair ITS3 (5′ - GTG AAT CAT CGA RTC TTT G-3′) (Ihrmark et al.[55]) and ITS4 (5′ - TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) (White et al.[56]) were created for the bacterial and fungal communities, respectively. Subsequently, an Illumina MiSeq platform and a v3-600 cycles kit were used to sequence the PCR libraries (Microsynth France, Vaulx-en-Velin, France). The produced paired-end reads that passed Illumina's chastity filter were subjected to the de-multiplexing and trimming of Illumina adaptor residuals using Illumina's bcl2fastq software version v2.20.0.422. The quality of the reads was checked with the software FastQC version 0.11.8, and sequencing reads that fell below an average Q-score of 20 or had any uncalled bases (N) were removed from further analysis. The locus-specific V3–V4 primers and ITS2 primers were trimmed from the sequencing reads with the software Cutadapt v3.2. Paired-end reads were discarded if the primer could not be trimmed. Trimmed forward and reverse reads of each paired-end read were merged to *in-silico* reform the sequenced molecule considering a minimum overlap of 15 bases using the software USEARCH version 11.0.667. Merged sequences were again quality filtered, allowing a maximum of one expected error per merged read and discarding those containing ambiguous bases. From the remaining reads, the fungal ITS2 sub regions were extracted with help of the ITSx software suite v1.1.3 and its included database. Reads that contain ambiguous bases or that were outliers regarding the amplicon size distribution were also discarded. Samples that resulted in less than 5000 merged reads were discarded to not distort the statistical analysis. The remaining reads were denoised using the UNOISE algorithm implemented in USEARCH to form operational taxonomic units (OTUs) discarding singletons and chimeras in the process. The resulting OTU abundance table was then filtered for possible barcode bleed-in contaminations using the UNCROSS algorithm. OTU sequences were compared to the reference sequences of the RDP 16S, and the UNITE database and taxonomies were predicted considering a minimum confidence threshold of 0.5 using the SINTAX algorithm implemented in USEARCH. The computational data analysis described in this section was performed by Microsynth AG (Balgach, Switzerland).

2.5. Statistical analyses

Statistical analyzes were carried out using the software R (R Development Core Team, 3.5.0 version). The data from plant functional traits 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. Kruskal-Wallis rank sum and post-hoc multiple comparison tests (package "nparcomp") were used to verify whether bacterial and fungal diversity varied significantly among heavy and light DNA extracted from rhizospheric soils and plant roots. Principal component analyses (PCAs) were also performed to compare the analyses of bacterial and fungal community structures of heavy and light DNA of rhizospheric soils for faba bean, crimson clover and wheat using the package 'Factoshiny'.

3. Results

3.1. Plants traits

Both aboveground and belowground biomass varied significantly among species ($F= 38.41$ and $F= 32.43$ respectively). Faba bean produced more shoot and root biomass compared to the other species (**Table 1**). Crimson clover developed more shoot biomass than wheat, but the difference was not significant for root biomass. Wheat presented the lowest shoot:root ratio, followed by faba bean and clover. Crimson clover and wheat, presented higher SLA values than faba bean, showing an efficient production of leaf area per unit dry mass.

The higher LDMC was observed for crimson clover and Root dry matter also confirmed a difference in tissues quality. Wheat exhibited the highest RDMC, suggesting dense tissue.

3.2. ^{13}C root exudates incorporation into microbial community DNA

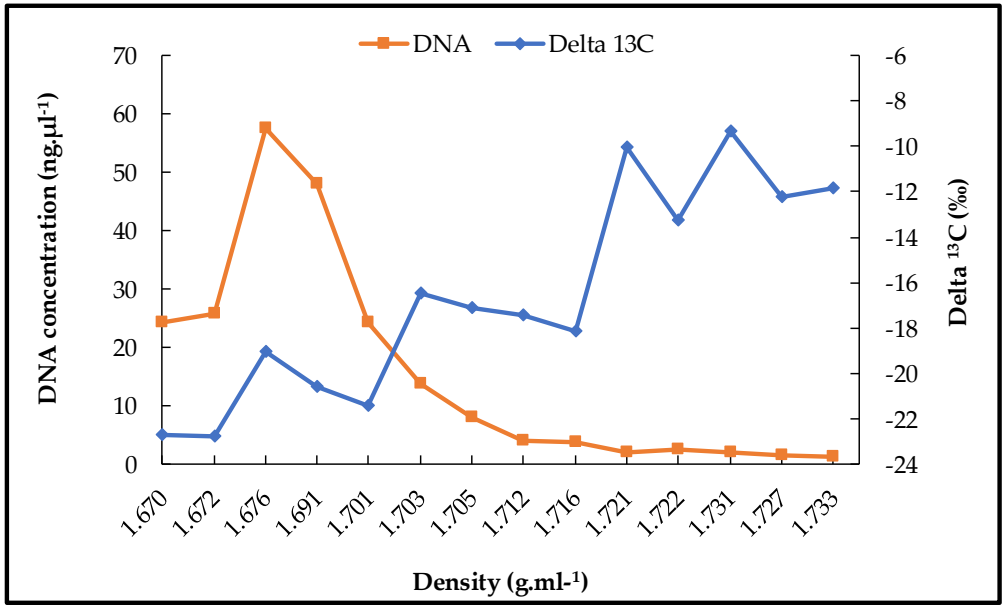


Figure 1. Incorporation of ^{13}C-root exudates into the DNA of microbial community derived from the rhizospheric soil of crimson clover after 10 days of $^{13}CO_2$ labeling (fractions 1 – 14). ^{12}C (light) and ^{13}C (heavy) DNA were separated by CsCl density gradient centrifugation. Total DNA (orange line), and delta ^{13}C value (blue line) within gradient fractions.

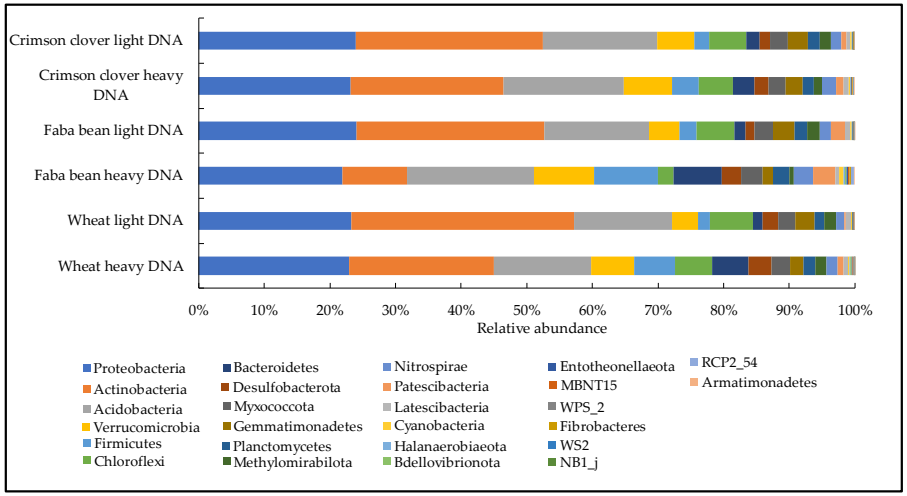


Figure 2. Relative abundance of bacterial phyla in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of the rhizospheric soils of crimson clover, faba bean and wheat. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumi-na sequencing for the different species.

Table 2. Delta ^{13}C (‰) value of light and heavy DNA fractions from rhizospheric soils of the different plants.

	Wheat	Faba bean	Crimson clover
Light DNA Delta ^{13}C (‰)	-21.34 ± 1.34	-25.25 ± 0.99	-20.79 ± 1.85
Heavy DNA Delta ^{13}C (‰)	-18.33 ± 0.56	-19.25 ± 1.08	-10.87 ± 2.07
	F = 10.4 *	*F = 49.87* **	F = 37.99 **

Statistical data are expressed as means ± SD, (n = 3). One-way ANOVA analysis F values are shown. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

To assess the utilization of ^{13}C exudates by soil microorganisms, DNA extracted from the rhizospheric soil of each plant was fractionated by isopycnic centrifugation and the ^{13}C content of the fractions along the gradient were analyzed. An example of DNA distribution and ^{13}C labeling in the density gradient fractions with DNA extracted from the rhizospheric soil of crimson clover is shown in **Figure 1**.

The DNA profile shows a single peak ranging from 1.670 to 1.705 $g.ml^{-1}$ of CsCl, and the delta ^{13}C measured by IRMS increased slightly in the light fractions before increasing significantly, indicating more labeled DNA between the densities 1.716 and 1.733 (Figure 1). Similar patterns have been obtained for DNA extracted from the rhizospheric soils of the other plant species (Figure S2 and S3). Three fractions at the densities of 1.672, 1.676, and 1.691 were pooled and selected as representative of light DNA (^{12}C DNA). Three additional fractions within densities of 1.721, 1.722, and 1.731 $g.ml^{-1}$ of CsCl were selected as representative of heavy DNA (^{13}C DNA) originating from microorganisms actively assimilating ^{13}C from root exudates. The delta ^{13}C values of these fractions were on average -20.79‰ for the light DNA fractions and -10.87‰ for the heavy DNA fractions for crimson clover rhizospheric soil ($F = 10.4$, **Table 2**). These values were equivalent to -25.25‰ for the light DNA fractions and -19.25‰ for the heavy DNA fractions for the rhizospheric soil of faba. While the delta ^{13}C values for the light DNA fractions corresponded to -21.34‰ and -18.33‰ for the heavy DNA fractions for the rhizospheric soil of wheat. The reported delta ^{13}C values were significantly higher in the heavy DNA fractions than in the light DNA fractions for all plants, suggesting incorporation of ^{13}C-rich plant exudates by rhizospheric microbial communities.

3.3. Composition of microbial communities in rhizospheric soil of the three plant species

3.3.1. Bacterial communities

In order to explore the composition of microbial communities, four replicates of the light (^{12}C DNA) and heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soil of each plant were analyzed by Illimina sequencing. Bacterial community composition was determined by sequencing the V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene. Sequencing yielded a total of 3 071 228 single reads, and their distribution ranged from a minimum of 260 to a maximum of 136 335 reads. The relative abundance of the identified bacterial phyla in the rhizospheric soils are presented in the **Figure 2**. In this study, the bacterial phyla exhibiting a relative abundance greater than 1% are considered as major bacterial phyla as reported by other authors [57,58].

In the light DNA fraction of rhizospheric soil major bacterial phyla presented similar distribution patterns among plant species. These phyla included Actinobacteria (on average 32% for three plant species), Proteobacteria (24%, including alpha and gamma proteobacteria), Acidobacteria (16%), Chloroflexi (6%), Verrucomicrobia (5%), Germmatimonadetes and Myxacoccota (3%). The abundances of Desulfobacterota, Firmicutes, Methylomirabilota, Planctomycetes, Bacteroidetes, Nitrospirae were on average 2%. Only the phylum *Patescibacteria* relative abundances were significantly different among species rhizospheric soils ($p< 0.05$, Table S1) with the greater abundance for rhizospheric soil of faba bean (2%) compared to rhizospheric soil of wheat (0.3%) and crimson clover (0.7%).

In the heavy DNA faction of rhizospheric soils, some significant differences were observed for some major bacterial phyla such as Actinobacteria, Chloroflexi and cyanobacteria. Indeed, Actinobacteria and Chloroflexi relative abundances in heavy DNA of the rhizospheric soil of faba bean were significantly lower compared to heavy DNA of the rhizospheric soils of wheat and crimson clover (Table S2). Conversly, cyanobacteria relative abundance was higher in heavy DNA of the rhizospheric soil of faba bean.

When the light DNA fraction and the heavy DNA fractions are compared for each plant species rhizospheric soil, the results showed a plant species effect. This effect was most pronounced for minor bacterial phyla (relative abundance < 1%) (Table S3). Concerning the rhizospheric soil of wheat, Fibrobacteres and Armatimonadetes was more

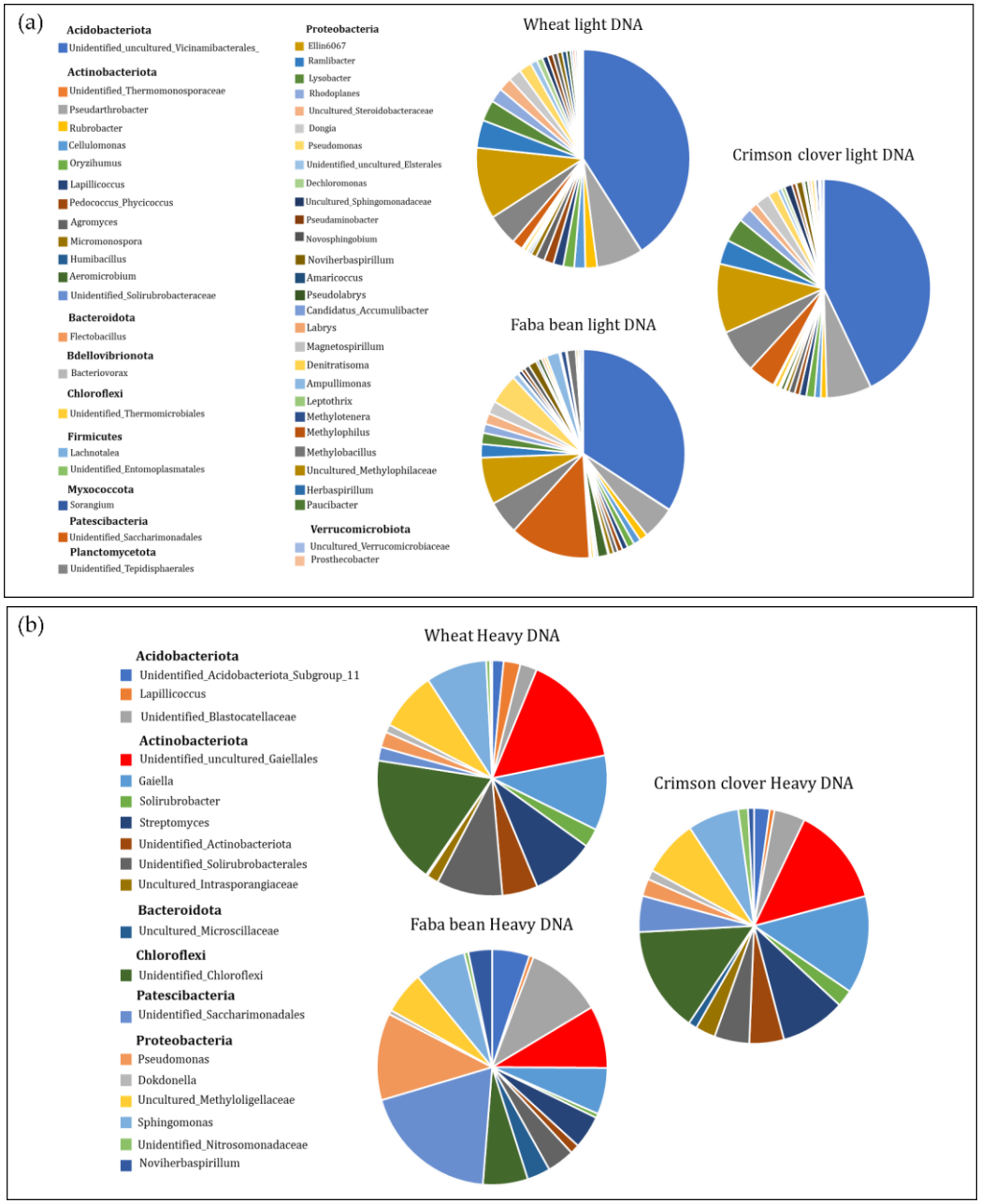


Figure 3. Relative abundance of bacterial genera in (a) the light DNA (^{12}C DNA) and (b) the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of the rhizospheric soils of wheat, crimson clover and faba bean. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the different treatments are presented.

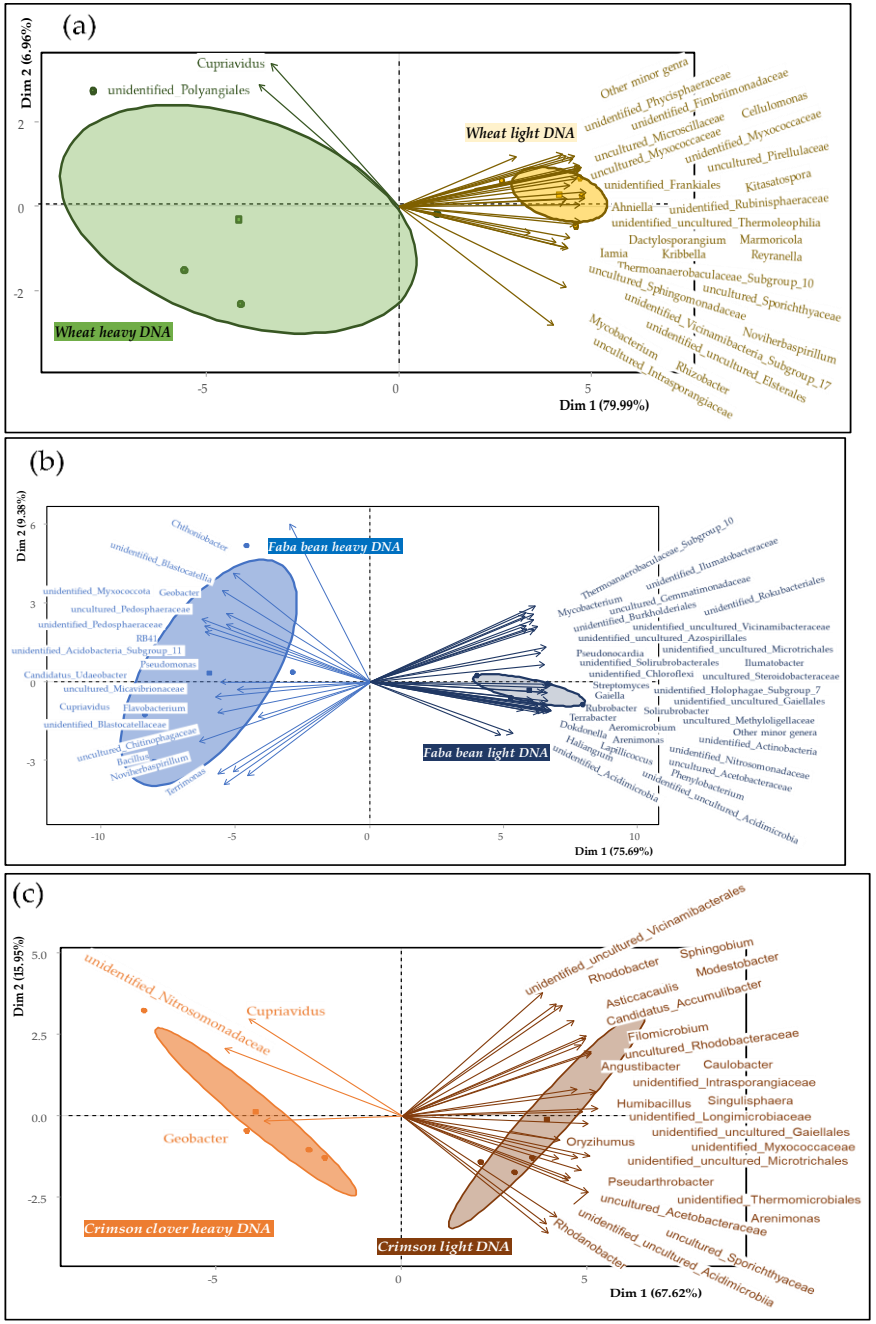


Figure 4. Principal component analyses generated using soil bacterial genera relative abundance of heavy DNA (^{13}C DNA) and light DNA (^{12}C DNA) of the rhizospheric soils of (a) Wheat; (b) Faba bean and (c) Crimson clover. Only genera showing significant differences among the rhizospheric soils of plants are presented.

abundant in the light DNA fraction in comparison to heavy DNA fraction (Table S3). In the rhizospheric soil of faba bean, the bacterial phyla significantly abundant in light DNA fraction are represented mainly by Actinobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Methylomirabilota. Conversely in the heavy DNA, Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia were more abundant. For crimson clover rhizospheric soil, only *Desulfobacterota* were distinguished between heavy and light DNA fractions, with higher abundance showed in heavy DNA fraction.

Regarding bacterial genera, only genera showing significant differences among rhizospheric soil of plant species are presented (**Figure 3 a and b**). Among the major differences observed, bacteria belonging to the *Vicinamibactererales*, *Thermomicrobiales* and *Tepidisphaerales*, *Candidatus Accumulibacter*, *Pseudarthrobacter* as well as unidentified *Sphingomonadaceae* appear to be more abundant in the light DNA of rhizospheric soil of crimson clover than that of faba bean and wheat (**Figure 3 a**). The light DNA of the rhizospheric soil of faba bean was enriched with *Aeromicrobium*, *Ampullimonas*, *Herbaspirillum*, *Labrys*, *Methylobacillus*, *Paucibacter*, *Pseudomonas* and bacteria from *Methylophilaceae* and *Saccharimonadalesin* (Table S4). The light DNA of the rhizospheric soil of wheat presented intermediate abundance comprised between those of faba bean and crimson clover for some genera, but it was highly enriched with *Amaricoccus*, *Humibacillus*, *Lapillicoccus*, *Rubrobacter*, *Sorangium* and bacteria of the *Elsterales* group compared to the light DNA of the two other rhizospheric soils.

The diversity of bacterial genera of heavy DNA of the rhizospheric soil of wheat was, different from that of faba bean. Indeed, most of the genera such as *Sphingomonas*, *Lapillicoccus*, bacteria from *Methyloligellaceae*, *Chloroflexi* and *Solirubrobacterales* presented significant diffrences between these two rhizospheric soils (**Figure 3 b**). Although the heavy DNA of the rhizospheric soil of crimson clover presented an intermediate level of abundance between faba bean and wheat in most cases (Table S5). It was enriched with some bacterial genra such as *Nitrosomonadaceae*, *Dokdonella* as well as other bacteria from the *Gaieellales* and *Intrasporangiaceae*, which exhibited intermediate abundances in the heavy DNA of the rhizospheric soil of wheat. For faba bean, the heavy DNA was enriched with *Pseudomonas*, *Noviherbaspirillum* and bacteria from *Microscillaceae*, *Acidobacteria* Subgroup 11, *Blastocatellaceae* and *Saccharimonadales* compared to wheat.

Principal component analyses were carried out to compare intra-species bacterial genera of the light and heavy DNA of the rhizospheric soil among the plant species (**Figure 4**). As presented in the PCAs, the diversity of bacterial genera clearly separated the community of heavy DNA from that of light DNA in the three rhizospheric soils. This result highlights also that the bacterial communities of light DNA of rhizospheric soils are strongly diversified compared to the communities of heavy DNA. For rhizospheric soil of wheat, the bacterial genera showing a greater abundance in the heavy DNA which were represented by *Cupriavidus* and bacteria from *Polyangiales* (**Figure 4 a**). *Dactylosporangium, Filomicrobium, Geodermatophilus, Janibacter, Noviherbaspirillum* and other genera were found in the light DNA fraction. Regarding rhizospheric soil of faba bean, more significant differences between light and heavy DNA were observed. Indeed, the heavy DNA of faba bean was characterized by bacteria belonging to genera such as *Flavobacterium*, *Noviherbaspirillum*, *Bacillus*, *Candidatus Udaeobacter*, *Chthoniobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* (**Figure 4 b**), while light DNA included genera such as *Aeromicrobium, Haliangium, Ilumatobacter, Lapillicoccus, Pseudonocardia, Terrabacter, Acidothermus, Alsobacter, Amaricoccus* for example. For rhizospheric soil of crimson clover, bacteria belonging to *Geobacter* and *Nitrosomonadaceae* were the most abundant in the heavy DNA fraction compared to the light DNA (**Figure 4 c**), which was characterized by the presence of *Angustibacter*, *Arenimonas*, *Modestobacter*, *Rhodanobacte*r, *Singulisphaera*, *Asticcacaulis*, *Caulobacter*, *Cupriavidus*, *Filomicrobium* for example.

3.3.1. Fungal communities

Fungal community composition was determined by sequencing of the internal transcribed spacer (ITS 2) region of the fungal rRNA gene. Sequencing yielded a total of 1

Table 3. Relative abundance of fungal phyla in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of the rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing

Light DNA			
Fungal phyla	**Wheat**	**Faba bean**	**Crimson clover**
Ascomycota	68.45 ± 14.82 ns	57.83 ± 6.86 ns	57.75 ± 6.98 ns
Basidiomycota	9.6 ± 11.13 ns	8.13 ± 2.93 ns	12.2 ± 11.02 ns
Chytridiomycota	3.33 ± 1.66 ns	4.57 ± 1.44 ns	2.51 ± 1.26 ns
Glomeromycota	**1.07 ± 0.77 b**	**6.16 ± 2.61 a**	**2.84 ± 2.29 ab**
Mortierellomycota	13.27 ± 5.62 ns	14.01 ± 6.22 ns	20.77 ± 7.37 ns
Mucoromycota	0.92 ± 1.37 ns	2.88 ± 2.21 ns	0.87 ± 0.87 ns
Heavy DNA			
Fungal phyla	**Wheat**	**Faba bean**	**Crimson clover**
Ascomycota	57.94 ± 8.3 ns	59.44 ± 3.61 ns	56.62 ± 6.33 ns
Basidiomycota	14.86 ± 10.65 ns	6.76 ± 1.07 ns	12.43 ± 8.19 ns
Chytridiomycota	2.86 ± 1.18 ns	3.61 ± 1.49 ns	2.63 ± 1.32 ns
Glomeromycota	**1.04 ± 0.28 b**	**3.78 ± 1.1 a**	**1.93 ± 0.78 ab**
Mortierellomycota	15.61 ± 4.2 ns	18.61 ± 2.2 ns	19.19 ± 4.87 ns
Mucoromycota	2.04 ± 0.76 ns	3.01 ± 1.03 ns	2.41 ± 1.2 ns

Statistical data are expressed as means ± SD, ($n = 4$). Means in a line followed by different letters (indicated in bold between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). ns : not significant.

Table 4. Relative abundance of fungal genera in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of the rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the rhizospheric soils of plants are presented.

Light DNA			
Fungal genera	**Wheat**	**Faba bean**	**Crimson clover**
Trematosphaeria	0.04 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 b	0.03 ± 0.03 ab
Archaeospora	0.36 ± 0.27 b	2.99 ± 0.90 a	1.52 ± 0.85 ab
Lachnella	0.17 ± 0.06 b	0.77 ± 0.07 a	0.14 ± 0.08 b
Microdochium	0.13 ± 0.08 b	0.13 ± 0.08 b	0.30 ± 0.06 a
Trichocladium	0.08 ± 0.03 b	0.07 ± 0.02 b	0.22 ± 0.04 a
Heavy DNA			
Fungal genera	**Wheat**	**Faba bean**	**Crimson clover**
Archaeospora	0.19 ± 0.29 b	4.05 ± 2.70 a	2.51 ± 2.51 ab

Statistical data are expressed as means ± SD, (n = 4). Means in a line followed by different letters (between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

Table 5. Intra-species comparison of the relative abundance of fungal genera in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of the rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover separatly. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the rhizospheric soils of plants are presented.

Wheat		
	Light DNA	**Heavy DNA**
Ophiosphaerella	0.42 ± 0.11 a	0.06 ± 0.1 b
Ceratocystis	0.22 ± 0.09 a	0.00 ± 0.00 b
Cirrenalia	0.13 ± 0.06 a	0.00 ± 0.00 b
Helvella	0.13 ± 0.04 a	0.00 ± 0.00 b
Lachnella	0.17 ± 0.06 a	0.00 ± 0.00 b
Microdochium	0.13 ± 0.08 a	0.00 ± 0.00 b
Pleurophragmium	0.97 ± 0.17 a	0.14 ± 0.21 b
Pyrenochaetopsis	0.08 ± 0.04 a	0.00 ± 0.00 b
Remispora	0.71 ± 1.00 a	0.00 ± 0.00 b
Rhizopus	0.55 ± 0.2 a	0.00 ± 0.00 b
Trematosphaeria	0.04 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 b
Trichocladium	0.08 ± 0.03 a	0.00 ± 0.00 b
Trichometasphaeria	0.52 ± 0.18 a	0.00 ± 0.00 b
Faba bean		
	Light DNA	**Heavy DNA**
Helvella	0.10 ± 0.02 a	0.00 ± 0.00 b
Microdochium	0.13 ± 0.08 a	0.00 ± 0.00 b
Mycosphaerella	1.00 ± 0.27 b	6.25 ± 2.95 a
Stenella	0.07 ± 0.03 a	0.00 ± 0.00 b
Thielaviopsis	0.38 ± 0.02 b	0.50 ± 0.07 a
Trichocladium	0.07 ± 0.02 a	0.00 ± 0.00 b
unidentified_Clavicipitaceae	0.39 ± 0.08 a	0.02 ± 0.03 b
Crimson clover		
	Light DNA	**Heavy DNA**
Mycosphaerella	1.32 ± 1.44 b	6.00 ± 1.93 a
Trichocladium	0.22 ± 0.04 a	0.05 ± 0.08 b
unidentified_Phaeosphaeriaceae	0.36 ± 0.14 a	0.05 ± 0.08 b
Paraphaeosphaeria	5.65 ± 0.95 a	1.38 ± 1.38 b
unidentified_Spizellomycetales	0.20 ± 0.05 a	0.00 ± 0.00 b

Statistical data are expressed as means ± SD, (n = 4). Means in a line followed by different letters (between light and heavy DNA among plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

645 250 single reads, and their distribution ranged from a minimum of 290 to a maximum of 58 521 reads. The relative abundance of the identified fungal phyla are presented in the **Table 3**.

The major fungal phyla in the light DNA of rhizospheric soils were represented by Ascomycota (on average 60% for the three plant species), Mortierellomycota (16%), Basidiomycota (9%), Chytridiomycota (3%), Mucoromycota (2%). Only the phylum Glomeromycota was significantly different between rhizospheric soils of plant species and was more abundant under faba bean with a 6% relative abundance. Similar variation pattern of relative abundance of fungal phyla was observed for heavy DNA of the rhizospheric soils of plant species. When we consider the plant species separately, for intra-species comparison, no significant difference was observed between light and heavy DNA fractions of all rhizospheric soils (Table S6).

Regarding fungal genera, as for bacteria, only genera showing significant differences are presented (**Table 4**). In light DNA of the rhizospheric soils, legumes (especially faba bean) had higher relative abundances of *Archaeospora* compared to the light DNA of rhizospheric soil of wheat. The genus *Lachnella* was also more abundant in the light DNA of rhizospheric soil of faba bean compared to that of wheat and crimson clover. Conversely, the light DNA of rhizospheric soil of wheat was enriched in the genus *Trematosphaeria* compared to faba bean. The light DNA of rhizospheric soil of crimson clover presented high abundance of *Microdochium* and *Trichocladium*.

The heavy DNA of the rhizospheric soils analysis showed that only one genus called *Archaeospora* varied significantly between plant species. This genus was significantly more abundant for faba bean followed by crimson clover and wheat.

As for bacteria, the intra-species comparison of fungal genera of light and heavy DNA of the rhizospheric soils of plant species showed significant differences in the diversity of several genera (**Table 5**). For rhizospheric soil of wheat, the identified fungal genera were systematically enriched in light DNA in comparison to heavy DNA. These genera included *Ophiosphaerella, Ceratocystis, Cirrenalia, Helvella, Lachnella, Microdochium, Pleurophragmium, Pyrenochaetopsis*. Regarding rhizospheric soil of faba bean, the abundance of some genera such as *Helvella, Microdochium, Stenella* and *Trichocladium* were higher in the light DNA, while the heavy DNA was characterized by the increase of the *Mycosphaerella* and *Thielaviopsis* genera. The rhizospheric soil of crimson clover, presented a marked enrichment with *Trichocladium, Paraphaeosphaeria* and fungi belonging to *Phaeosphaeriaceae* and *Spizellomycetales* in the light DNA fraction. However, only the genus *Mycosphaerella* was strongly abundant in the heavy DNA fraction: .

3.4. Diversity of root microbial communities

3.4.1. Bacterial communities

Root DNA extracts were not submitted to gradient fractionation because it was assumed that extracted DNA was representative of active microorganisms as described in Bressan et al. [38]. The extracted DNA were also analyzed for the bacterial 16S rRNA gene and for the ITS region of fungal gene amplicons by high-throughput sequencing using the Illumina MiSeq. The relative abundance of the identified bacterial phyla and genera are presented in Figure 5.

Regarding bacterial phyla, the DNA of legume roots were strongly and markedly enriched with Proteobacteria. The abundance of this phyla reached 99% for crimson clover, 96% for faba bean, only 61% were showed for wheat (**Figure 5 a**). The other phyla including Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes and Patescibacteria showed too low abundances in the legumes root and the highest abundance values for these phyla were obtained for wheat root (Table S7).

Concerning bacterial genera in root DNA (**Figure 5 b**), the analysis of diversity showed a very high richness in rhizobia-affiliated bacteria, which is not surprising for leguminous species. These *rhizobia* included *Allorhizobium, Neorhizobium, Pararhizobium,*

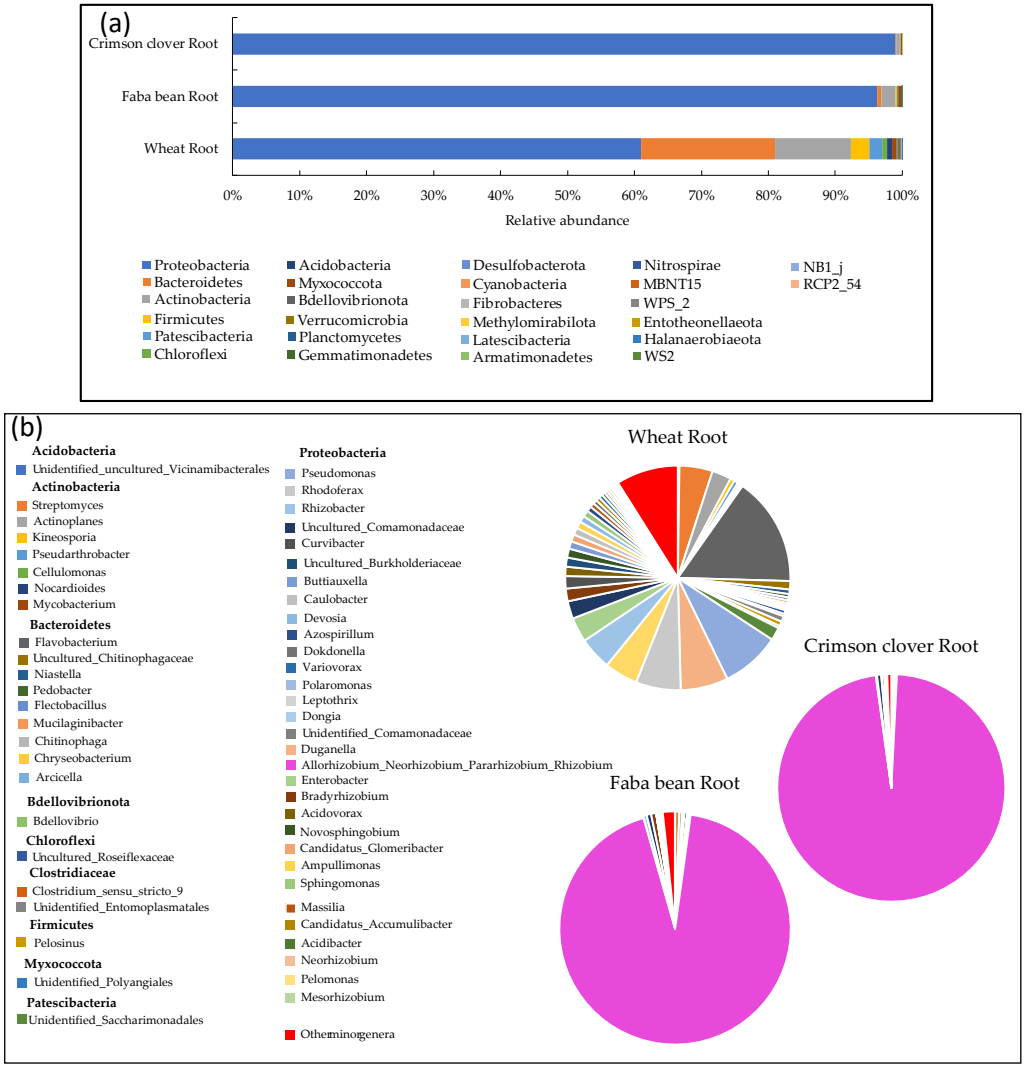


Figure 5. Relative abundance of root bacterial (a) phyla and (b) genera expressed as a percentage of total sequences obtained by Illumina sequencing for wheat, faba bean and crimson clover. Only genera showing significant differences among the roots of the three plant species are presented. Other minor genera correspond to sum of the genera with relatives abundances < 0.2%.

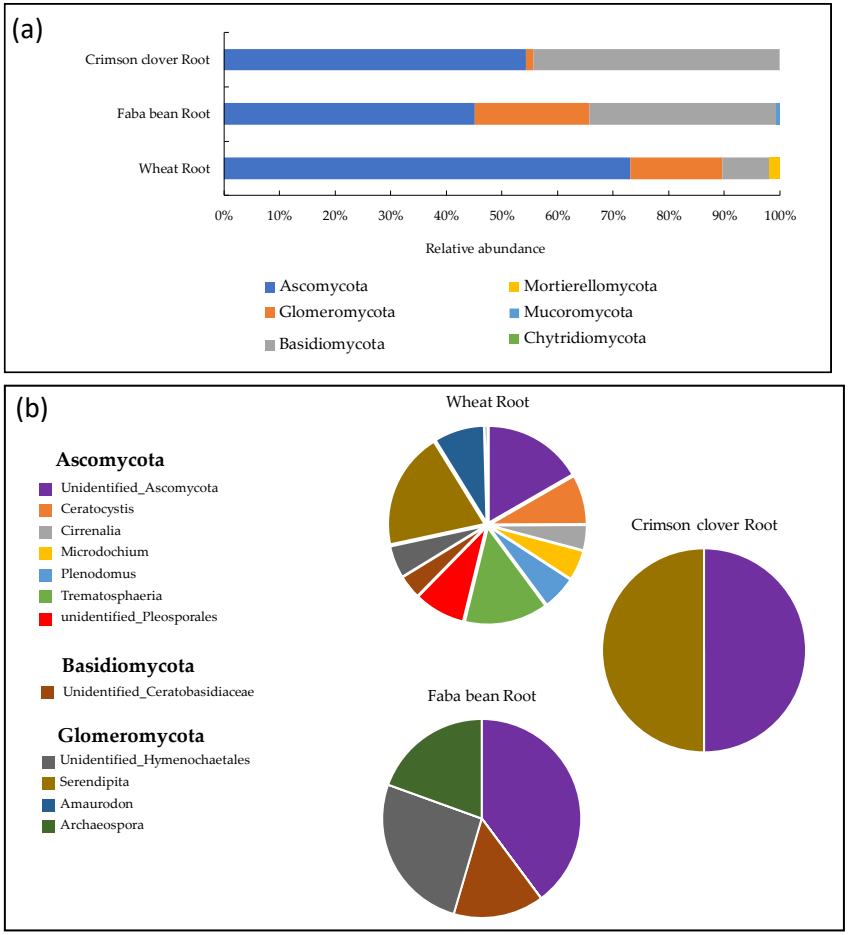


Figure 6. Relative abundance of root fungal (a) phyla and (b) genera expressed as a percentage of total sequences obtained by Illumina sequencing for wheat, faba bean and crimson clover. Only genera showing significant differences among the roots of the three plant species are presented.

and *Rhizobium.* In addition to rhizobia, faba bean root appeared to have significant abundances of some minor genera such as *Methylobacillus* and *Paucibacter* in comparison to crimson clover root. Wheat showed the highly divesified root including several genera such as *Flavobacterium, Pseudomonas, Duganella, Rhodoferax, Streptomyces, Rhizobacter, Enterobacter, Actinoplanes* and *Curvibacter* some of them were not recovered in legumes roots (Table S8).

3.4.2. Fungal communities

The results of the analysis of the diversity of fungal communities in roots are presented in Figure 6. Fungal phyla were mainly represented by Ascomycota, Glomeromycota, Basimycota and Mortierellomycota (**Figure 6 a**). Due to the variability among replicates only Glomeromycota showed significant difference among plants species. Faba bean and wheat roots presented greater abundance of this phylum compared to crimson clover (Table S9).

Regarding fungal genera (**Figure 6 b**), roots of wheat were the most diversified followed by faba bean and then crimson clover. Wheat roots were strongly enriched with genera such as *Amaurodon, Ceratocystis, Cirrenalia, Microdochium, Plenodomus, Trematosphaeria* (Table S10). Roots of faba bean presented the highest relative abundance of *Archaeospora*. Only two genera affiliated to unidentified *Ascomycota and Serendipita* were identified for crimson clover.

3.5. Relationship between plant functional traits and micobial communities structure

In order to better understand the differences in the structure of microbial communities in the rhizosphere of plant species, PCAs integrating plants traits and the bacterial and fungal genera identified in the light and heavy DNA fractions of the rhizospheric soils were performed. Regarding the bacterial genera from the heavy DNA of the rhizospheric soils (**Figure 7**), the high production of dry shoot and root biomass of faba bean was positively associated with the genera *Pseudomonas*, *Noviherbaspirillum* and other bacteria from Actinobacteria, Acidobacteria subgroup 11, *Saccharimonadales* (**Figure 7 a**). Conversely these genera showed a negative relationship with root dry mater content (RDMC). Another trait related to the allocation of biomass between both shoot and root compartments of the plants (shoot:root ratio) was positively related to genera from the *nitrosomonadaceae* and *intrasporangiaceae* which were more abundant in the heavy DNA from the rhizospheric soil of crimson clover. The specific leaf area (SLA) which appeared to be higher for both wheat and crimson clover was associated with genera such as *Streptomyces, Solibrobacter, Gaiella* as well as bacteria from the Chlorofexi and Actinobacteria groups.

Regarding fungal genera (**Figure 7 b**), dry biomass of plant tissues was positively associated with the genus *Achaespora* wich were specific to heavy DNA from the rhizospheric soil of faba bean. A negative relationship was observed between this genus and RDMC.

The same typologies of PCAs were obtained in the light DNA of the rhizospheric soil (Figure S4 and S5).

PCAs were also performed to investigate the relationships between plant traits and root bacterial and fungal diversity (**Figure 8**). For bacterial genera (**Figure 8 a**), bacteria affiliated to rhizobia, which are widely abundant in legume roots, were negatively correlated with RDMC. These bacteria also showed a trend to have a positive relationship with shoot and root dry biomass (greater for faba bean) as well as shoot:root ratio (higher for crimson clover). Other bacteria of the genera *Pseudomonas, Enterobacter, Rhoferax,* more abundant in wheat roots, were positively related to RDMC. At the level of fungal genera (**Figure 8 b**), the same observation was made with genera abundant in wheat roots (*Amaurodon, Ceratocystis, Cirrenalia*). The fungi from *Archaeospora*, *Ascomycota*, were abundant and positively related to biomass production and inversely related to RDMC.

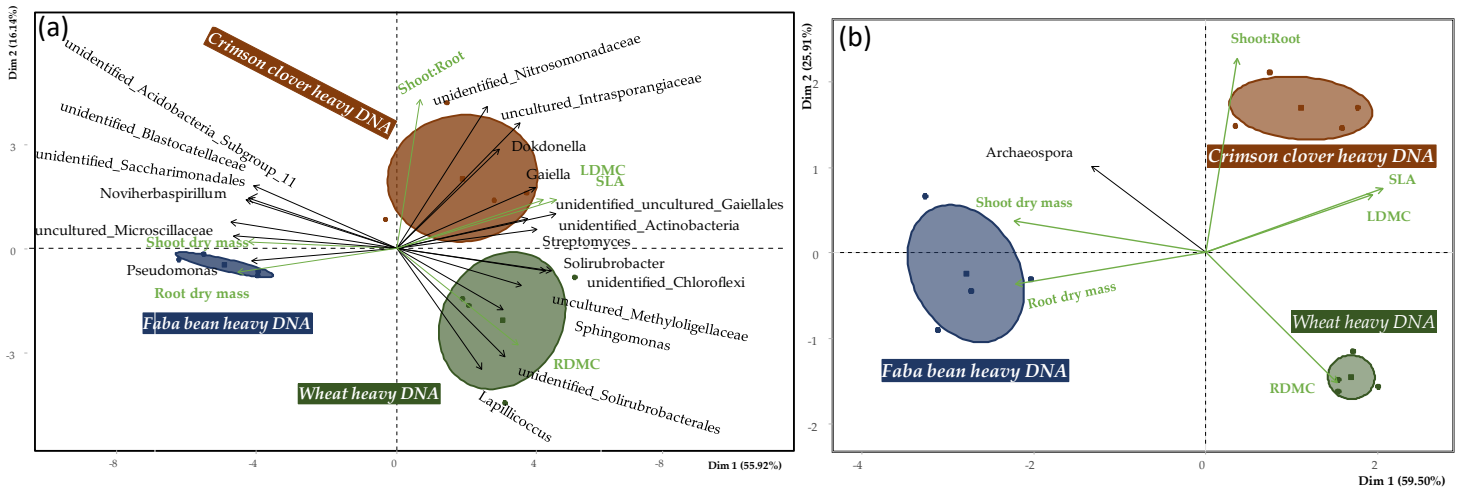


Figure 7. Principal component analyses in the hevay DNA from the rhizospheric soils including plant functional traits and (a) bacterial genera, (b) fungal genera. Only genera showing significant difference are presented.

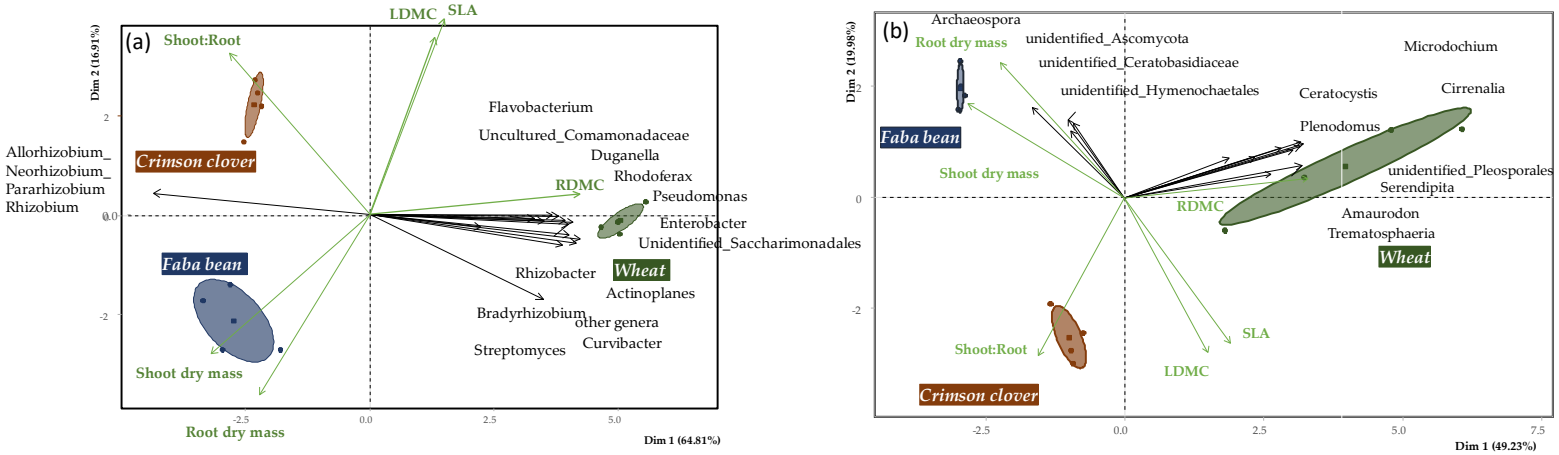


Figure 8. Principal component analyses in the roots of plant species including plant functional traits and (a) bacterial genera, (b)fungal genera. Only genera showing significant difference are presented.

4. Discussion

Carbon flow in the plant-soil system is an important driver of soil ecology as carbon input from plants exudation supports microbial activities, which can increase nutrient availability [59,60]. Therefore, various authors have considered exudation as a key plant functional trait [61,62]. Indeed, plant functional traits defined as morphological and physiological characteristics are studied in relation to many ecosystem processes and services [63]. In this study, we investigated various legumes (faba bean and crimson clover) and non-legume (wheat) species. These species have been previously reported to have contrasting carbon inputs through rhizodeposition, resulting both in contrasting soil enzyme activities profiles and microbial resource limitation [51]. We therefore aimed to characterize the structure of their rhizospheric and root bacterial as well as fungal communities using the DNA- SIP method in relation to their functional traits. The DNA SIP approach allowed us to study the incorporation of plant-exuded ^{13}C into microbial communities. This method allowed us to differentiate microbial communities derived from light DNA (^{12}C DNA) and communities derived from heavy DNA (^{13}C DNA). Due to its higher ^{13}C content, the heavy DNA is considered to be representative of microbial communities actively consuming exuded C [41]. Concerning the light DNA, various authors have reported that this fraction was representative of microbial communities driven by the rhizosphere priming effect and therefore of soil organic matter (SOM) degraders [42,45,64]. As expected in our hypothesis, we observed differences in the diversity of bacterial and fungal communities among both light and heavy DNA fractions of the rhizospheric soils and the roots of the studied plant species.

4.1. Plants influence on rhizopheric bacterial communities

Regarding bacterial communities, in accordance with other studies [39,45,65], both light and heavy DNA of the rhizospheric soils, were enriched with Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Chloroflexi, Germmatimonadetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia which are described as dominant phyla in several agricultural soils [66–68]. As these phyla are known to be involved in the degradation of various carbon-containing compounds and play a crucial role in the soil carbon cycle [69–71], their presence in light DNA as SOM degraders confirms their reported role. Our results showed the influence of plant species on SOM degraders composition in rhizospheric soil. Another phylum, Pastescibacteria was found to be more abundant in the rhizospheric soil of faba bean. This phylum include diverse group of uncultured bacterial taxa with relatively small genome sizes and whose metabolic functions are poorly understood [72,73]. Its presence has already been observed in the rhizosphere of faba bean, wheat and white clover [71-72]. Pastescibacteria has also previously been described as a heterotroph consuming chitin [75]. Therefore, it may be possible that bacteria from *Patescibacteria* benefit of compounds derived from the roots or other microorganisms in the rhizospheric soil.

Concerning heavy DNA of rhizospheric soil accounting for microbial communities actively assimilating root exudates, bacterial phyla were also found to be impacted by plant species. Indeed, Actinobacteria and chloroflexi were more abundant in heavy DNA from rhizospheric soils of wheat and crimson clover. These phyla are reported to contribute to growth and disease resistance [76,77]. Cyanobacteria relative abundance was higher in heavy DNA of faba bean rhizosphere. This phylum includes N-fixing bacteria that can be used as biofertilizers to improve the growth and phenol content of faba bean [78]. The detection of this phylum in the heavy DNA fraction of rhizospheric soil of faba bean implies active consumption of faba bean root-derived compounds by this phylum, which suggest a positive relationship. Our results clearly show that, whatever the plant species, there is a difference in bacterial diversity at the phyla and genera levels (Figure S6) between the light and heavy fractions of the rhizospheric soils.

4.1.1. The intra-species plant comparison of the bacterial phyla derived from light and heavy DNA of rhizospheric soils

A marked effect of faba bean exudates at phyla and genera levels was observed in this study (Table S3). The light DNA was more constituted by the phyla *Actinobacteria*, *Chloroflexi* and *Gemmatimonadetes* whereas some phyla such as *Acidobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes* and *Verrucomicrobia* described as an active bacterial group in the rhizosphere of faba bean [79–81], were strongly enriched in the heavy DNA. At genus level, the light DNA was represented by genera such as *Rubrobacter*, *Aeromicobium*, and *Solirubrobacter*. These genera are known for plant growth promotion as well as being decomposers of lignocellulose and other complex compounds thus playing important roles in the turnover of organic matter in the soil [82,83]. Regarding the heavy DNA fraction, it was characterized by higher abundances of baceria affiliated to *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Flavobacterium* which are also known for their beneficial effect on plant growth and health [84–86].These bacteria are described as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) which produce lytic enzymes such as protease, lipase, cellulase, chitinases and induce in some cases a systemic resistance against phytopathogens [87]. The genera of *Bacillus* and *Pseudomonas* are the well-studied biocontrol agents (BCAs) of several plant pathogens. They also synthesize phytohormones such as, indole-3-acetic acid (IAA) and solubilize inorganic phosphate to promote plant growth [88]. *Noviherbaspirillum* genera known as denitrifing bacteria [89], was also higher in heavy fraction of faba bean. This genus *Noviherbaspirillum* has also been reported to develop resitance against bacterial wilt [90,91] as well as stimulated under a *pseudomonas* inoculation condition suggesting an interaction between these two genera [92]. Other bacteria belonging to the Acidobacteria Subgroup 11, *Blastocatellaceae*, *Myxococcota, Pedosphaeraceae* showed a trend toward greater abundance in the heavy DNA of faba bean rhizosphere. Some of these bacteria are reported to be pathogen resistant [93].

Among the 26 identified phyla in rhizospheric soil of crimson clover, only Desulfobacterota increased significantly in the heavy DNA fraction (Table S3). This phyla includes *Geobacter* genus known as sulfate-reducing bacteria [94,95], which was strongly enriched in this heavy fraction of crimson clover rhizosphere. Supporting our finding, an increase in extracellular arylsulfatase (sulfur cycling enzyme) activity has already been reported in the presence of crimson clover cover [96,97]. These findings therefore confirms a differential community structure actively involved in the utilization of root exudates as previously reported for various plant species [41,45,98]. A second genus belonging to *Nitrosomonadaceae* was also identified as actively consuming exuded C of crimson clover. These bacteria are known as PGPR and ammonia oxidizing bacteria [99,100]. Given that clover is a legume colonized by N-fixing *Rhizobium*, the higher level of this genus in clover rhizosphere is not surprising. Some authors reported also the higher abundance of nitrogen fixation genes under clover [101,102]. A third genus called Cupriavidus was also found to be more abundant in the heavy DNA fraction. Bacteria from the genus *Cupriavidus* are described to synthesize the phytohormone IAA as well as siderophores, solubilize phosphate and tolerant to heavy metals [103–106]. Our results thus showed an increase only in the abundance of *Geobacter, Nitrosomonadaceae* and *Cupriavidus* in heavy DNA fraction compared to the light DNA fraction. However, other genera such a *Dokdonella*, bacteria from the *Gaiellales* and *Intrasporangiaceae* are found to be actively involved in assimilating ^{13}C under crimson clover and known for their implication on carbon cycling [107–109] were identified in light and heavy fraction.

The rhizospheric soil of wheat also showed different bacterial diversity between light and heavy fractions (Table S3). In our study, the assimilation of C sources of wheat exudates favored the development of particular populations related to Betaproteobacteria and Myxococcota. The genera that varied between the two fractions were in most cases lower in the heavy fraction. The light DNA fraction from rhizospheric soil of wheat was characterized by the presence of genera such as *Kitasatospora* and *Cellulomonas* which are known as consumers of the C sources. Reguera and Leschine [110] reported that isolates affiliated to the actinobacterial genus *Cellulomonas* can produce both cellulase and

chitinase, representing a competitive advantage for acquiring C in the soil. Members of this genus were reported to be active in degrading cellulose and cellobiose in soils [52,111,112], indicating that bacteria affiliated to this genus might be crucial in SOM degradation. *Kitasatospora* are known to be cellulolytic bacteria [113] but they have not been or poorly documented before. Found in the heavy DNA fraction, bacteria sassociated with *Cupriavidus* and *Polyangiales* genera could be characterized as active consumers of the C exudates of wheat sources. Bacteria from the the polyangiales are characterized as having the potential for denitrification, aromatic hydrocarbon degradation, aerobic methylotrophy, and hydrogenotrophic respiration [114]. The heavy fraction also included the genus *Sphingomonas* described as nitrogen fixing bacteria, PGPR and involved in pathogen biocontrol [77,115,116]. Other bacteria from *Methyloligellaceae*, *Chloroflexi* and *Solirubrobacterales* (oxidizing CH_4 and growth promoting bacteria [77]) were also associated with the heavy DNA from wheat rhizospheric soil. Our findings indicate an effect of root exudate on bacterial diversity of rhizospheric soil of wheat while no effect was reported in the work conducted by Haichar et al. [42]. These authors observed similar profiles between heavy and light DNA fractions from rhizospheric soil of wheat using denaturing gradient gel electrophoresis. They explained the similarities observed between the light and the heavy DNA fractions by the fact that some slow growing bacteria may be recovered in the light fraction, although they assimilate root exudates, because they have not yet divided.

When comparing the bacterial diversity of rhizospheric soils, it was found that the exudates of different plants did not influence the same bacterial familly, genera and species. The intra-species comparison of bacterial diversity between light and heavy DNA of rhizospheric soils demonstrates that faba bean exudates allowed the recruitment of a large and diversified active bacterial communities compared to crimson clover and wheat. Among the 358 bacterial genera detected in the rhizospheric soils, 18 genera were significantly higher in the heavy fraction of faba bean, 3 genus for crimson clover and 2 genera for wheat. These findings confirmed that a small fraction of bacterial comunities are active in rhizospheric soils [117].

4.2. Plants influence on rhizopheric fungal communities

The major fungal phyla found in the rhizospheric soils were Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Mortierellomycota and Mucoromycota regardless of plant species and the DNA fractions (light and heavy). These phyla have already been reported in the rhizosphere and described as involved in the degradation of organic compounds or in the decomposition of crop residues [58,118,119]. Moreover, fungi, such as the Ascomycota, are considered as key players in the decomposition of SOM due to their ability to produce a wide range of extracellular enzymes, allowing them to effectively degrad the recalcitrant lignocellulosic components [118,120]. In both SOM degraders (light DNA) and active exudate consummers (heavy DNA), the Glomeromycota was the sole phylum that varied significantly between the two DNA fraction and between plant species. The Glomeromycota phylum include the genus *Archaeospora* and the abundances of both phylum and generas varied in the same way in rhizospheric soils: faba bean > crimson clover > wheat. This phylum is known to harbor mycorhizal fungi and *Archaeospora* genus is one of them [98,121]. In contrast to the bacterial communities, the intra-species comparison of fungal phyla derived from light and heavy DNA showed no significant difference. This can be explained by the possible crossfeeding between microorganisms that can be observed with continuous labeling approach [64].

4.2.1. The intra-species plant comparison of light and heavy DNA of rhizospheric soils

At genus level, SOM degraders derived from light DNA of faba bean rhizospheric soil presented higher relative abundance of *Helvella, Microdochium, unidentified* and *Clavicipitaceae*. The genus *Helvella* has already been described as mycorrhizal fungus and to produce extracellular ligninolytic enzymes [122,123]. Fungi of the genus *Microdochium*

are described as having the potential for amylase, cellulase, polyphenol oxidase and gelatinase activities [124]. Concerning *Clavicipitaceae* some fungi belonging to this group are reported to produce extracellular lipases [125] as well as being endophytically associated with grasses as biotrophic symbionts [126]. The heavy DNA consisted more of the genus *Mycosphaerella*. The presence of *Mycosphaerella* in the rhizosphere of faba bean is surprising as this genus is reported to harbors differents plant pathogen such as, the fungus *Mycosphaerella graminicola* that causes septoria (leaf) spot of wheat [127]. . The presence of this genus may also be related to the flax crop existing when the soil was sampled for this study. Indeed the fungus *Mycosphaerella linicola* are reported to be flax pathogen [128].

The rhizospheric soil of crimson clover was characterized by the presence of *Paraphaeosphaeria, Trichocladium, unidentified Spizellomycetales* in the two fractions with higher abundance in the light fraction (SOM degraders). *Paraphaeosphaeria* genus includes plant pathogens or biocontrol agents, as well as bioremediators and endophytic fungi [129]. The genus *Trichocladium* is reported to be involve in lignocellulose degradation [130]. Fungi belonging to the *Spizellomycetales* are mainly saprophytic and can use a wide range of organic materials in their nutrition, including cellulose, chitin and keratin [131,132]. As observed for rhizospheric soil of faba bean, only the genus *Mycosphaerella* showed a trend towards higher abundance in heavy DNA of rhizospheric soil of crimson clover.

Several genera were detected in rhizospheric soil of wheat with a higher abundance in the light fraction such as *Ceratocystis, Pyrenochaetopsis, Rhizopus.* The genus *Ceratocystis* harbors a large number of fungi pathogenic for a wide range of economically important plants such as cocoa and mango with abilities to produce cellulolytic and xylanolytic enzymes [133–135]. The fungal genus *Pyrenochaetopsis* has received special attention because of its different living patterns, such as various phytopathogenic, saprophytic and endophytic species as well as their potential peptidase activity [136–138]. In contrast, *Rhizopus* fungi, are reported as plant growth promoting endophytes with potential peroxidase activity [139,140]. Thus these genera have various capacities to produce enzymes degrading complex compounds, which may explain their abundance in the light fraction of the DNA. For wheat no fungal genus stood out in the heavy fraction of the rhizospheric soil.

In our study, both bacterial and fungal communities were significantly influenced by plant root exudats. This effect was strongly marked for bacterial diversity than for fungi. This observation support the idea reported by literature, showing that a high proportion of fungi were less randomly distributed than bacteria in soils, suggesting that fungi have more specific habitat and resources requirements in comparison to bacteria [141,142].

4.3. Root Microbial communities

As shown in other studies, the structure of microbial community of plant roots differs from that of soil rhizosphere because the microbes reaching the roots follow a specific colonization process [6,39,143]. Indeed, regarding bacterial plyla, legume roots were largely dominated by Proteobacteria. The major phyla of wheat root were Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes. If the overal profile of bacterial diversity was close between legume roots, the bacterial community structure of roots differed between plant species. These phyla include some genera that are known to pomote plant growth and to suppress diseases [76,98]. At the genus level, legume roots DNA (faba bean and crimson clover) were enriched by genera including nitrogen fixing bacteria, PGPR and bacteria with potential biocontrol action such as *Allorhizobium, Neorhizobium, Pararhizobium, Rhizobium* and other minor genera represented by *Methylobacillus* and *Paucibacter* [144,145]. Indeed, the symbiotic interaction between rhizobia and legumes is known to lead to the release of various phytohormones, such as IAA, gibberellins, ethylene, cytokinins, that can directly or indirectly stimulate plant growth [146,147]. N_2-fixing rhizobia have also been reported to promote plant growth by

solubilizing P in the rhizosphere, to improve plant Fe nutrition, to chelate heavy metals and as biocontrol agents against diseases [145,148–150]. Thus, a high dominance of these bacteria in the roots of legumes is associated with a wide range of functions. For wheat root, genera such as *Flavobacterium, Pseudomonas, Rhodoferax, Streptomyces, Rhizobacter, Actinoplanes*, were found to be more abundant. These genera are also described as PGPR and potential biocontrol [98].

Concerning fungi, as observed for rhizospheric soils Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Mortierellomycota and Mucoromycota phyla were identified in plant roots. As for soils, only the endophytic mycorrhizal Glomeremycota phylum varied between plant species with the highest abundance obtained for faba bean. Faba bean presented the highest relative abundance of *Archaeospora* within the roots, as observed in rhizospheric soils. This genus *Archaeospora* is from the phylum Glomeromycota largely reported for their association to a wide range of plant as arbuscular mycorrhizae and known to promote plant growth [118,151,152]. Some *Achaeospora* species are reported to improve plant nutrient uptake and resistance to disease and insect pests [153–155]. The root DNA of crimson clover presented lower abundances for most of the identified genera compared to the other plant species. It can be hypothesize that this difference is due to the composition of root exudate, as it has been previously reported that a plant with a wide range of exuded compounds can lead to the recruitment of more diverse mycorrhizal fungi [118,156]. In the case of wheat root, high abundances of some mycorrhizal genera such as *Hymenochaetales* and *Serendipita* were observed. These fungi are known as endophytic symbiont with the capabilities to enhance plant growth and confer resistance to different stresses [118,157–159].

4.4. Relationship between bacterial, fungal diversity and plant traits

Some authors indicate that the identified microorganisms by rhizospheric stable isotope probing can be separated into two categories according to their localization (light and heavy DNA as well as roots) and among plant species [45,115]. A first category consists of generalists, which are widely distributed among plants and represent the basic microbiota of each fraction. The second category consists of specialists, which are locally abundant in a fraction depending on the plants species. In our study, in overall, the influence of faba bean on rhizosphere microorganisms was greater than that of other species. To explain the differences observed, we related the measured functional traits to the abundances of bacterial as well as fungal genera actively related to root exudates assimilation in a principal component analysis. The relative abundance of the genera, *Pseudomonas, Noviherbaspirillum* and bacteria belonging to *Acidobacteriota*_Subgroup_1, *Blastocatellaceae, Saccharimonadales* and *Actinobacteria* were positively correlated with shoot and root dry biomass. Faba bean that produced the most biomass had a higher abundance of these genera. This positive relationship is consistent with the PGPR function of the genus *Pseudomonas* as well as those from *Actinobacteria* and *Acidobacteria* previously mentioned. Guyonnet et al. [45] have already reported with grassland species that fast growing species have greater influence on soil microorganisms. Other interesting correlation have bean observed between plant specific leaf area (SLA) and the genera such as *streptomyces, solirubrobacter* and bacteria belonging to *chloroflexi*, *Nitrosomonadaceae* and *Intrasporangiaceae*. Crimson clover and wheat with their higher SLA and optimizing leaf area for C fixation have presented higher abundance of theses genera. High SLA have bean previously reported to be related to high soil N availability and also to increasing plant N uptake [156,157]. In addition, SLA were also associated with soil microbial community composition as well as C and N cycling in soils [158,159]. The genus *Streptomyces* (known as PGPR) has been previously associated to enhancing soil total nitrogen, available phosphorus and organic in soil [160]. Thus, these observations are in accordance with the increased abundance of this genus for wheat and crimson clover with a high SLA.

Another interesting correlation concerns the root dry mater content (RDMC) reported to be related to root decomposability (negatively correlated to fine root decompositon [161]). Genera belonging to the *Microscillaceae, Saccharimonadales*

Blastocatellaceae or Acidobacteria subgroup 11 were found to be inversely related to RDMC (pearson correlation $p < 0.05$, Table S11). These bacterial groups were associated with faba bean having low RDMC. In support of these observations, *Saccharimonadales* and Acidobacteria are known to degrade organic compounds and crop residues [58,99,166]. Moreover, according to Robson et al. [167] soils with high N availability are often characterized by low RDMC plant communities and high N turnover rates (e.g., high nitrification rate and nitrifier abundance). Thus in addition to being an indicator of root tissue decomposability, RDMC is often associated with nutrient availability in the soil. Indeed, high nitrogen and phosphorus acquisition by the plant is inversely associated with RDMC [168]. Consistent with these observations, some bacteria of the family *Blastocatellaceae* have been reported to be active in soil N metabolism, nutrient solubilization and plant growth [169–171]. The same interpretation can be associated with crimson clover which also showed a low RDMC with a higher abundance of bacteria from *Nitrosomonadaceae* group known to be involved in N cycling in soil (amonia oxiding bacteria). It is also noteworthy that *Nitrosomodaceae* as well as *Intrasporangiaceae* (potential PGPR) were positively associated with the shoot : root ratio (pearson correlation $r = 0.72$ and $r = 0.60$ respectively $p < 0.05$, Table S11). Since crimson clover has the highest shoot:root ratio, the high biomass allocation to the shoot may be explained by growth promotion by these bacterial groups.

Regarding fungal genera, the only arbuscular mycorrhizal fungi *Archaeospora* was positevely related to shoot dry biomass ($r = 0.58$, $p < 0.05$). Faba bean produced the highest biomass of shoots, This genus appears to have contributed to biomass production as arbuscular mycorrhizal fungi are known to promote plant growth [118,172].

For root microbial communities, the high legume biomass and the high shoot:root ratio were positively related to the large abundance of nitrogen fixing rhizobacteria as well as for arbuscular mycorrhizal fungi described as PGPR and pathogen resistant microbes [148,173]. The microbial communities of wheat roots were distinguished with the high RDMC of this plant. The influences of the various plant species studied on the structure of microbial communities can thus be attributed to the plant traits expressed during their growth.

5. Conclusions

This study confirms that in addition to influencing the activities of microorganisms differently, a contrasting rhizodeposition capacity between plant species leads to a different structure of microbial communities. Indeed, we observed that beyond a common microbial community in different rhizospheric soils, some microorganisms are specifically more abundant in the rhizosphere of some plant species. Among the species studied, faba bean produced more root biomass and was found to have a strong effect on the composition of microorganisms between SOM degraders (light ^{12}C DNA) and active consumers of root exudates (heavy ^{13}C DNA). This study showed also that microbial rhizospheric functions are performed not by the whole community but rather by a small active fraction of a community.

At the root level, the particular function of legumes for nitrogen fixation was characterized by a widespread abundance of symbiotic rhizobacteria. The use of functional traits also provided further explanations for the observed differences. In particular, biomass production and allocation between plant compartments, specific leaf area and root dry matter content were associated with specific microbial communities. Therefore, it would be interesting to investigate the composition and the quality of the compounds exuded by the plant species, to better understand the role of root exudates as drivers of rhizosphere microbial community assembly.

Supplementary Materials: Figure S1. (a) The quantitative distribution of the bacterial 16S rRNA of E.coli growth in the presence of LB medium supplemented by 1 g of ^{13}C glucose (99 atm%) and Bacillus subtilis growth on unlabeled LB medium (b) Corresponding delta ^{13}C among the different fractions; **Figure S2.** Incorporation of ^{13}C-root exudates into

microbial community DNA derived from the RAS of faba bean plants after 10 days of $^{13}CO_2$ labeling (fraction 1 – 14). ^{12}C (light) and ^{13}C (heavy) DNA were separated by CsCl density gradient centrifugation; **Figure S3.** Incorporation of ^{13}C-root exudates into microbial community DNA derived from the RAS of wheat plants after 10 days of $^{13}CO_2$ labeling (fraction 1 – 14). ^{12}C (light) and ^{13}C (heavy) DNA were separated by CsCl density gradient centrifugation; **Figure S4.** Principal component analyses in the light DNA of the rhizospheric soils including plant functional traits and bacterial genera. Only genera showing significant difference are presented; **Figure S5.** Principal component analyses in the light DNA of the rhizospheric soils including plant functional traits and fungal genera. Only genera showing significant difference are presented; **Figure S6.** Principal Component Analysis generated from matrices of bacterial OTUs relative abundances obtained by Illumina sequencing; **Table S1.** Relative abundance of bacterial phyla in the light DNA (^{12}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover; **Table S2.** Relative abundance of bacterial phyla in the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover; **Table S3.** Intra-species comparison of the relative abundance of bacterial phyla in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover separatly; **Table S4.** Relative abundance of bacterial genera in the light DNA (^{12}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover; **Table S5.** Relative abundance of bacterial genera in the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover; **Table S6.** Intra-species comparison of the relative abundance of fungal phyla in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover separatly; **Table S7.** Relative abundance of bacterial phyla in root of plant species; **Table S8.** Relative abundance of bacterial genera in root of plant species; **Table S9.** Relative abundance of fungal phyla in root of plant species; **Table S10.** Relative abundance of fungal genera in root of plant species; **Table S11.** Pearson correlation showing the relations between plant functional traits and bacterial as well as fungal genera from heavy DNA.

Author Contributions: M.K.: experiment execution, data analysis, presentation of results and original draft manuscript preparation; I.T.-G.: identification of the research topic, resources, review and supervision. M.B.: contribution to DNA SIP design and results analyses; Q.D.: contribution to the fine tuning and performing of IRMS analyses; J.-B.C.: identification of the research topic, study design, C rhizodeposition and plants functional traits analyses, review and supervision; W.R.-A.: contribution to original draft manuscript preparation, review and editing; 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 RhizoComm and BEER projects.

Data Availability Statement: The data presented here are part of the results of a Ph.D. thesis and will be available after 2023.

Acknowledgments: We are grateful to all the technical staff of UMR EVA and AGHYLE UniLaSalle-Rouen laboratory for technical assistance. We also thank the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the element and isotope analysis used in this study. We are grateful to Elodie CUSSET, , for contributing to statistical analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. Annu Rev Plant Biol 2006, 57, 233–266, doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159.

2. Hartmann, A.; Schmid, M.; Tuinen, D. van; Berg, G. Plant-Driven Selection of Microbes. Plant and Soil 2009, 321, 235–257, doi:10.1007/s11104-008-9814-y.

3. Kuzyakov, Y.; Razavi, B.S. Rhizosphere Size and Shape: Temporal Dynamics and Spatial Stationarity. Soil Biology and Biochemistry 2019, 135, 343–360, doi:10.1016/j.soilbio.2019.05.011.

4. Mimmo, T.; Pii, Y.; Valentinuzzi, F.; Astolfi, S.; Lehto, N.; Robinson, B.; Brunetto, G.; Terzano, R.; Cesco, S. Nutrient Availability in the Rhizosphere: A Review. Acta Horticulturae 2018, 13–28, doi:10.17660/ActaHortic.2018.1217.2.

5. Ling, N.; Wang, T.; Kuzyakov, Y. Rhizosphere Bacteriome Structure and Functions. Nat Commun 2022, 13, 836, doi:10.1038/s41467-022-28448-9.

6. Reinhold-Hurek, B.; Bünger, W.; Burbano, C.S.; Sabale, M.; Hurek, T. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. Annual Review of Phytopathology 2015, 53, 403–424, doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102342.

7. Taulé, C.; Vaz-Jauri, P.; Battistoni, F. Insights into the Early Stages of Plant–Endophytic Bacteria Interaction. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2021, 37, 1–9.

8. Vandana, U.K.; Rajkumari, J.; Singha, L.P.; Satish, L.; Alavilli, H.; Sudheer, P.D.V.N.; Chauhan, S.; Ratnala, R.; Satturu, V.; Mazumder, P.B.; et al. The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. Biology 2021, 10, 101, doi:10.3390/biology10020101.

9. Berendsen, R.L.; Pieterse, C.M.J.; Bakker, P.A.H.M. The Rhizosphere Microbiome and Plant Health. Trends in Plant Science 2012, 17, 478–486, doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.

10. Mendes, R.; Garbeva, P.; Raaijmakers, J.M. The Rhizosphere Microbiome: Significance of Plant Beneficial, Plant Pathogenic, and Human Pathogenic Microorganisms. FEMS Microbiology Reviews 2013, 37, 634–663, doi:10.1111/1574-6976.12028.

11. Tian, T.; Reverdy, A.; She, Q.; Sun, B.; Chai, Y. The Role of Rhizodeposits in Shaping Rhizomicrobiome. Environmental Microbiology Reports 2020, 12, 160–172.

12. Nguyen, C. Rhizodeposition of Organic C by Plants: Mechanisms and Controls. Agronomie 2003, 23, 375–396, doi:10.1051/agro:2003011.

13. Dennis, P.G.; Miller, A.J.; Hirsch, P.R. Are Root Exudates More Important than Other Sources of Rhizodeposits in Structuring Rhizosphere Bacterial Communities?: Root Exudates and Rhizosphere Bacteria. FEMS Microbiology Ecology 2010, 72, 313–327, doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x.

14. Jones, D.L.; Hodge, A.; Kuzyakov, Y. Plant and Mycorrhizal Regulation of Rhizodeposition. New Phytologist 2004, 163, 459–480, doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x.

15. Mimmo, T.; Hann, S.; Jaitz, L.; Cesco, S.; Gessa, C.E.; Puschenreiter, M. Time and Substrate Dependent Exudation of Carboxylates by Lupinus Albus L. and Brassica Napus L. Plant Physiology and Biochemistry 2011, 49, 1272–1278.

16. Benizri, E.; Nguyen, C.; Piutti, S.; Slezack-Deschaumes, S.; Philippot, L. Additions of Maize Root Mucilage to Soil Changed the Structure of the Bacterial Community. Soil biology and biochemistry 2007, 39, 1230–1233.

17. Zelenev, V.V.; Van Bruggen, A.H.C.; Semenov, A.M. Short-Term Wavelike Dynamics of Bacterial Populations in Response to Nutrient Input from Fresh Plant Residues. Microbial Ecology 2005, 49, 83–93.

18. Weller, D.M.; Thomashow, L.S. Current Challenges in Introducing Beneficial Microorganisms into the Rhizosphere. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs 1994, 1–18.

19. Tikhonovich, I.A.; Provorov, N.A. Chapter 14 - Beneficial Plant–Microbe Interactions. In Comprehensive and Molecular Phytopathology; Dyakov, Yu.T., Dzhavakhiya, V.G., Korpela, T., Eds.; Studies in Plant Science; Elsevier: Amsterdam, 2007; pp. 365–420.

20. Goh, C.-H.; Veliz Vallejos, D.F.; Nicotra, A.B.; Mathesius, U. The Impact of Beneficial Plant-Associated Microbes on Plant Phenotypic Plasticity. J Chem Ecol 2013, 39, 826–839, doi:10.1007/s10886-013-0326-8.

21. Verma, P.; Yadav, A.N.; Kumar, V.; Singh, D.P.; Saxena, A.K. Beneficial Plant-Microbes Interactions: Biodiversity of Microbes from Diverse Extreme Environments and Its Impact for Crop Improvement. In Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts; Singh, D.P., Singh, H.B., Prabha, R., Eds.; Springer: Singapore, 2017; pp. 543–580 ISBN 978-981-10-6593-4.

22. Long, S.R. Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis. Plant Physiology 2001, 125, 69–72, doi:10.1104/pp.125.1.69.

23. Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Abubaker, J.; Jun, J.; Allen, J.W.; Brouillette, J.; Douds, D.D.; Lammers, P.J.; Shachar-Hill, Y. Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as Well as Lipid. Plant physiology 2003, 131, 1496–1507.

24. Mbengue, M.D.; Hervé, C.; Debellé, F. Chapter One - Nod Factor Signaling in Symbiotic Nodulation. In Advances in Botanical Research; Frendo, P., Frugier, F., Masson-Boivin, C., Eds.; Regulation of Nitrogen-Fixing Symbioses in Legumes; Academic Press, 2020; Vol. 94, pp. 1–39.

25. Basu, S.; Kumar, G.; Chhabra, S.; Prasad, R. Chapter 13 - Role of Soil Microbes in Biogeochemical Cycle for Enhancing Soil Fertility. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering; Verma, J.P., Macdonald, C.A., Gupta, V.K., Podile, A.R., Eds.; Elsevier, 2021; pp. 149–157 ISBN 978-0-444-64325-4.

26. Schirawski, J.; Perlin, M.H. Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. International Journal of Molecular Sciences 2018, 19, 1374, doi:10.3390/ijms19051374.

27. Vives-Peris, V.; de Ollas, C.; Gómez-Cadenas, A.; Pérez-Clemente, R.M. Root Exudates: From Plant to Rhizosphere and Beyond. Plant Cell Rep 2020, 39, 3–17, doi:10.1007/s00299-019-02447-5.

28. Lambers, H.; Mougel, C.; Jaillard, B.; Hinsinger, P. Plant-Microbe-Soil Interactions in the Rhizosphere: An Evolutionary Perspective. Plant Soil 2009, 321, 83–115, doi:10.1007/s11104-009-0042-x.

29. Pathma, J.; Raman, G.; Kennedy, R.K.; Bhushan, L.S. Recent Advances in Plant-Microbe Interaction. In Microbial Diversity, Interventions and Scope; Sharma, S.G., Sharma, N.R., Sharma, M., Eds.; Springer: Singapore, 2020; pp. 23–49 ISBN 9789811540998.

30. Pausch, J.; Kuzyakov, Y. Carbon Input by Roots into the Soil: Quantification of Rhizodeposition from Root to Ecosystem Scale. Global Change Biology 2017, 24, 1–12, doi:10.1111/gcb.13850.

31. Blagodatskaya, E.V.; Blagodatsky, S.A.; Anderson, T.-H.; Kuzyakov, Y. Contrasting Effects of Glucose, Living Roots and Maize Straw on Microbial Growth Kinetics and Substrate Availability in Soil. European Journal of Soil Science 2009, 60, 186–197, doi:10.1111/j.1365-2389.2008.01103.x.

32. Bakker, P.A.H.M.; Berendsen, R.L.; Doornbos, R.F.; Wintermans, P.C.A.; Pieterse, C.M.J. The Rhizosphere Revisited: Root Microbiomics. Front. Plant Sci. 2013, 4, doi:10.3389/fpls.2013.00165.

33. Steinauer, K.; Chatzinotas, A.; Eisenhauer, N. Root Exudate Cocktails: The Link between Plant Diversity and Soil Microorganisms? Ecology and Evolution 2016, 6, 7387–7396, doi:10.1002/ece3.2454.

34. Siczek, A.; Frąc, M.; Kalembasa, S.; Kalembasa, D. Soil Microbial Activity of Faba Bean (Vicia Faba L.) and Wheat (Triticum Aestivum L.) Rhizosphere during Growing Season. Applied Soil Ecology 2018, 130, 34–39, doi:10.1016/j.apsoil.2018.05.012.

35. Siczek, A.; Lipiec, J. Impact of Faba Bean-Seed Rhizobial Inoculation on Microbial Activity in the Rhizosphere Soil during Growing Season. International Journal of Molecular Sciences 2016, 17, 784, doi:10.3390/ijms17050784.

36. Griffiths, R.I.; Manefield, M.; Ostle, N.; McNamara, N.; O'Donnell, A.G.; Bailey, M.J.; Whiteley, A.S. 13CO2 Pulse Labelling of Plants in Tandem with Stable Isotope Probing: Methodological Considerations for Examining Microbial Function in the Rhizosphere. Journal of Microbiological Methods 2004, 58, 119–129, doi:10.1016/j.mimet.2004.03.011.

37. Dumont, M.G.; Murrell, J.C. Stable Isotope Probing — Linking Microbial Identity to Function. Nature Reviews Microbiology 2005, 3, 499–504, doi:10.1038/nrmicro1162.

38. Bressan, M.; Roncato, M.-A.; Bellvert, F.; Comte, G.; Haichar, F. el Z.; Achouak, W.; Berge, O. Exogenous Glucosinolate Produced by Arabidopsis Thaliana Has an Impact on Microbes in the Rhizosphere and Plant Roots. The ISME Journal 2009, 3, 1243–1257, doi:10.1038/ismej.2009.68.

39. Gkarmiri, K.; Mahmood, S.; Ekblad, A.; Alström, S.; Högberg, N.; Finlay, R. Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere Soil of Oilseed Rape. Applied and Environmental Microbiology 2017, 83, doi:10.1128/AEM.01938-17.

40. Dunford, E.A.; Neufeld, J.D. DNA Stable-Isotope Probing (DNA-SIP). Journal of Visualized Experiments 2010, doi:10.3791/2027.

41. Vandenkoornhuyse, P.; Mahé, S.; Ineson, P.; Staddon, P.; Ostle, N.; Cliquet, J.-B.; Francez, A.-J.; Fitter, A.H.; Young, J.P.W. Active Root-Inhabiting Microbes Identified by Rapid Incorporation of Plant-Derived Carbon into RNA. PNAS 2007, 104, 16970–16975, doi:10.1073/pnas.0705902104.

42. Haichar, F. el Z.; Marol, C.; Berge, O.; Rangel-Castro, J.I.; Prosser, J.I.; Balesdent, J.; Heulin, T.; Achouak, W. Plant Host Habitat and Root Exudates Shape Soil Bacterial Community Structure. The ISME Journal 2008, 2, 1221–1230, doi:10.1038/ismej.2008.80.

43. Lee, C.G.; Watanabe, T.; Sato, Y.; Murase, J.; Asakawa, S.; Kimura, M. Bacterial Populations Assimilating Carbon from 13C-Labeled Plant Residue in Soil: Analysis by a DNA-SIP Approach. Soil Biology and Biochemistry 2011, 43, 814–822, doi:10.1016/j.soilbio.2010.12.016.

44. Guo, T.; Zhang, Q.; Ai, C.; Liang, G.; He, P.; Lei, Q.; Zhou, W. Analysis of Microbial Utilization of Rice Straw in Paddy Soil Using a DNA-SIP Approach. Soil Science Society of America Journal 2020, 84, 99–114.

45. Guyonnet, J.P.; Guillemet, M.; Dubost, A.; Simon, L.; Ortet, P.; Barakat, M.; Heulin, T.; Achouak, W.; Haichar, F. el Z. Plant Nutrient Resource Use Strategies Shape Active Rhizosphere Microbiota Through Root Exudation. Frontiers in Plant Science 2018, 9, doi:10.3389/fpls.2018.01662.

46. Carof, M.; Laperche, A.; Cannavo, P.; Menasseri, S.; Godinot, O.; Jubault, M.; Manzanares-Dauleux, M.; Guénon, R.; Jaffrezic, A.; Pérès, G.; et al. Valorisation Des Interactions Plante-Sol Pour La Nutrition et La Santé Des Plantes. 2018, 69, 71–82, doi:10.15454/D8RT59.

47. Cellier, P.; Schneider, A.; Thiebeau, P.; Vertes, F. Impacts Environnementaux de l'introduction de Légumineuses Dans Les Systèmes de Production; 2015;

48. Altobelli, F.; Benedetti, A.; Calles, T.; Caon, L.; Charrondiere, R.; Gri Shiv, P.; Grande, F.; Muthuraman, R.P.; Pisante, M.; Pramar, B.; et al. Soils and Pulses: Symbiosis for Life - World Available online: https://reliefweb.int/report/world/soils-and-pulses-symbiosis-life (accessed on 17 September 2020).

49. Voisin, A.-S.; Nicolardot, B.; Cellier, P.; Jeuffroy, M.-H. Les services écosystémiques rendus par les légumineuses vis-à-vis du cycle de l'azote.; March 16 2017; p. 4 p.

50. Meena, B.L.; Fagodiya, R.K.; Prajapat, K.; Dotaniya, M.L.; Kaledhonkar, M.J.; Sharma, P.C.; Meena, R.S.; Mitran, T.; Kumar, S. Legume Green Manuring: An Option for Soil Sustainability. In Legumes for Soil Health and Sustainable Management; Meena, R.S., Das, A., Yadav, G.S., Lal, R., Eds.; Springer: Singapore, 2018; pp. 387–408 ISBN 9789811302534.

51. Kanté, M.; Riah-Anglet, W.; Cliquet, J.-B.; Trinsoutrot-Gattin, I. Soil Enzyme Activity and Stoichiometry: Linking Soil Microorganism Resource Requirement and Legume Carbon Rhizodeposition. Agronomy 2021, 11, 2131, doi:10.3390/agronomy11112131.

52. Haichar, F.; Achouak, W.; Christen, R.; Heulin, T.; Marol, C.; Marais, M.-F.; Mougel, C.; Ranjard, L.; Balesdent, J.; Berge, O. Identification of Cellulolytic Bacteria in Soil by Stable Isotope Probing. Environmental Microbiology 2007, 9, 625–634, doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01182.x.

53. Haichar, F. el Z.; Roncato, M.-A.; Achouak, W. Stable Isotope Probing of Bacterial Community Structure and Gene Expression in the Rhizosphere of Arabidopsis Thaliana. FEMS Microbiology Ecology 2012, 81, 291–302, doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01345.x.

54. Miran, W.; Jang, J.; Nawaz, M.; Shahzad, A.; Jeong, S.E.; Jeon, C.O.; Lee, D.S. Mixed Sulfate-Reducing Bacteria-Enriched Microbial Fuel Cells for the Treatment of Wastewater Containing Copper. Chemosphere 2017, 189, 134–142, doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.048.

55. Ihrmark, K.; Bödeker, I.T.M.; Cruz-Martinez, K.; Friberg, H.; Kubartova, A.; Schenck, J.; Strid, Y.; Stenlid, J.; Brandström-Durling, M.; Clemmensen, K.E.; et al. New Primers to Amplify the Fungal ITS2 Region - Evaluation by 454-Sequencing of Artificial and Natural Communities. FEMS Microbiol Ecol 2012, 82, 666–677, doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x.

56. White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In PCR Protocols; Elsevier, 1990; pp. 315–322 ISBN 978-0-12-372180-8.

57. Wang, H.; Zeng, Y.; Guo, C.; Bao, Y.; Lu, G.; Reinfelder, J.R.; Dang, Z. Bacterial, Archaeal, and Fungal Community Responses to Acid Mine Drainage-Laden Pollution in a Rice Paddy Soil Ecosystem. Science of the Total Environment 2018, 616, 107–116.

58. Rezgui, C.; Trinsoutrot-Gattin, I.; Benoit, M.; Laval, K.; Wassila, R.-A. Linking Changes in the Soil Microbial Community to C and N Dynamics during Crop Residue Decomposition. Journal of Integrative Agriculture 2021, 20, 3039–3059.

59. Fontaine, S.; Mariotti, A.; Abbadie, L. The Priming Effect of Organic Matter: A Question of Microbial Competition? Soil Biology and Biochemistry 2003, 35, 837–843, doi:10.1016/S0038-0717(03)00123-8.

60. Kuzyakov, Y.; Domanski, G. Carbon Input by Plants into the Soil. Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 2000, 163, 421–431, doi:10.1002/1522-2624(200008)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R.

61. Sun, L.; Ataka, M.; Han, M.; Han, Y.; Gan, D.; Xu, T.; Guo, Y.; Zhu, B. Root Exudation as a Major Competitive Fine-Root Functional Trait of 18 Coexisting Species in a Subtropical Forest. New Phytologist 2021, 229, 259–271, doi:10.1111/nph.16865.

62. Guyonnet, J.P.; Cantarel, A.A.M.; Simon, L.; Haichar, F. el Z. Root Exudation Rate as Functional Trait Involved in Plant Nutrient-Use Strategy Classification. Ecology and Evolution 2018, 8, 8573–8581, doi:10.1002/ece3.4383.

63. Faucon, M.-P.; Houben, D.; Lambers, H. Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. Trends in Plant Science 2017, 22, 385–394, doi:10.1016/j.tplants.2017.01.005.

64. Haichar, F. el Z.; Heulin, T.; Guyonnet, J.P.; Achouak, W. Stable Isotope Probing of Carbon Flow in the Plant Holobiont. Current Opinion in Biotechnology 2016, 41, 9–13, doi:10.1016/j.copbio.2016.02.023.

65. Wang, Y.H.; Yu, Z.H.; Li, Y.S.; Wang, G.H.; Tang, C.; Liu, X.B.; Liu, J.J.; Xie, Z.H.; Jin, J. Elevated CO2 Alters the Structure of the Bacterial Community Assimilating Plant-Derived Carbon in the Rhizosphere of Soya Bean. European Journal of Soil Science 2019, 70, 1212–1220, doi:10.1111/ejss.12817.

66. Castro, H.F.; Classen, A.T.; Austin, E.E.; Norby, R.J.; Schadt, C.W. Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. Applied and Environmental Microbiology 2010, 76, 999–1007, doi:10.1128/AEM.02874-09.

67. Acosta-Martínez, V.; Bell, C.W.; Morris, B.E.L.; Zak, J.; Allen, V.G. Long-Term Soil Microbial Community and Enzyme Activity Responses to an Integrated Cropping-Livestock System in a Semi-Arid Region. Agriculture, Ecosystems & Environment 2010, 137, 231–240, doi:10.1016/j.agee.2010.02.008.

68. Youssef, N.H.; Elshahed, M.S. Diversity Rankings among Bacterial Lineages in Soil. ISME J 2009, 3, 305–313, doi:10.1038/ismej.2008.106.

69. Ward, N.L.; Challacombe, J.F.; Janssen, P.H.; Henrissat, B.; Coutinho, P.M.; Wu, M.; Xie, G.; Haft, D.H.; Sait, M.; Badger, J.; et al. Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. Applied and Environmental Microbiology 2009, 75, 2046–2056, doi:10.1128/AEM.02294-08.

70. Yarwood, S.A. The Role of Wetland Microorganisms in Plant-Litter Decomposition and Soil Organic Matter Formation: A Critical Review. FEMS Microbiology Ecology 2018, 94, fiy175, doi:10.1093/femsec/fiy175.

71. Tveit, A.; Schwacke, R.; Svenning, M.M.; Urich, T. Organic Carbon Transformations in High-Arctic Peat Soils: Key Functions and Microorganisms. ISME J 2013, 7, 299–311, doi:10.1038/ismej.2012.99.

72. Lemos, L.N.; Medeiros, J.D.; Dini-Andreote, F.; Fernandes, G.R.; Varani, A.M.; Oliveira, G.; Pylro, V.S. Genomic Signatures and Co-Occurrence Patterns of the Ultra-Small Saccharimonadia (Phylum CPR/Patescibacteria) Suggest a Symbiotic Lifestyle. Molecular Ecology 2019, 28, 4259–4271, doi:10.1111/mec.15208.

73. Vigneron, A.; Cruaud, P.; Langlois, V.; Lovejoy, C.; Culley, A.I.; Vincent, W.F. Ultra-Small and Abundant: Candidate Phyla Radiation Bacteria Are Potential Catalysts of Carbon Transformation in a Thermokarst Lake Ecosystem. Limnology and Oceanography Letters 2020, 5, 212–220, doi:10.1002/lol2.10132.

74. Gao, H.; Tian, G.; Khashi u Rahman, M.; Wu, F. Cover Crop Species Composition Alters the Soil Bacterial Community in a Continuous Pepper Cropping System. Frontiers in Microbiology 2022, 12.

75. Hosokawa, S.; Kuroda, K.; Narihiro, T.; Aoi, Y.; Ozaki, N.; Ohashi, A.; Kindaichi, T. Cometabolism of the Superphylum Patescibacteria with Anammox Bacteria in a Long-Term Freshwater Anammox Column Reactor. Water 2021, 13, 208, doi:10.3390/w13020208.

76. Mendes, R.; Kruijt, M.; de Bruijn, I.; Dekkers, E.; van der Voort, M.; Schneider, J.H.M.; Piceno, Y.M.; DeSantis, T.Z.; Andersen, G.L.; Bakker, P.A.H.M.; et al. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. Science 2011, 332, 1097–1100, doi:10.1126/science.1203980.

77. Visioli, G.; Sanangelantoni, A.M.; Vamerali, T.; Dal Cortivo, C.; Blandino, M. 16S RDNA Profiling to Reveal the Influence of Seed-Applied Biostimulants on the Rhizosphere of Young Maize Plants. Molecules 2018, 23, 1461, doi:10.3390/molecules23061461.

78. Ragaa, A.H.; Safinaz, A.F. Enhancement the Growth and Phenolic Content of Faba Bean (Vicia Faba L.) by Applying Some Biofertilizer Agents. Journal of Food Studies 2013, 2, 20–30.

79. Siczek, A.; Frąc, M.; Gryta, A.; Kalembasa, S.; Kalembasa, D. Variation in Soil Microbial Population and Enzyme Activities under Faba Bean as Affected by Pentachlorophenol. Applied Soil Ecology 2020, 150, 103466, doi:10.1016/j.apsoil.2019.103466.

80. Sharma, S.; Aneja, M.K.; Mayer, J.; Munch, J.C.; Schloter, M. Characterization of Bacterial Community Structure in Rhizosphere Soil of Grain Legumes. Microb Ecol 2005, 49, 407–415, doi:10.1007/s00248-004-0041-7.

81. Liao, H.; Li, Y.; Yao, H. Biochar Amendment Stimulates Utilization of Plant-Derived Carbon by Soil Bacteria in an Intercropping System. Frontiers in Microbiology 2019, 10.

82. Gu, Y.; Bai, Y.; Xiang, Q.; Yu, X.; Zhao, K.; Zhang, X.; Li, C.; Liu, S.; Chen, Q. Degradation Shaped Bacterial and Archaeal Communities with Predictable Taxa and Their Association Patterns in Zoige Wetland at Tibet Plateau. Sci Rep 2018, 8, 3884, doi:10.1038/s41598-018-21874-0.

83. Vikram, S.; Guerrero, L.D.; Makhalanyane, T.P.; Le, P.T.; Seely, M.; Cowan, D.A. Metagenomic Analysis Provides Insights into Functional Capacity in a Hyperarid Desert Soil Niche Community. Environmental Microbiology 2016, 18, 1875–1888, doi:10.1111/1462-2920.13088.

84. Santoyo, G.; Orozco-Mosqueda, Ma. del C.; Govindappa, M. Mechanisms of Biocontrol and Plant Growth-Promoting Activity in Soil Bacterial Species of Bacillus and Pseudomonas: A Review. Biocontrol Science and Technology 2012, 22, 855–872, doi:10.1080/09583157.2012.694413.

85. Soltani, A.A.; Khavazi, K.; Rahmani, H.; Omidvari, M.; Abbaszadeh Dahaji, P.; Hamed, M. Plant Growth Promoting Characteristics in Some Flavobacterium Spp. Isolated from Soils of Iran. Journal of Agricultural Science 2010, 2, doi:10.5539/jas.v2n4p106.

86. Menon, R.R.; Kumari, S.; Viver, T.; Rameshkumar, N. Flavobacterium Pokkalii Sp. Nov., a Novel Plant Growth Promoting Native Rhizobacteria Isolated from Pokkali Rice Grown in Coastal Saline Affected Agricultural Regions of Southern India, Kerala. Microbiological Research 2020, 240, 126533, doi:10.1016/j.micres.2020.126533.

87. Thomloudi, E.-E.; Tsalgatidou, P.C.; Douka, D.; Spantidos, T.-N.; Dimou, M.; Venieraki, A.; Katinakis, P. Multistrain versus Single-Strain Plant Growth Promoting Microbial Inoculants - The Compatibility Issue. Hellenic Plant Protection Journal 2019, 12, 61–77, doi:10.2478/hppj-2019-0007.

88. Gupta, G.; Parihar, S.; Ahirwar, N.; Snehi, Dr.S.K.; Singh, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. Microbial & Biochemical Technology 2015, 7, 096–102.

89. Ishii, S.; Ashida, N.; Ohno, H.; Segawa, T.; Yabe, S.; Otsuka, S.; Yokota, A.; Senoo, K. Noviherbaspirillum Denitrificans Sp. Nov., a Denitrifying Bacterium Isolated from Rice Paddy Soil and Noviherbaspirillum Autotrophicum Sp. Nov., a Denitrifying, Facultatively Autotrophic Bacterium Isolated from Rice Paddy Soil and Proposal to Reclassify Herbaspirillum Massiliense as Noviherbaspirillum Massiliense Comb. Nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 2017, 67, 1841–1848.

90. Zhang, W.; Zhang, B.; Deng, J.; Li, L.; Yi, T.; Hong, Y. The Resistance of Peanut to Soil-Borne Pathogens Improved by Rhizosphere Probiotics under Calcium Treatment. BMC Microbiol 2021, 21, 1–13, doi:10.1186/s12866-021-02355-3.

91. Lee, C.G.; Iida, T.; Matsuda, E.; Yoshida, K.; Kawabe, M.; Maeda, M.; Muramoto, Y.; Watanabe, H.; Otani, Y.; Nakaho, K.; et al. Comparison of Prokaryotic Communities among Fields Exhibiting Different Disinfestation Effects by Anaerobic Soil Disinfestation 2019, 596825.

92. Shang, X.; Cai, X.; Zhou, Y.; Han, X.; Zhang, C.-S.; Ilyas, N.; Li, Y.; Zheng, Y. Pseudomonas Inoculation Stimulates Endophytic Azospira Population and Induces Systemic Resistance to Bacterial Wilt. Frontiers in Plant Science 2021, 1964.

93. Yu, L.; Zi, H.; Zhu, H.; Liao, Y.; Li, X. Rhizosphere Microbiome of Forest Trees Determines Their Resistance to Soil-Borne Pathogens; In Review, 2022;

94. Fiard, M.; Cuny, P.; Sylvi, L.; Hubas, C.; Jézéquel, R.; Lamy, D.; Walcker, R.; El Houssainy, A.; Heimbürger-Boavida, L.-E.; Robinet, T. Mangrove Microbiota along the Urban-to-Rural Gradient of the Cayenne Estuary (French Guiana, South America): Drivers and Potential Bioindicators. Science of the Total Environment 2022, 807, 150667.

95. Kertesz, M.A.; Fellows, E.; Schmalenberger, A. Rhizobacteria and Plant Sulfur Supply. In Advances in Applied Microbiology; Academic Press, 2007; Vol. 62, pp. 235–268.

96. Brtnicky, M.; Kintl, A.; Hammerschmiedt, T.; Mustafa, A.; Elbl, J.; Kucerik, J.; Vyhnanek, T.; Skladanka, J.; Hunady, I.; Holatko, J. Clover Species Specific Influence on Microbial Abundance and Associated Enzyme Activities in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils. Agronomy 2021, 11, 2214, doi:10.3390/agronomy11112214.

97. Mullen, M.D.; Melhorn, C.G.; Tyler, D.D.; Duck, B.N. Biological and Biochemical Soil Properties in No-till Corn with Different Cover Crops. Journal of Soil and Water Conservation 1998, 53, 219–224.

98. Bulgarelli, D.; Schlaeppi, K.; Spaepen, S.; van Themaat, E.V.L.; Schulze-Lefert, P. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. Annual Review of Plant Biology 2013, 64, 807–838, doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.

99. Li, M.; Chen, Z.; Qian, J.; Wei, F.; Zhang, G.; Wang, Y.; Wei, G.; Hu, Z.; Dong, L.; Chen, S. Composition and Function of Rhizosphere Microbiome of Panax Notoginseng with Discrepant Yields. Chin Med 2020, 15, 85, doi:10.1186/s13020-020-00364-4.

100. Wu, A.-L.; Jiao, X.-Y.; Wang, J.-S.; Dong, E.-W.; Guo, J.; Wang, L.-G.; Sun, A.-Q.; Hu, H.-W. Sorghum Rhizosphere Effects Reduced Soil Bacterial Diversity by Recruiting Specific Bacterial Species under Low Nitrogen Stress. Science of The Total Environment 2021, 770, 144742, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144742.

101. Wakelin, S.; Tillard, G.; Ham, R. van; Ballard, R.; Farquharson, E.; Gerard, E.; Geurts, R.; Brown, M.; Ridgway, H.; O'Callaghan, M. High Spatial Variation in Population Size and Symbiotic Performance of Rhizobium Leguminosarum Bv. Trifolii with White Clover in New Zealand Pasture Soils. PLOS ONE 2018, 13, e0192607, doi:10.1371/journal.pone.0192607.

102. Rovira, A.D. Rhizobium Numbers in the Rhizospheres of Red Clover and Paspalum in Relation to Soil Treatment and the Numbers of Bacteria and Fungi. Aust. J. Agric. Res. 1961, 12, 77–83, doi:10.1071/ar9610077.

103. Estrada-De Los Santos, P.; Martínez-Aguilar, L.; López-Lara, I.M.; Caballero-Mellado, J. Cupriavidus Alkaliphilus Sp. Nov., a New Species Associated with Agricultural Plants That Grow in Alkaline Soils. Systematic and applied microbiology 2012, 35, 310–314.

104. Estrada-de los Santos, P.; Solano-Rodríguez, R.; Matsumura-Paz, L.T.; Vásquez-Murrieta, M.S.; Martínez-Aguilar, L. Cupriavidus Plantarum Sp. Nov., a Plant-Associated Species. Arch Microbiol 2014, 196, 811–817, doi:10.1007/s00203-014-1018-7.

105. Yu, X.; Liu, X.; Zhu, T.H.; Liu, G.H.; Mao, C. Isolation and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Walnut and Their Effect on Growth and Phosphorus Mobilization. Biology and Fertility of Soils 2011, 47, 437–446.

106. Pongsilp, N.; Nimnoi, P.; Lumyong, S. Genotypic Diversity among Rhizospheric Bacteria of Three Legumes Assessed by Cultivation-Dependent and Cultivation-Independent Techniques. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2012, 28, 615–626.

107. Bill, M.; Chidamba, L.; Gokul, J.K.; Labuschagne, N.; Korsten, L. Bacterial Community Dynamics and Functional Profiling of Soils from Conventional and Organic Cropping Systems. Applied Soil Ecology 2021, 157, 103734, doi:10.1016/j.apsoil.2020.103734.

108. Fan, J.; Jin, H.; Zhang, C.; Zheng, J.; Zhang, J.; Han, G. Grazing Intensity Induced Alternations of Soil Microbial Community Composition in Aggregates Drive Soil Organic Carbon Turnover in a Desert Steppe. Agriculture, Ecosystems & Environment 2021, 313, 107387, doi:10.1016/j.agee.2021.107387.

109. Anderson, C.R.; Condron, L.M.; Clough, T.J.; Fiers, M.; Stewart, A.; Hill, R.A.; Sherlock, R.R. Microorganisms and Their Roles in Fundamental Biogeochemical Cycles. Pedobiologia 2011, 54, 309–320.

110. Reguera, G.; Leschine, S.B. Chitin Degradation by Cellulolytic Anaerobes and Facultative Aerobes from Soils and Sediments. FEMS microbiology letters 2001, 204, 367–374.

111. Cañizares, R.; Benitez, E.; Ogunseitan, O.A. Molecular Analyses of β-Glucosidase Diversity and Function in Soil. European Journal of Soil Biology 2011, 47, 1–8.

112. Schellenberger, S.; Drake, H.L.; Kolb, S. Functionally Redundant Cellobiose-Degrading Soil Bacteria Respond Differentially to Oxygen. Applied and environmental microbiology 2011, 77, 6043–6048.

113. Ulrich, A.; Klimke, G.; Wirth, S. Diversity and Activity of Cellulose-Decomposing Bacteria, Isolated from a Sandy and a Loamy Soil after Long-Term Manure Application. Microbial ecology 2008, 55, 512–522.

114. Langwig, M.V.; De Anda, V.; Dombrowski, N.; Seitz, K.W.; Rambo, I.M.; Greening, C.; Teske, A.P.; Baker, B.J. Large-Scale Protein Level Comparison of Deltaproteobacteria Reveals Cohesive Metabolic Groups. ISME J 2022, 16, 307–320, doi:10.1038/s41396-021-01057-y.

115. Videira, S.S.; De Araujo, J.L.S.; Da Silva Rodrigues, L.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. Occurrence and Diversity of Nitrogen-Fixing Sphingomonas Bacteria Associated with Rice Plants Grown in Brazil. FEMS Microbiology Letters 2009, 293, 11–19, doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01475.x.

116. Wachowska, U.; Irzykowski, W.; Jędryczka, M.; Stasiulewicz-Paluch, A.D.; G\lowacka, K. Biological Control of Winter Wheat Pathogens with the Use of Antagonistic Sphingomonas Bacteria under Greenhouse Conditions. Biocontrol Science and Technology 2013, 23, 1110–1122.

117. Liu, J.; Meng, Z.; Liu, X.; Zhang, X.-H. Microbial Assembly, Interaction, Functioning, Activity and Diversification: A Review Derived from Community Compositional Data. Mar Life Sci Technol 2019, 1, 112–128, doi:10.1007/s42995-019-00004-3.

118. Hugoni, M.; Luis, P.; Guyonnet, J.; Haichar, F. el Z. Plant Host Habitat and Root Exudates Shape Fungal Diversity. Mycorrhiza 2018, 28, 451–463, doi:10.1007/s00572-018-0857-5.

119. Guo, Q.Q.; Xiao, M.R.; Ma, Y.; Niu, H.; Zhang, G.S. Polyester Microfiber and Natural Organic Matter Impact Microbial Communities, Carbon-Degraded Enzymes, and Carbon Accumulation in a Clayey Soil. Journal of Hazardous Materials 2021, 405, 124701, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124701.

120. Voříšková, J.; Baldrian, P. Fungal Community on Decomposing Leaf Litter Undergoes Rapid Successional Changes. ISME J 2013, 7, 477–486, doi:10.1038/ismej.2012.116.

121. Siczek, A.; Frąc, M.; Gryta, A. Forecrop Effects on Abundance and Diversity of Soil Microorganisms during the Growth of the Subsequent Crop. Agronomy 2020, 10, 1971, doi:10.3390/agronomy10121971.

122. Golubkina, N.A.; Mironov, V.E. Element Composition of Mushrooms in Contrasting Anthropogenic Loading. Geochem. Int. 2018, 56, 1263–1275, doi:10.1134/S0016702918100087.

123. Thakur, N.; Tripathi, A.; Sagar, S.; Kumar, P.; Devi, N.; Sharma, I.; Sharma, J. ESTIMATION OF EXTRACELLULAR LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM WILD AURICULERIA POLYTRICHA, HELVELLA SP. AND MORCHELLA SP.; 2017; Vol. 5;.

124. Mandyam, K.; Loughin, T.; Jumpponen, A. Isolation and Morphological and Metabolic Characterization of Common Endophytes in Annually Burned Tallgrass Prairie. Mycologia 2010, 102, 813–821, doi:10.3852/09-212.

125. Ali, S.; Huang, Z.; Ren, S.X.; Bashir, M.H.; Afzal, M.; Tong, L. Production and Extraction of Extracellular Lipase from the Entomopathogenic Fungus Isaria Fumosoroseus (Cordycipitaceae:Hypocreales. Biocontrol Sciences Technology 2009, 81–89.

126. Kuldau, G.; Bacon, C. Clavicipitaceous Endophytes: Their Ability to Enhance Resistance of Grasses to Multiple Stresses. Biological Control 2008, 46, 57–71, doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.023.

127. Hilton, S.; Bennett, A.J.; Chandler, D.; Mills, P.; Bending, G.D. Preceding Crop and Seasonal Effects Influence Fungal, Bacterial and Nematode Diversity in Wheat and Oilseed Rape Rhizosphere and Soil. Applied Soil Ecology 2018, 126, 34–46, doi:10.1016/j.apsoil.2018.02.007.

128. Paumier, D.; Bammé, B.; Penaud, A.; Valade, R.; Suffert, F. First Report of the Sexual Stage of the Flax Pathogen Mycosphaerella Linicola in France and Its Impact on Pasmo Epidemiology. Plant Pathology 2021, 70, 475–483, doi:10.1111/ppa.13296.

129. Baroncelli, R.; Da Lio, D.; Vannacci, G.; Sarrocco, S. Genome Resources for the Endophytic Fungus Paraphaeosphaeria Sporulosa. MPMI 2020, 33, 1098–1099, doi:10.1094/MPMI-04-20-0097-A.

130. Uke, A.; Nakazono-Nagaoka, E.; Chuah, J.-A.; Zain, N.-A.A.; Amir, H.-G.; Sudesh, K.; Abidin, N.Z.H.A.Z.; Hashim, Z.; Kosugi, A. Effect of Decomposing Oil Palm Trunk Fibers on Plant Growth and Soil Microbial Community Composition. Journal of Environmental Management 2021, 295, 113050, doi:10.1016/j.jenvman.2021.113050.

131. Wakefield, W.S.; Powell, M.J.; Letcher, P.M.; Barr, D.J.S.; Churchill, P.F.; Longcore, J.E.; Chen, S.-F. A Molecular Phylogenetic Evaluation of the Spizellomycetales. Mycologia 2010, 102, 596–604, doi:10.3852/09-120.

132. Lozupone, C.; Klein, D. Molecular and Cultural Assessment of Chytrid and Spizellomyces Populations in Grassland Soils. Mycologia 2002, 94, 411–420, doi:10.2307/3761775.

133. Zhang, Y.; Li, T.; Xu, M.; Guo, J.; Zhang, C.; Feng, Z.; Peng, X.; Li, Z.; Xing, K.; Qin, S. Antifungal Effect of Volatile Organic Compounds Produced by Pseudomonas Chlororaphis Subsp. Aureofaciens SPS-41 on Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction of Ceratocystis Fimbriata. Pesticide Biochemistry and Physiology 2021, 173, 104777, doi:10.1016/j.pestbp.2021.104777.

134. Shukla, P.K.; Varma, S.; Fatima, T.; Bajpai, A.; Mishra, R.; Misra, A.K.; Gundappa; Muthukumar, M. First Report on Wilt Disease of Mango Caused by Ceratocystis Fimbriata in Uttar Pradesh, India. Indian Phytopathology 2018, 71, 135–142, doi:10.1007/s42360-018-0021-3.

135. Moharram, A.M.; Zohri, A.-N.A.; Hussein, D.A. Cellulase and Xylanase Production by Sugarcane Bagasse Mycobiota. Egyptian Sugar Journal 2021, 16, 41–76, doi:10.21608/esugj.2021.207984.

136. da Silva, R.R.; da Rosa, N.G.; de Oliveira, L.C.G.; Juliano, M.A.; Juliano, L.; Rosa, J.C.; Cabral, H. Biochemical Properties and Catalytic Specificity of a Novel Neutral Serine Peptidase Secreted by Fungus Pyrenochaetopsis Sp. Appl Biochem Biotechnol 2019, 187, 1158–1172, doi:10.1007/s12010-018-2875-3.

137. Da Silva, R.R. Commentary: Fungal Lifestyle Reflected in Serine Protease Repertoire. Frontiers in microbiology 2018, 9, 467.

138. De Gruyter, J.; Woudenberg, J.H.; Aveskamp, M.M.; Verkley, G.J.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. Systematic Reappraisal of Species in Phoma Section Paraphoma, Pyrenochaeta and Pleurophoma. Mycologia 2010, 102, 1066–1081.

139. Ismail, I.; Hussain, A.; Mehmood, A.; Qadir, M.; Husna, H.; Iqbal, A.; Hamayun, M.; Khan, N. Thermal Stress Alleviating Potential of Endophytic Fungus Rhizopus Oryzae Inoculated to Sunflower (Helianthus Annuus L.) and Soybean (Glycine Max L.). PAK.J.BOT. 2020, 52, doi:10.30848/PJB2020-5(10).

140. Ferdinand, P.; Onyeocha, I.; Ezeji, U.; Chukwudi, P.; Engwa, G. Biodegradation of Hydrocarbons in a Crude-Oil Polluted Soil Using Peroxidase from Fungal Di-Culture of Rhizopus and Saccharomyces Spp. Journal of Biotech Research 2020, 11, 187–196.

141. Piotrowska-Długosz, A.; Breza-Boruta, B.; Długosz, J. Spatial and Temporal Variability of the Soil Microbiological Properties in Two Soils with a Different Pedogenesis Cropped to Winter Rape (Brassica Napus L.). Geoderma 2019, 340, 313–324, doi:10.1016/j.geoderma.2019.01.020.

142. Bahram, M.; Netherway, T.; Frioux, C.; Ferretti, P.; Coelho, L.P.; Geisen, S.; Bork, P.; Hildebrand, F. Metagenomic Assessment of the Global Diversity and Distribution of Bacteria and Fungi. Environ Microbiol 2021, 23, 316–326, doi:10.1111/1462-2920.15314.

143. Luo, J.; Tao, Q.; Wu, K.; Li, J.; Qian, J.; Liang, Y.; Yang, X.; Li, T. Structural and Functional Variability in Root-Associated Bacterial Microbiomes of Cd/Zn Hyperaccumulator Sedum Alfredii. Appl Microbiol Biotechnol 2017, 101, 7961–7976, doi:10.1007/s00253-017-8469-0.

144. Laranjo, M.; Alexandre, A.; Oliveira, S. Legume Growth-Promoting Rhizobia: An Overview on the Mesorhizobium Genus. Microbiological Research 2014, 169, 2–17, doi:10.1016/j.micres.2013.09.012.

145. Das, K.; Prasanna, R.; Saxena, A.K. Rhizobia: A Potential Biocontrol Agent for Soilborne Fungal Pathogens. Folia microbiologica 2017, 62, 425–435.

146. Jaiswal, S.K.; Mohammed, M.; Ibny, F.Y.I.; Dakora, F.D. Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. Frontiers in Sustainable Food Systems 2021, 4.

147. Mathesius, U. Chapter Two - Hormonal Interactions in the Regulation of the Nitrogen-Fixing Legume-Rhizobium Symbiosis. In Advances in Botanical Research; Frendo, P., Frugier, F., Masson-Boivin, C., Eds.; Regulation of Nitrogen-Fixing Symbioses in Legumes; Academic Press, 2020; Vol. 94, pp. 41–66.

148. Akhtar, Mohd.S.; Siddiqui, Zaki.A.; Wiemken, A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobium to Control Plant Fungal Diseases. In Alternative Farming Systems, Biotechnology, Drought Stress and Ecological Fertilisation; Lichtfouse, E., Ed.; Sustainable Agriculture Reviews; Springer Netherlands: Dordrecht, 2011; pp. 263–292 ISBN 978-94-007-0186-1.

149. Ohyama, T. The Role of Legume-Rhizobium Symbiosis in Sustainable Agriculture. In Legume nitrogen fixation in soils with low phosphorus availability; Springer, 2017; pp. 1–20.

150. Etesami, H. Root Nodules of Legumes: A Suitable Ecological Niche for Isolating Non-Rhizobial Bacteria with Biotechnological Potential in Agriculture. Current Research in Biotechnology 2022, 4, 78–86, doi:10.1016/j.crbiot.2022.01.003.

151. Redecker, D.; Schüßler, A. 9 Glomeromycota. In Systematics and Evolution: Part A; McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Eds.; The Mycota; Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; pp. 251–269 ISBN 978-3-642-55318-9.

152. Öpik, M.; Vanatoa, A.; Vanatoa, E.; Moora, M.; Davison, J.; Kalwij, J.M.; Reier, Ü.; Zobel, M. The Online Database MaarjAM Reveals Global and Ecosystemic Distribution Patterns in Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Glomeromycota). New Phytologist 2010, 188, 223–241, doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.

153. Vannette, R.L.; Hunter, M.D. Mycorrhizal Fungi as Mediators of Defence against Insect Pests in Agricultural Systems. Agricultural and Forest Entomology 2009, 11, 351–358, doi:10.1111/j.1461-9563.2009.00445.x.

154. Jadallah, S.O.; ALsaadi, A.H.; Majeed, A.A.R. Evaluation of Some Mycorrhizae Strains on Improving Nutrients Absorption in Maize Plant Grown in (Sirte–Libya) Saline Soil; Social Science Research Network: Rochester, NY, 2021;

155. Sharma, M.; Gupta, S.K. Approaches and Trends in Plant Disease Management; Scientific Publishers, 2014; ISBN 978-93-86102-99-7.

156. Guyonnet, J.P.; Vautrin, F.; Meiffren, G.; Labois, C.; Cantarel, A.A.M.; Michalet, S.; Comte, G.; Haichar, F. el Z. The Effects of Plant Nutritional Strategy on Soil Microbial Denitrification Activity through Rhizosphere Primary Metabolites. FEMS Microbiology Ecology 2017, 93, doi:10.1093/femsec/fix022.

157. Torrecillas, E.; Alguacil, M.M.; Roldán, A. Host Preferences of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing Annual Herbaceous Plant Species in Semiarid Mediterranean Prairies. Appl Environ Microbiol 2012, 78, 6180–6186, doi:10.1128/AEM.01287-12.

158. Sepehri, M.; Ghaffari, M. r.; Khayam Nekoui, M.; Sarhadi, E.; Moghadam, A.; Khatabi, B.; Hosseini Salekdeh, G. Root Endophytic Fungus Serendipita Indica Modulates Barley Leaf Blade Proteome by Increasing the Abundance of Photosynthetic Proteins in Response to Salinity. Journal of Applied Microbiology 2021, 131, 1870–1889, doi:10.1111/jam.15063.

159. Barrio-Duque, A.; Ley, J.; Samad, A.; Antonielli, L.; Sessitsch, A.; Compant, S. Beneficial Endophytic Bacteria-Serendipita Indica Interaction for Crop Enhancement and Resistance to Phytopathogens. Frontiers in Microbiology 2019, 10.

160. Grassein, F.; Lemauviel-Lavenant, S.; Lavorel, S.; Bahn, M.; Bardgett, R.D.; Desclos-Theveniau, M.; Laîné, P. Relationships between Functional Traits and Inorganic Nitrogen Acquisition among Eight Contrasting European Grass Species. Annals of botany 2015, 115, 107–115.

161. Cantarel, A.A.M.; Pommier, T.; Desclos-Theveniau, M.; Diquélou, S.; Dumont, M.; Grassein, F.; Kastl, E.-M.; Grigulis, K.; Laîné, P.; Lavorel, S.; et al. Using Plant Traits to Explain Plant–Microbe Relationships Involved in Nitrogen Acquisition. Ecology 2015, 96, 788–799, doi:10.1890/13-2107.1.

162. de Vries, F.T.; Bardgett, R.D. Plant Community Controls on Short-Term Ecosystem Nitrogen Retention. New Phytologist 2016, 210, 861–874, doi:10.1111/nph.13832.

163. Grigulis, K.; Lavorel, S.; Krainer, U.; Legay, N.; Baxendale, C.; Dumont, M.; Kastl, E.; Arnoldi, C.; Bardgett, R.D.; Poly, F.; et al. Relative Contributions of Plant Traits and Soil Microbial Properties to Mountain Grassland Ecosystem Services. Journal of Ecology 2013, 101, 47–57, doi:10.1111/1365-2745.12014.

164. Alekhya, G.; Gopalakrishnan, S. Biological Control and Plant Growth-Promotion Traits of Streptomyces Species Under Greenhouse and Field Conditions in Chickpea. Agric Res 2017, 6, 410–420, doi:10.1007/s40003-017-0278-2.

165. Prieto, I.; Stokes, A.; Roumet, C. Root Functional Parameters Predict Fine Root Decomposability at the Community Level. Journal of Ecology 2016, 104, 725–733, doi:10.1111/1365-2745.12537.

166. Wang, G.; Jin, Z.; Wang, X.; George, T.S.; Feng, G.; Zhang, L. Simulated Root Exudates Stimulate the Abundance of Saccharimonadales to Improve the Alkaline Phosphatase Activity in Maize Rhizosphere. Applied Soil Ecology 2022, 170, 104274, doi:10.1016/j.apsoil.2021.104274.

167. Robson, T.M.; Lavorel, S.; Clement, J.-C.; Le Roux, X. Neglect of Mowing and Manuring Leads to Slower Nitrogen Cycling in Subalpine Grasslands. Soil Biology and Biochemistry 2007, 39, 930–941.

168. Freschet, G.T.; Bellingham, P.J.; Lyver, P.O.; Bonner, K.I.; Wardle, D.A. Plasticity in Above- and Belowground Resource Acquisition Traits in Response to Single and Multiple Environmental Factors in Three Tree Species. Ecol Evol 2013, 3, 1065–1078, doi:10.1002/ece3.520.

169. Huber, K.J.; Geppert, A.M.; Groß, U.; Luckner, M.; Wanner, G.; Cooper, P.; Abakah, J.; Janssen, I.; Overmann, J. Aridibacter Nitratireducens Sp. Nov., a Member of the Family Blastocatellaceae, Class Blastocatellia, Isolated from an African Soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2017, 67, 4487–4493, doi:10.1099/ijsem.0.002318.

170. Suja, S.P.; Hegde, V.; Makeshkumar, T.; Anjana Devi, I.P. Screening of Rhizobacteria Associated with Cassava for Plant Growth Promotion and Biocontrol Potential. 2014.

171. Fu, Y.; Kumar, A.; Chen, L.; Jiang, Y.; Ling, N.; Wang, R.; Pan, Q.; Singh, B.P.; Redmile-Gordon, M.; Luan, L.; et al. Rhizosphere Microbiome Modulated Effects of Biochar on Ryegrass 15N Uptake and Rhizodeposited 13C Allocation in Soil. Plant Soil 2021, 463, 359–377, doi:10.1007/s11104-021-04845-9.

172. Smith, S.E.; Jakobsen, I.; Grønlund, M.; Smith, F.A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. Plant physiology 2011, 156, 1050–1057.

173. Basu, A.; Prasad, P.; Das, S.N.; Kalam, S.; Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; El Enshasy, H. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. Sustainability 2021, 13, 1140.

Supplementary data

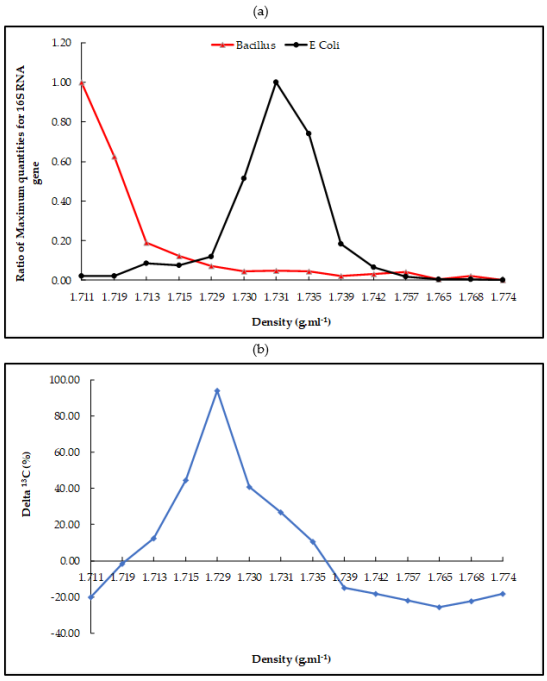


Figure S1. (a) The quantitative distribution of the bacterial 16S rRNA of E.coli growth in the presence of LB medium supplemented by 1 g of ^{13}C glucose (99 atm%) and Bacillus subtilis growth on unlabeled LB medium. The extracted DNAs were used to fine-tune the protocol used for DNA extracts of root-adhering soil of wheat, faba bean, and crimson clover. After qPCR on the different fractions collected, the resulting quantities of target gene copies were standardized by expressing the number of gene copies in each buoyant density fraction relative to the number of gene copies in the buoyant density fraction that contained the maximum number of target gene copies as in Wang et al. [1]. (b) Corresponding delta ^{13}C among the different fractions. The unlabeled (light) DNA of Bacillus subtilis was showed in the first fractions (upper part of the tube) and conversely, the ^{13}C-labeled (heavy) DNA of E.coli was detected a little further down the tube. IRMS analysis confirmed these results and showed a strong enrichment in ^{13}C labeling in the fractions enriched with E.coli DNA.

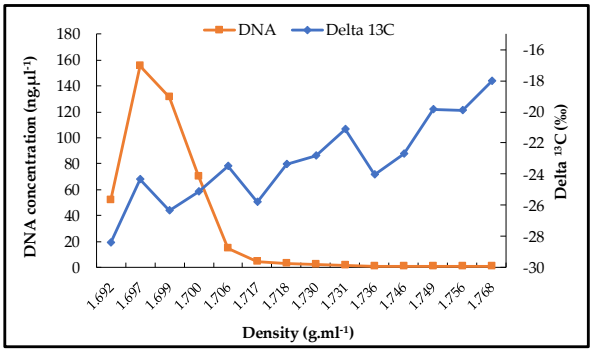


Figure S2. Incorporation of ^{13}C-root exudates into microbial community DNA derived from the RAS of faba bean plants after 10 days of $^{13}CO_2$ labeling (fraction 1 – 14). ^{12}C (light) and ^{13}C (heavy) DNA were separated by CsCl density gradient centrifugation. Total DNA (orange line), and delta ^{13}C value (blue line) within gradient fractions. The selected light DNA were at densities 1.697, 1.699 and 1.700 g.ml^{-1} of CsCl and the selected heavy DNA were at densities 1.749, 1.756 and 1.768.

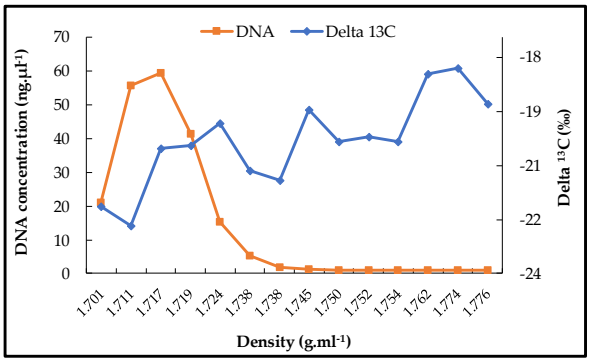


Figure S3. Incorporation of ^{13}C-root exudates into microbial community DNA derived from the RAS of wheat plants after 10 days of $^{13}CO_2$ labeling (fraction 1 – 14). ^{12}C (light) and ^{13}C (heavy) DNA were separated by CsCl density gradient centrifugation. Total DNA (orange line), and delta ^{13}C value (blue line) within gradient fractions. The selected light DNA were at densities 1.711, 1.717 and 1.719 g.ml^{-1} of CsCl and the selected heavy DNA were at densities 1.762, 1.774 and 1.776.

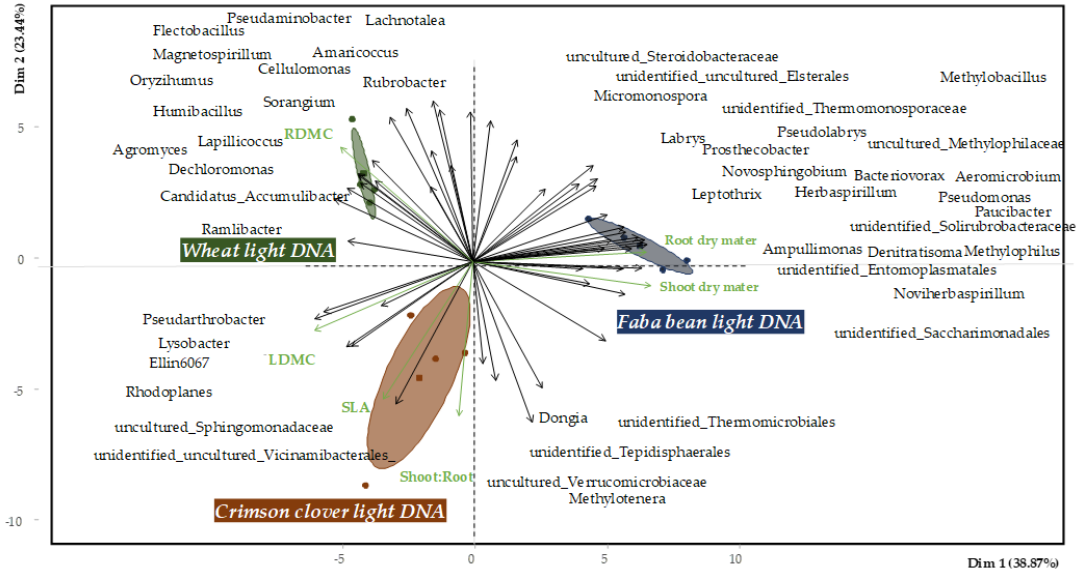


Figure S4. Principal component analyses in the light DNA of the rhizospheric soils including plant functional traits and bacterial genera. Only genera showing significant difference are presented.

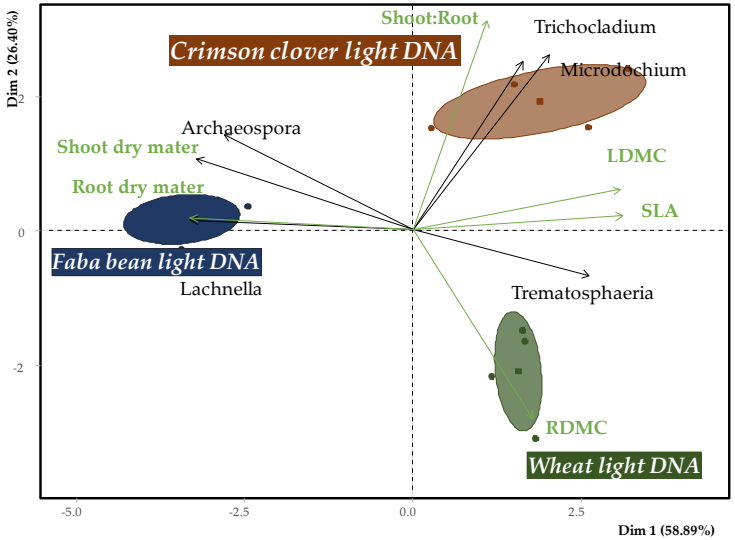


Figure S5. Principal component analyses in the light DNA of the rhizospheric soils including plant functional traits and fungal genera. Only genera showing significant difference are presented.

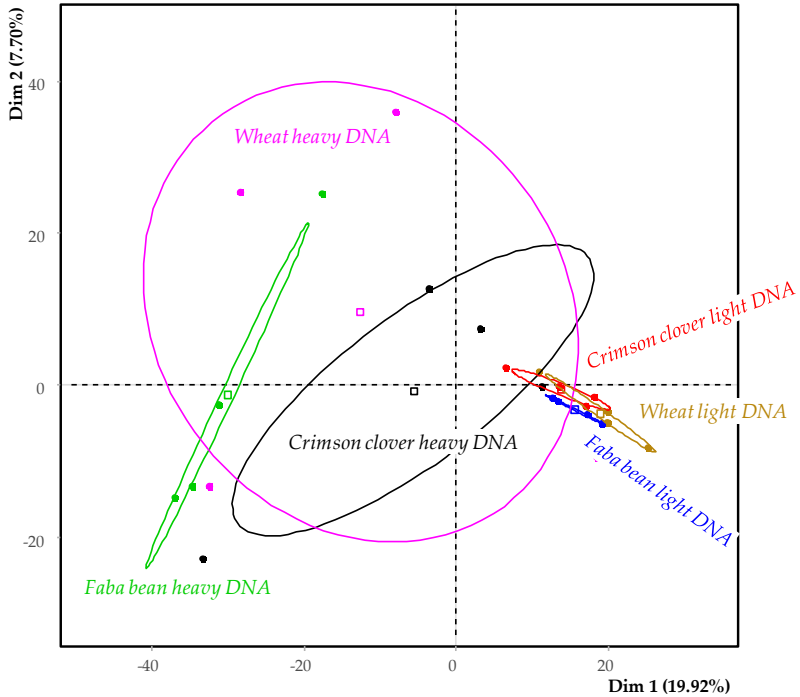


Figure S6. Principal Component Analysis generated from matrices of bacterial OTUs relative abundances obtained by Illumina sequencing.

Table S1. Relative abundance of bacterial phyla in the light DNA (^{12}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing.

	Light DNA		
	Wheat	**Faba bean**	**Crimson clover**
Acidobacteria	14.93 ± 1.32 ns	15.95 ± 0.82 ns	17.48 ± 0.67 ns
Actinobacteria	33.99 ± 4.53 ns	28.61 ± 2.98 ns	28.49 ± 0.2 ns
Armatimonadetes	0.08 ± 0.01 ns	0.07 ± 0.02 ns	0.1 ± 0.03 ns
Bacteroidetes	1.38 ± 0.85 ns	1.68 ± 0.43 ns	2.04 ± 0.71 ns
Bdellovibrionota	0.045 ± 0.01 ns	0.09 ± 0.03 ns	0.04 ± 0.03 ns
Chloroflexi	6.59 ± 0.99 ns	5.8 ± 0.34 ns	5.6 ± 0.64 ns
Cyanobacteria	0.18 ± 0.05 ns	0.25 ± 0.07 ns	0.25 ± 0.05 ns
Desulfobacteria	2.41 ± 0.74 ns	1.41 ± 0.35 ns	1.60 ± 0.3 ns
Entotheonellaeota	0.05 ± 0.01 ns	0.06 ± 0.02 ns	0.04 ± 0.02 ns
Fibrobacteres	0.02 ± 0.00 ns	0.04 ± 0.02 ns	0.04 ± 0.02 ns
Firmicutes	1.77 ± 1.01 ns	2.55 ± 0.55 ns	2.33 ± 0.76 ns
Gemmatimonadetes	2.915 ± 0.75 ns	3.28 ± 0.37 ns	3.11 ± 0.54 ns
Halanaerobiaeota	0.03 ± 0.01 ns	0.03 ± 0.00 ns	0.03 ± 0.01 ns
Latescibacteria	0.77 ± 0.08 ns	0.77 ± 0.12 ns	0.61 ± 0.17 ns
MBNT15	0.04 ± 0.01 ns	0.05 ± 0.01 ns	0.04 ± 0.01 ns
Methylomirabilota	1.74 ± 0.47 ns	1.87 ± 0.23 ns	1.69 ± 0.18 ns
Myxococcota	2.59 ± 0.31 ns	2.85 ± 0.09 ns	2.66 ± 0.35 ns
NB1_j	0.01 ± 0.00 ns	0.02 ± 0.01 ns	0.02 ± 0.01 ns
Nitrospirae	1.22 ± 0.30 ns	1.74 ± 0.28 ns	1.64 ± 0.15 ns
Patescibacteria	**0.31 ± 0.13 b**	**2.2 ± 0.45 a**	**0.73 ± 0.24 b**
Planctomycetes	1.53 ± 0.07 ns	1.87 ± 0.12 ns	1.79 ± 0.19 ns
Proteobacteria	23.23 ± 2.28 ns	24.02 ± 0.97 ns	23.98 ± 1 ns
RCP2_54	0.02 ± 0.01 ns	0.03 ± 0.01 ns	0.02 ± 0.01 ns
Verrucomicrobia	3.99 ± 1.04 ns	4.71 ± 0.89 ns	5.63 ± 0.53 ns
WPS_2	0.02 ± 0.01 ns	0.03 ± 0.01 ns	0.02 ± 0.01 ns
WS2	**0.02 ± 0.00 a**	**0.01 ± 0.00 b**	**0.01 ± 0.01 ab**

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by different letters (indicated in bold) are significantly different (Kruskal-Wallis test, *p < 0.05*). ns : not significant.

Table S2. Relative abundance of bacterial phyla in the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing.

	Heavy DNA		
	Wheat	**Faba bean**	**Crimson clover**
Acidobacteria	15.08 ± 5.23 ns	19.67 ± 2.48 ns	18.44 ± 1.04 ns
Actinobacteria	**22.55 ± 7.75 a**	**10.05 ± 2.25 b**	**23.31 ± 3.75 a**
Armatimonadetes	0.01 ± 0.02 ns	0.05 ± 0.07 ns	0.08 ± 0.08 ns
Bacteroidetes	5.62 ± 5.14 ns	7.45 ± 3.67 ns	3.23 ± 1.49 ns
Bdellovibrionota	0.1 ± 0.13 ns	0.06 ± 0.08 ns	0.05 ± 0.03 ns
Chloroflexi	**5.74 ± 1.91 a**	**2.45 ± 0.92 b**	**5.20 ± 1.22 ab**
Cyanobacteria	**0.16 ± 0.08 b**	**0.72 ± 0.3 a**	**0.20 ± 0.1 b**
Desulfobacteria	2.73 ± 1.74 ns	2.94 ± 0.61 ns	2.19 ± 0.25 ns
Entotheonellaeota	0.07 ± 0.1 ns	0.12 ± 0.12 ns	0.07 ± 0.05 ns
Fibrobacteres	0.01 ± 0.01 ns	0.08 ± 0.08 ns	0.04 ± 0.04 ns
Firmicutes	6.37 ± 5.23 ns	9.97 ± 4.8 ns	4.08 ± 1.73 ns
Gemmatimonadetes	2.16 ± 0.89 ns	1.57 ± 0.7 ns	2.59 ± 0.72 ns
Halanaerobiaeota	0.1 ± 0.13 ns	0.07 ± 0.1 ns	0.04 ± 0.04 ns
Latescibacteria	0.48 ± 0.24 ns	0.53 ± 0.13 ns	0.83 ± 0.26 ns
MBNT15	0.07 ± 0.07 ns	0.06 ± 0.08 ns	0.02 ± 0.02 ns
Methylomirabilota	1.77 ± 0.47 ns	0.52 ± 0.51 ns	1.25 ± 0.54 ns
Myxococcota	2.81 ± 0.38 ns	3.42 ± 0.7 ns	2.63 ± 0.48 ns
NB1_j	0.01 ± 0.01 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.01 ns
Nitrospirae	1.71 ± 0.9 ns	2.9 ± 0.97 ns	2.18 ± 0.33 ns
Patescibacteria	**0.92 ± 0.56 b**	**3.55 ± 0.83 a**	**1.11 ± 0.51 ab**
Planctomycetes	1.37 ± 0.68 ns	1.95 ± 1.14 ns	1.67 ± 0.36 ns
Proteobacteria	23.4 ± 3.29 ns	22.31 ± 2.3 ns	23.29 ± 1.83 ns
RCP2_54	0.01 ± 0.01 ns	0.22 ± 0.22 ns	0.05 ± 0.03 ns
Verrucomicrobia	6.76 ± 3.48 ns	9.35 ± 1.24 ns	7.41 ± 1.28 ns
WPS_2	0.02 ± 0.03 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
WS2	0.01 ± 0.01 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.03 ± 0.03 ns

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by different letters (indicated in bold) are significantly different (Kruskal-Wallis test, *p < 0.05*). ns : not significant.

Table S3. Intra-species comparison of the relative abundance of bacterial phyla in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover separatly. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing.

	Wheat		Faba bean		Crimson clover	
	Light DNA	**Heavy DNA**	**Light DNA**	**Heavy DNA**	**Light DNA**	**Heavy DNA**
Acidobacteria	14.93 ± 1.32 ns	15.08 ± 5.23 ns	**15.95 ± 0.82 b**	**19.67 ± 2.48 a**	17.48 ± 0.67 ns	18.44 ± 1.04 ns
Actinobacteria	33.99 ± 4.53 ns	22.55 ± 7.75 ns	**28.61 ± 2.98 a**	**10.05 ± 2.25 b**	28.49 ± 0.2 ns	23.31 ± 3.75 ns
Armatimonadetes	**0.08 ± 0.01 a**	**0.01 ± 0.02 b**	0.07 ± 0.02 ns	0.05 ± 0.07 ns	0.1 ± 0.03 ns	0.08 ± 0.08 ns
Bacteroidetes	1.38 ± 0.85 ns	5.62 ± 5.14 ns	**1.68 ± 0.43 b**	**7.45 ± 3.67 a**	2.04 ± 0.71 ns	3.23 ± 1.49 ns
Bdellovibrionota	0.045 ± 0.01 ns	0.1 ± 0.13 ns	0.09 ± 0.03 ns	0.06 ± 0.08 ns	0.04 ± 0.03 ns	0.05 ± 0.03 ns
Chloroflexi	6.59 ± 0.99 ns	5.74 ± 1.91 ns	**5.8 ± 0.34 a**	**2.45 ± 0.92 b**	5.6 ± 0.64 ns	5.2 ± 1.22 ns
Cyanobacteria	0.18 ± 0.05 ns	0.16 ± 0.08 ns	0.25 ± 0.07 b	0.72 ± 0.3 a	0.25 ± 0.05 ns	0.2 ± 0.1 ns
Desulfobacteria	2.41 ± 0.74 ns	2.73 ± 1.74 ns	1.41 ± 0.35 ns	2.94 ± 0.61 ns	**1.6 ± 0.3 b**	**2.19 ± 0.25 a**
Entotheonellaeota	0.05 ± 0.01 ns	0.07 ± 0.1 ns	0.06 ± 0.02 ns	0.12 ± 0.12 ns	0.04 ± 0.02 ns	0.07 ± 0.05 ns
Fibrobacteres	**0.02 ± 0.00 a**	**0.01 ± 0.01 b**	0.04 ± 0.02 ns	0.08 ± 0.08 ns	0.04 ± 0.02 ns	0.04 ± 0.04 ns
Firmicutes	1.77 ± 1.01 ns	6.37 ± 5.23 ns	**2.55 ± 0.55 b**	**9.97 ± 4.8 a**	2.33 ± 0.76 ns	4.08 ± 1.73 ns
Gemmatimonadetes	2.915 ± 0.75 ns	2.16 ± 0.89 ns	**3.28 ± 0.37 a**	**1.57 ± 0.7 b**	3.11 ± 0.54 ns	2.59 ± 0.72 ns
Halanaerobiaeota	0.03 ± 0.01 ns	0.1 ± 0.13 ns	0.03 ± 0 ns	0.07 ± 0.1 ns	0.03 ± 0.01 ns	0.04 ± 0.04 ns
Latescibacteria	0.77 ± 0.08 ns	0.48 ± 0.24 ns	0.77 ± 0.12 ns	0.53 ± 0.13 ns	0.61 ± 0.17 ns	0.83 ± 0.26 ns
MBNT15	0.04 ± 0.01 ns	0.07 ± 0.07 ns	0.05 ± 0.01 ns	0.06 ± 0.08 ns	0.04 ± 0.01 ns	0.02 ± 0.02 ns
Methylomirabilota	1.74 ± 0.47 ns	1.77 ± 0.47 ns	**1.87 ± 0.23 a**	**0.52 ± 0.51 b**	1.69 ± 0.18 ns	1.25 ± 0.54 ns
Myxococcota	2.59 ± 0.31 ns	2.81 ± 0.38 ns	2.85 ± 0.09 ns	3.42 ± 0.7 ns	2.66 ± 0.35 ns	2.63 ± 0.48 ns
NB1_j	0.01 ± 0.00 ns	0.01 ± 0.01 ns	**0.02 ± 0.01 a**	**0.00 ± 0.00 b**	0.02 ± 0.01 ns	0.00 ± 0.01 ns
Nitrospirae	1.22 ± 0.30 ns	1.71 ± 0.9 ns	1.74 ± 0.28 ns	2.9 ± 0.97 ns	1.64 ± 0.15 ns	2.18 ± 0.33 ns
Patescibacteria	0.31 ± 0.13 ns	0.92 ± 0.56 ns	2.2 ± 0.45 ns	3.55 ± 0.83 ns	0.73 ± 0.24 ns	1.11 ± 0.51 ns
Planctomycetes	1.53 ± 0.07 ns	1.37 ± 0.68 ns	1.87 ± 0.12 ns	1.95 ± 1.14 ns	1.79 ± 0.19 ns	1.67 ± 0.36 ns
Proteobacteria	23.23 ± 2.28 ns	23.4 ± 3.29 ns	24.02 ± 0.97 ns	22.31 ± 2.3 ns	23.98 ± 1 ns	23.29 ± 1.83 ns
RCP2_54	0.02 ± 0.01 ns	0.01 ± 0.01 ns	0.03 ± 0.01 ns	0.22 ± 0.22 ns	0.02 ± 0.01 ns	0.05 ± 0.03 ns
Verrucomicrobia	3.99 ± 1.04 ns	6.76 ± 3.48 ns	**4.71 ± 0.89 b**	**9.35 ± 1.24 a**	5.63 ± 0.53 ns	7.41 ± 1.28 ns
WPS_2	0.02 ± 0.01 ns	0.02 ± 0.03 ns	**0.03 ± 0.01 a**	**0.00 ± 0.00 b**	0.02 ± 0.01 ns	0.00 ± 0.00 ns
WS2	0.02 ± 0.00 ns	0.01 ± 0.01 ns	**0.01 ± 0.00 a**	**0.00 ± 0.00 b**	0.01 ± 0.01 ns	0.03 ± 0.03 ns

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by different letters (indicated in bold between light and heavy DNA of each plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, *p < 0.05*). ns : not significant.

Table S4. Relative abundance of bacterial genera in the light DNA (^{12}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the three rhizospheric soils are presented.

Light DNA			
	Wheat	Faba bean	Crimson clover
Aeromicrobium	0.04 ± 0.01 b	0.26 ± 0.07 a	0.06 ± 0.03 b
Agromyces	0.18 ± 0.02 a	0.11 ± 0.02 b	0.13 ± 0.04 ab
Amaricoccus	0.10 ± 0.02 a	0.06 ± 0.01 b	0.03 ± 0.02 b
Ampullimonas	0.01 ± 0 b	0.32 ± 0.28 a	0.01 ± 0.01 b
Bacteriovorax	0.01 ± 0.00 b	0.04 ± 0.01 a	0.01 ± 0.01 ab
Candidatus_Accumulibacter	0.05 ± 0.02 a	0.01 ± 0 b	0.02 ± 0.01 a
Cellulomonas	0.23 ± 0.03 a	0.18 ± 0.06 ab	0.14 ± 0.04 b
Dechloromonas	0.12 ± 0.05 a	0.03 ± 0.02 b	0.06 ± 0.04 ab
Denitratisoma	0.02 ± 0 b	0.06 ± 0.03 a	0.05 ± 0.02 ab
Dongia	0.26 ± 0.03 b	0.32 ± 0.01 a	0.32 ± 0.04 ab
Ellin6067	1.45 ± 0.09 a	1.16 ± 0.1 b	1.51 ± 0.13 a
Flectobacillus	0.01 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 ab	0.00 ± 0.00 b
Herbaspirillum	0.00 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
Humibacillus	0.05 ± 0.00 a	0.03 ± 0.01 b	0.03 ± 0.01 b
Labrys	0.05 ± 0.00 b	0.07 ± 0.01 a	0.04 ± 0.02 b
Lachnotalea	0.02 ± 0.01 a	0.01 ± 0.01 ab	0.00 ± 0.00 b
Lapillicoccus	0.21 ± 0.02 a	0.14 ± 0.03 b	0.15 ± 0.01 b
Leptothrix	0.01 ± 0.01 ab	0.04 ± 0.02 a	0.01 ± 0.01 b
Lysobacter	0.42 ± 0.07 a	0.28 ± 0.02 b	0.52 ± 0.18 ab
Magnetospirillum	0.05 ± 0.03 a	0.00 ± 0.00 b	0.01 ± 0.01 ab
Methylobacillus	0.00 ± 0.00 b	0.22 ± 0.07 a	0.03 ± 0.02 b
Methylophilus	0.00 ± 0.00 ab	0.03 ± 0.02 a	0.00 ± 0.00 b
Methylotenera	0.01 ± 0.01 b	0.13 ± 0.04 a	0.06 ± 0.05 ab
Micromonospora	0.11 ± 0.02 ab	0.12 ± 0.02 a	0.08 ± 0.01 b
Noviherbaspirillum	0.10 ± 0.02 b	0.2 ± 0.03 a	0.14 ± 0.03 ab
Novosphingobium	0.1 ± 0.1 ab	0.13 ± 0.05 a	0.01 ± 0 b
Oryzihumus	0.22 ± 0.02 a	0.18 ± 0.03 ab	0.19 ± 0.01 b
Paucibacter	0.00 ± 0.00 b	0.05 ± 0.02 a	0.00 ± 0.00 b
Pedococcus_Phycicoccus	0.2 ± 0.03 a	0.12 ± 0.02 b	0.11 ± 0.04 ab
Prosthecobacter	0.01 ± 0.01 ab	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 b
Pseudaminobacter	0.11 ± 0.01 a	0.09 ± 0 b	0.09 ± 0.02 ab
Pseudarthrobacter	0.96 ± 0.15 ab	0.82 ± 0.07 b	1.00 ± 0.01 a
Pseudolabrys	0.08 ± 0.00 b	0.09 ± 0.01 a	0.07 ± 0.02 ab
Pseudomonas	0.26 ± 0.12 b	0.75 ± 0.18 a	0.22 ± 0.02 b
Ramlibacter	0.56 ± 0.06 a	0.33 ± 0.04 b	0.53 ± 0.13 ab
Rhodoplanes	0.29 ± 0.03 a	0.23 ± 0.02 b	0.3 ± 0.05 ab
Rubrobacter	0.24 ± 0.05 a	0.20 ± 0.02 a	0.13 ± 0.03 b
Sorangium	0.02 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
uncultured_Methylophilaceae	0.00 ± 0.00 b	0.05 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 b
uncultured_Sphingomonadaceae	0.11 ± 0.01 ab	0.09 ± 0.01 b	0.17 ± 0.02 a
uncultured_Steroidobacteraceae	0.27 ± 0.02 a	0.27 ± 0.04 ab	0.19 ± 0.04 b
uncultured_Verrucomicrobiaceae	0.04 ± 0 b	0.06 ± 0.01 a	0.06 ± 0.03 ab
unidentified_Entomoplasmatales	0.01 ± 0.00 b	0.03 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 ab
unidentified_Saccharimonadales	0.22 ± 0.11 b	2.04 ± 0.43 a	0.61 ± 0.26 b
unidentified_Solirubrobacteraceae	0.01 ± 0.01 b	0.05 ± 0.02 a	0.02 ± 0.02 ab
unidentified_Tepidisphaerales	0.64 ± 0.03 b	0.83 ± 0.06 a	0.95 ± 0.09 a
unidentified_Thermomicrobiales	0.05 ± 0.02 b	0.07 ± 0.01 b	0.1 ± 0.01 a
unidentified_Thermomonosporaceae	0.00 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b
unidentified_uncultured_Elsterales	0.14 ± 0.04 a	0.15 ± 0.02 a	0.09 ± 0.01 b
unidentified_uncultured_Vicinamibacterales	5.57 ± 0.36 ab	5.41 ± 0.11 b	6.29 ± 0.56 a

Statistical data are expressed as means ± SD, ($n = 4$). Means in a line followed by different letters (between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

Table S5. Relative abundance of bacterial genera in the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the three rhizospheric soils are presented

Heavy DNA			
	Wheat	**Faba bean**	**Crimson clover**
Dokdonella	0.18 ± 0.09 ab	0.02 ± 0.03 b	0.27 ± 0.13 a
Gaiella	2.24 ± 1 ab	0.74 ± 0.38 b	2.76 ± 0.87 a
Lapillicoccus	0.51 ± 0.32 a	0.02 ± 0.03 b	0.10 ± 0.06 ab
Noviherbaspirillum	0.03 ± 0.03 b	0.51 ± 0.22 a	0.17 ± 0.12 ab
Pseudomonas	0.35 ± 0.37 ab	1.84 ± 0.76 a	0.37 ± 0.22 b
Solirubrobacter	0.56 ± 0.33 a	0.02 ± 0.03 b	0.48 ± 0.17 a
Sphingomonas	1.85 ± 0.34 a	0.83 ± 0.42 b	1.47 ± 0.55 ab
Streptomyces	1.92 ± 0.46 a	0.52 ± 0.39 b	1.86 ± 0.57 a
uncultured_Intrasporangiaceae	0.27 ± 0.18 ab	0.00 ± 0.00 b	0.57 ± 0.20 a
uncultured_Methyloligellaceae	1.77 ± 0.57 a	0.23 ± 0.34 b	1.20 ± 0.6 ab
uncultured_Microscillaceae	0.01 ± 0.02 b	0.5 ± 0.23 a	0.12 ± 0.12 ab
unidentified_Acidobacteria_Subgroup_11	0.26 ± 0.19 b	0.81 ± 0.08 a	0.45 ± 0.26 ab
unidentified_Actinobacteria	1.08 ± 0.79 a	0.10 ± 0.1 b	1.00 ± 0.42 a
unidentified_Blastocatellaceae	0.39 ± 0.3 b	1.64 ± 0.55 a	0.89 ± 0.22 ab
unidentified_Chloroflexi	3.84 ± 1.55 a	0.97 ± 0.37 b	3.00 ± 1.41 ab
unidentified_Nitrosomonadaceae	0.09 ± 0.05 b	0.02 ± 0.03 b	0.28 ± 0.08 a
unidentified_Saccharimonadales	0.3 ± 0.21 b	2.95 ± 0.62 a	1.01 ± 0.51 ab
unidentified_Solirubrobacterales	2.01 ± 0.86 a	0.59 ± 0.19 b	1.00 ± 0.27 ab
unidentified_uncultured_Gaiellales	3.37 ± 2 ab	0.99 ± 0.49 b	2.81 ± 0.5 a

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by different letters (between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, *p < 0.05*). ns : not significant.

Table S6. Intra-species comparison of the relative abundance of fungal phyla in the light DNA (^{12}C DNA) and the heavy DNA (^{13}C DNA) fractions of rhizospheric soils of wheat, faba bean and crimson clover separatly. Relative abundance is expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing

Wheat		
	Light DNA	**Heavy DNA**
Ascomycota	57.94 ± 8.3 ns	68.45 ± 14.82 ns
Basidiomycota	14.86 ± 10.65 ns	9.6 ± 11.13 ns
Chytridiomycota	2.86 ± 1.18 ns	3.33 ± 1.66 ns
Glomeromycota	1.04 ± 0.28 ns	1.07 ± 0.77 ns
Mortierellomycota	15.61 ± 4.2 ns	13.27 ± 5.62 ns
Mucoromycota	2.04 ± 0.76 ns	0.92 ± 1.37 ns
Faba bean		
	Light DNA	**Heavy DNA**
Ascomycota	59.44 ± 3.61 ns	57.83 ± 6.86 ns
Basidiomycota	6.76 ± 1.07 ns	8.13 ± 2.93 ns
Chytridiomycota	3.61 ± 1.49 ns	4.57 ± 1.44 ns
Glomeromycota	3.78 ± 1.1 ns	6.16 ± 2.61 ns
Mortierellomycota	18.61 ± 2.2 ns	14.01 ± 6.22 ns
Mucoromycota	3.01 ± 1.03 ns	2.88 ± 2.21 ns
Crimson clover		
	Light DNA	**Heavy DNA**
Ascomycota	56.62 ± 6.33 ns	57.75 ± 6.98 ns
Basidiomycota	12.43 ± 8.19 ns	12.2 ± 11.02 ns
Chytridiomycota	2.63 ± 1.32 ns	2.51 ± 1.26 ns
Glomeromycota	1.93 ± 0.78 ns	2.84 ± 2.29 ns
Mortierellomycota	19.19 ± 4.87 ns	20.77 ± 7.37 ns
Mucoromycota	2.41 ± 1.2 ns	0.87 ± 0.87 ns

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by ns (between light and heavy DNA of each species) are not significantly different (Kruskal-Wallis test, *p > 0.05*).

Table S7. Relative abundance of bacterial phyla in root of plant species. The relative abundance was expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing.

	Root bacterial phyla		
	Wheat	**Faba bean**	**Crimson clover**
Acidobacteria	**0.69 ± 0.14 a**	**0.1 ± 0.07 b**	**0.04 ± 0.02 b**
Actinobacteria	**11.29 ± 2.47 a**	**2.19 ± 2.19 b**	**0.57 ± 0.18 b**
Armatimonadetes	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Bacteroidetes	**20.09 ± 3.1 a**	**0.56 ± 0.35 b**	**0.09 ± 0.04 b**
Bdellovibrionota	**0.26 ± 0.07 a**	**0.01 ± 0.01 b**	**0.00 ± 0.00 b**
Chloroflexi	**0.81 ± 0.17 a**	**0.08 ± 0.06 b**	**0.05 ± 0.02 b**
Cyanobacteria	0.06 ± 0.06 ns	0.02 ± 0.01 ns	0.02 ± 0.03 ns
Desulfobacteria	**0.08 ± 0.02 a**	**0.01 ± 0.01 b**	**0.00 ± 0.00 b**
Entotheonellaeota	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Fibrobacteres	**0.02 ± 0.00 a**	**0 ± 0.00 b**	**0.00 ± 0.00 b**
Firmicutes	**2.79 ± 0.92 a**	**0.2 ± 0.11 b**	**0.13 ± 0.05 b**
Gemmatimonadetes	**0.09 ± 0.01 a**	**0.03 ± 0.02 ab**	**0.00 ± 0.00 b**
Halanaerobiaeota	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Latescibacteria	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
MBNT15	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Methylomirabilota	**0.01 ± 0.01 a**	**0.00 ± 0.00 ab**	**0.00 ± 0.00 b**
Myxococcota	**0.63 ± 0.09 a**	**0.38 ± 0.53 ab**	**0.04 ± 0.03 b**
NB1_j	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Nitrospirae	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Patescibacteria	**1.86 ± 0.49 a**	**0.04 ± 0.03 b**	**0.01 ± 0.00 b**
Planctomycetes	**0.14 ± 0.04 a**	**0.02 ± 0.02 b**	**0.01 ± 0.00 b**
Proteobacteria	**60.96 ± 5.77 b**	**96.33 ± 3.09 a**	**99.02 ± 0.32 a**
RCP2_54	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Verrucomicrobia	**0.21 ± 0.06 a**	**0.02 ± 0.02 b**	**0 ± 0.00 b**
WPS_2	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
WS2	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns

Statistical data are expressed as means ± SD, ($n = 4$). Means in a line followed by different letters (indicated in bold between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). ns: not significant.

Table S8. Relative abundance of bacterial genera in root of plant species. The relative abundance was expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the roots of plant species are showed.

Root bacterial genera			
	Wheat	Faba bean	Crimson clover
Acidibacter	0.45 ± 0.13 a	0.24 ± 0.2 ab	0.04 ± 0.04 b
Acidovorax	1.31 ± 0.84 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Actinoplanes	2.7 ± 0.39 a	0.41 ± 0.43 b	0.19 ± 0.05 b
Allorhizobium_Neorhizobium_Pararhizobium_Rhizobium	4.68 ± 0.41 b	92.55 ± 5.33 a	97.14 ± 0.65 a
Ampullimonas	0.97 ± 0.75 a	0.02 ± 0.01 b	0.06 ± 0.05 b
Azospirillum	0.73 ± 0.63 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Bdellovibrio	0.25 ± 0.08 a	0.01 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 b
Bradyrhizobium	1.78 ± 0.16 a	0.7 ± 0.65 ab	0.12 ± 0.08 b
Buttiauxella	1.05 ± 0.99 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Candidatus_Accumulibacter	0.55 ± 0.21 a	0 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 b
Candidatus_Glomeribacter	1 ± 0.42 a	0.05 ± 0.04 b	0.04 ± 0.02 b
Candidatus_Ovatusbacter	0.2 ± 0.02 a	0.12 ± 0.11 ab	0.02 ± 0.01 b
Caulobacter	1 ± 0.28 a	0.02 ± 0.01 b	0.01 ± 0.01 b
Cellulomonas	0.31 ± 0.2 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Chitinophaga	0.32 ± 0.37 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Chryseobacterium	0.23 ± 0.21 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Clostridium_sensu_stricto_9	0.33 ± 0.19 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Curvibacter	1.74 ± 0.98 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Devosia	0.9 ± 0.25 a	0.03 ± 0.02 b	0.01 ± 0 b
Dokdonella	0.57 ± 0.11 a	0.08 ± 0.1 b	0.02 ± 0.01 b
Dongia	0.29 ± 0.03 a	0.02 ± 0.02 b	0.01 ± 0.01 b
Duganella	6.65 ± 3.45 a	0.02 ± 0.01 b	0.01 ± 0 b
Enterobacter	3.46 ± 4.01 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Flavobacterium	15.29 ± 2.95 a	0.01 ± 0 b	0.02 ± 0.01 b
Flectobacillus	0.43 ± 0.15 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Kineosporia	0.6 ± 0.14 a	0.1 ± 0.13 b	0.04 ± 0.01 b
Leptothrix	0.39 ± 0.11 a	0.04 ± 0.02 b	0.02 ± 0.01 b
Massilia	0.62 ± 0.21 a	0.07 ± 0.05 b	0.03 ± 0.02 b
Mesorhizobium	0.26 ± 0.08 a	0.02 ± 0.01 b	0.01 ± 0 b
Methylobacillus	0.00 ± 0.00 b	0.07 ± 0.03 a	0.01 ± 0.01 ab
Mucilaginibacter	0.4 ± 0.09 a	0.01 ± 0 b	0.00 ± 0.00 b
Mycobacterium	0.21 ± 0.01 a	0.02 ± 0.01 b	0.01 ± 0 b
Neorhizobium	0.4 ± 0.22 a	0.01 ± 0.01 b	0.00 ± 0.00 b
Niastella	0.64 ± 0.36 a	0.38 ± 0.29 ab	0.01 ± 0.01 b
Nocardioides	0.25 ± 0.11 a	0.03 ± 0.03 b	0.01 ± 0 b
Novosphingobium	1.25 ± 0.95 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Other genera	-	-	-
Paucibacter	0.00 ± 0.00 b	0.01 ± 0.01 a	0.00 ± 0.00 ab
Pedobacter	0.47 ± 0.11 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Pelomonas	0.29 ± 0.07 a	0.03 ± 0.01 b	0.02 ± 0.02 b
Pelosinus	0.66 ± 0.4 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Polaromonas	0.42 ± 0.16 a	0.03 ± 0.03 b	0.01 ± 0.01 b
Pseudarthrobacter	0.56 ± 0.33 a	0.04 ± 0.05 b	0.00 ± 0.00 b
Pseudomonas	8.28 ± 4.92 a	0.01 ± 0.01 b	0.01 ± 0.01 b
Rhizobacter	4.58 ± 1.22 a	0.48 ± 0.18 b	0.17 ± 0.06 b
Rhodoferax	6.29 ± 2 a	0.01 ± 0 b	0.02 ± 0.01 b
Sphingomonas	0.89 ± 0.37 a	0.06 ± 0.04 b	0.01 ± 0.01 b
Streptomyces	4.64 ± 1.51 a	0.58 ± 0.65 b	0.21 ± 0.1 b
uncultured	0.33 ± 0.03 a	0.27 ± 0.38 ab	0.01 ± 0.01 b
uncultured_Burkholderiaceae	1.27 ± 0.44 a	0.09 ± 0.03 b	0.35 ± 0.4 ab
uncultured_Chitinophagaceae	1.17 ± 0.29 a	0.04 ± 0.01 b	0.02 ± 0.01 b
uncultured_Comamonadaceae	2.47 ± 0.8 a	0.61 ± 0.26 b	0.59 ± 0.19 b
uncultured_Roseiflexaceae	0.53 ± 0.12 a	0.06 ± 0.04 b	0.04 ± 0.01 b
unidentified_Comamonadaceae	0.25 ± 0.16 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
unidentified_Entomoplasmatales	0.79 ± 0.27 a	0.17 ± 0.11 b	0.12 ± 0.05 b
unidentified_Polyangiales	0.32 ± 0.07 a	0.09 ± 0.12 ab	0.02 ± 0.02 b
unidentified_Saccharimonadales	1.82 ± 0.49 a	0.03 ± 0.03 b	0.01 ± 0 b
unidentified_uncultured_Vicinamibacteraceae	0.2 ± 0.06 a	0.02 ± 0.03 b	0.01 ± 0.01 b
unidentified_uncultured_Vicinamibacterales_	0.22 ± 0.05 a	0.02 ± 0.02 b	0.01 ± 0.01 b
Variovorax	0.53 ± 0.15 a	0.05 ± 0.02 b	0.02 ± 0.01 b

Statistical data are expressed as means ± SD, (n = 4). Means in a line followed by different letters (between species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

Table S9. Relative abundance of fungal phyla in root of plant species. The relative abundance was expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing.

Root DNA fungal phyla			
	Wheat	**Faba bean**	**Crimson clover**
Ascomycota	55.94 ± 9.52 ns	44.79 ± 28.13 ns	27.14 ± 36.43 ns
Basidiomycota	6.52 ± 8.41 ns	33.33 ± 31.94 ns	22.14 ± 33.21 ns
Chytridiomycota	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Glomeromycota	**12.64 ± 4.2 ab**	**20.49 ± 15.63 a**	**0.71 ± 1.07 b**
Mortierellomycota	1.42 ± 1.91 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns
Mucoromycota	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns	0.00 ± 0.00 ns

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by different letters (indicated in bold between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, *p < 0.05*). ns: not significant.

Table S10. Relative abundance of fungal genera in root of plant species. The relative abundance was expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the roots of plant species are showed.

Root fungal genera			
	Wheat	**Faba bean**	**Crimson clover**
Amaurodon	2.83 ± 1.06 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Archaeospora	0.14 ± 0.14 b	15.63 ± 12.15 a	0.00 ± 0.00 b
Ceratocystis	2.78 ± 1.36 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Cirrenalia	1.42 ± 1.71 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Microdochium	1.7 ± 0.65 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Plenodomus	1.92 ± 1.04 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
Serendipita	6.61 ± 2.43 a	0.00 ± 0.00 b	0.71 ± 1.07 ab
Trematosphaeria	4.72 ± 5.36 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
unidentified_Ascomycota	5.63 ± 1.66 a	31.94 ± 31.94 ab	0.71 ± 1.07 b
unidentified_Ceratobasidiaceae	1.32 ± 0.73 a	11.81 ± 16.32 ab	0.00 ± 0.00 b
unidentified_Fungi	23.47 ± 10.44 a	0.69 ± 1.04 b	0.00 ± 0.00 b
unidentified_Hymenochaetales	1.81 ± 0.27 a	20.83 ± 31.25 ab	0.00 ± 0.00 b
unidentified_Pleosporales	2.87 ± 1.45 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b

Statistical data are expressed as means ± SD, (*n = 4*). Means in a line followed by different letters (between plant species) are significantly different (Kruskal-Wallis test, *p < 0.05*).

Table S11. Pearson correlation showing the relations between plant functional traits and bacterial as well as fungal genera from heavy DNA. Only the genera presenting significant diffrences among rhiszospheric soils of the three plant species are presented.

Heavy DNA bacterial genera						
	Ms Shoot	Ms Root	Shoot:Root	LDMC	SLA	RDMC
unidentified_uncultured_Gaiellales	-0.59	-0.55			0.67	
Pseudomonas	0.77	0.81		-0.60	-0.77	
uncultured_Microscillaceae	0.71	0.58		-0.77		-0.59
Dokdonella	-0.58	-0.59		0.77		
uncultured_Methyloligellaceae	-0.62			0.59		0.66
Sphingomonas						
unidentified_Acidobacteriota_Subgroup_11	0.70	0.68			-0.70	-0.61
Lapillicoccus						0.66
Gaiella		-0.60		0.61	0.76	
unidentified_Blastocatellaceae	0.69	0.60		-0.66		-0.65
unidentified_Chloroflexi	-0.61				0.72	0.59
unidentified_Saccharimonadales	0.88	0.89		-0.71	-0.82	-0.68
Solirubrobacter	-0.74	-0.71		0.63	0.74	
Streptomyces	-0.77	-0.72		0.67	0.76	
unidentified_Actinobacteriota	-0.58				0.72	
unidentified_Nitrosomonadaceae			0.72	0.73	0.61	
Noviherbaspirillum	0.62	0.60		-0.66	-0.63	
unidentified_Solirubrobacterales	-0.58					0.60
uncultured_Intrasporangiaceae	-0.60	-0.69	0.60	0.70	0.76	
Heavy DNA fungal genera						
Archaeospora	0.58					

The pearson correlation coefficient r is only indicated for relationships that are significantly different *p < 0.05.*

Chapitre V :

Discussion générale

Dans la perspective d'une gestion durable et responsable des sols, la mise en place de modes de production répondant aux enjeux environnementaux actuels est devenue essentielle pour les agroécosystèmes. Cette démarche est d'autant plus importante pour une agriculture qui doit faire face à une démographie croissante et qui demeure dépendante de la fertilisation chimique (Le Noë *et al*., 2019; Dedieu et Prados, 2022). L'utilisation massive d'engrais chimiques posent à la fois de très gros problèmes environnementaux et économiques car leur prix est influencé par les fortes fluctuations des prix des énergies fossiles nécessaires à la production d'engrais azotés (Lecuyer *et al.*, 2013; Sainju *et al.*, 2019). L'unité d'azote a augmenté de 1,35€ pour la campagne 2021-2022 en comparaison avec la campagne précédente ce qui représente une augmentation des charges de l'ordre +181€/ha pour le seul poste des engrais azotés (Crespe *et al.*, 2022). Ces augmentations qui pourraient s'inscrire dans la durée ne sont pas sans incidences sur la filière agro-alimentaire française.

La mise en place de systèmes de cultures utilisant des Fabacées (légumineuses) est une solution agronomique pour la réduction de la dépendance de la production agricole vis-à-vis des engrais de synthèse (Vertes *et al.*, 2010; Voisin *et al.*, 2013*b*; Meena *et al.*, 2018*a*). En effet, grâce à leur capacité physiologique à utiliser le N_2 atmosphérique à travers une symbiose racinaire aux bactéries fixatrice d'azote du genre *Rhizobium* (Voisin et Gastal, 2015; Raza *et al*., 2020), les Fabacées de grandes cultures et les Fabacées fourragères fixent de 24 à 45 millions de tonnes d'N atmosphérique par an (Herridge *et al*., 2008). Dans ce contexte, les Fabacées peuvent contribuer, en plus de leur intérêt environnemental de diminution des émissions de N_2O (Schmeer *et al.*, 2014), au renforcement de la sécurité alimentaire par la fourniture d'azote aux agrosystèmes et la réduction des coûts de production. Il existe actuellement un certain nombre d'incitations financières que ce soit au niveau européen, national, ou régional qui tendent à favoriser leur plus large utilisation (Duflot, 2018; Jouan, 2020; Lautre, 2020). En effet, la politique agricole commune (PAC) de 2013 inclut par exemple des aides couplées à la production de protéines végétales et des mesures agroenvironnementales et climatiques (MAEC) pour les agriculteurs qui adoptent des pratiques favorables à l'environnement et au climat avec notamment l'intégration des Fabacées dans les systèmes de cultures et d'élevage (Bourget, 2016; Cholez, 2016). La PAC vise également une autonomie en protéines végétales au niveau européen afin de réduire les importations européennes. En France, cette démarche s'est faite notamment par le biais du plan protéines végétales. Ce plan a financé différents projets de recherche et d'innovation ainsi que la structuration de nouvelles filières pour la production et la valorisation de Fabacées pour l'alimentation animale ou humaine.

Les Fabacées suscitent ainsi des intérêts divers, elles contribuent également à de nombreux services écosystémiques et participent notamment au couplage du cycle de l'N et du C (People *et al.*, 2009; Cellier *et al.*, 2015; Voisin *et al.*, 2017; Bozino *et al.*, 2021). En plus de la fourniture d'N pour les cultures suivantes ou les cultures associées, d'autres avantages sont associés à la présence des Fabacées dans les systèmes de culture avec notamment une amélioration du stockage du carbone dans les sols (McDaniel *et al.*, 2014; Stagnari *et al.*, 2017; Veloso *et al.*, 2019). Cette source de carbone est essentielle pour la structure et la qualité du sol (Kumar *et al.*, 2018). Ces éléments favorisent la biodiversité et la fertilité des sols cultivés. Ainsi dans le cadre de cette thèse, les travaux développés ont porté particulièrement sur le déterminisme de la fourniture de carbone et d'azote dans les sols par les Fabacées à travers la rhizodéposition. Ces plantes sont composées (1) de protéagineux (féverole et pois) majoritairement utilisées sous forme de cultures annuelles (Cholez et Magrini, 2014; Pelzer *et al.*, 2014), bien qu'elles sont utilisées aussi en tant que cultures intermédiaires (Scheider *et al.*, 2015; Bedoussac *et al.*, 2018) et (2) de cultures fourragères pérennes (trèfle blanc et trèfle incarnat) généralement en mélanges dans les prairies pour le pâturage ou comme couverts végétaux (Julier et Huyghe, 2010; Pelletier *et al*., 2016).

Différentes études abordent les flux de carbone et d'azote liés aux cultures des Fabacées, plus particulièrement les apports en N ont fait l'objet de nombreuses études concernant les résidus de culture et/ou de rhizodéposition (Mahieu, 2008; Zang *et al*., 2018; Hupe *et al*., 2019; Rezgui *et al*, 2020). La part de ces flux allouée au compartiment souterrain (biomasse racinaire et rhizodéposition) et les facteurs qui y contribuent restent cependant insuffisamment connus en raison de la difficulté à accéder au système racinaire *in situ*. Mieux connaitre ces flux nécessite également des comparaisons multi-espèces d'une part pour une meilleure pertinence dans les choix des espèces pour les services écosystémiques rendus (Guinet *et al.*, 2020*a*) et d'autre part pour mieux comprendre le processus de rhizodéposition (Prieto *et al.*, 2016; Pausch et Kuzyakov, 2017; Vives-Peris *et al.*, 2020). Une partie de ces travaux de thèse a été consacrée à la mise en œuvre d'une méthode permettant d'estimer sur un même échantillonnage de sol la rhizodéposition du C et de l'N (CdfR et NdfR) d'origine atmosphérique chez différentes Fabacées aux usages variés. L'estimation du CdfR et de l'NdfR a été réalisée sur la base d'un couplage de marquage isotopique $^{13}CO_2$/dilution ^{15}N dans le sol. Ces travaux, bien qu'ils n'aient pas été conduits en plein champ, apportent néanmoins une bonne indication sur la capacité de rhizodéposition des espèces de Fabacées étudiées et ont permis de comparer ces espèces dans des conditions identiques.

La rhizodéposition de l'N issu de la fixation symbiotique et du C issu de la fixation du CO_2 atmosphérique par les plantes est reconnue comme l'un des facteurs du déterminisme des communautés microbiennes du sol (Paterson *et al*., 2007; Nannipieri *et al*., 2008; Guyonnet *et al.*, 2018b). Ces microorganismes, acteurs essentiels des processus et cycles biogéochimiques dans le sol, vont en effet transformer ces rhizodépôts et moduler la disponibilité des nutriments dans le sol *via* leurs activités enzymatiques (Anderson *et al*., 2011; Bowles *et al*., 2014; Dini-Andreote et van Elsas, 2019). Ainsi la seconde partie des travaux de cette thèse se sont intéressés aux conséquences de la rhizodéposition du C et de l'N des espèces de Fabacées étudiées, sur la diversité et les activités des communautés microbiennes du sol. En effet, une meilleure compréhension des flux du C et de l'N dans le système plante-sol-microorganismes et des multiples processus impliqués dans cette boucle d'interaction constitue un levier agronomique majeur dans l'amélioration des systèmes de cultures.

1. Estimation de la rhizodéposition du C et N : étude des flux d'origine atmosphérique et analyse des facteurs de déterminisme.

1.1. Détermination d'une méthode d'estimation adaptée

L'estimation quantitative des rhizodépôts est généralement réalisée par des approches de marquage isotopique en fonction des éléments ciblés [^{15}N, ^{13}C ou encore plus récemment ^{33}P (Wichern *et al.*, 2007; Fustec *et al.*, 2010; Stevenel *et al.*, 2019)]. Nous avons mis en place une étude (**Chapitre IV A**) afin de comparer deux méthodes de marquage au ^{15}N permettant de réaliser un couplage de marquage $^{13}C/^{15}N$ pendant un cycle cultural complet des espèces étudiées. Une comparaison a été réalisée entre un marquage en solution apportée au niveau foliaire (urée ^{15}N) et un marquage du substrat de culture (dilution isotopique ^{15}N). D'autres méthodes qui permettent d'estimer la rhizodéposition de l'N (Fustec *et al.*, 2010 ; Oburger et Jones, 2018). Cependant, la technique du split-root est difficilement utilisable en pots (Oburger et Jones, 2018), et la technique du « cotton-wick » est très difficilement utilisable sur des trèfles, dont les tiges sont fines. Les résultats montrent qu'en comparaison avec l'approche de dilution isotopique, l'usage du marquage foliaire entraîne une répartition moins homogène du ^{15}N dans les tissus végétaux qui est fortement lié au stade phénologique. En effet, avec le marquage foliaire, les parties aériennes sont 2 à 6 fois plus riches en ^{15}N par rapport aux racines selon les espèces. Ces observations confirment un fort effet de l'espèce sur l'assimilation du ^{15}N et de la surface de contact de l'organe marqué avec la solution d'urée ^{15}N en lien avec la différence de morphologie entre les espèces (Yasmin *et al.*, 2006; Wichern *et al.*, 2008). Inversement, la méthode par dilution isotopique nous a permis d'obtenir un enrichissement en ^{15}N proche entre les espèces. Pour atteindre une meilleure homogénéité avec le marquage foliaire, il est

nécessaire d'avoir une continuité du marquage en solution (Mahieu *et al.*, 2009). Cette approche est difficile à mettre en œuvre sur un cycle de culture complet dans la mesure où l'organe marqué est nécrosé à l'issu de chaque apport de marquage.

En comparaison, la méthode par dilution isotopique du ^{15}N n'est pas toxique pour les organes végétaux et peut être utilisée sur une plus longue période. Elle permet également de quantifier plus spécifiquement le flux d'N atmosphérique vers le compartiment souterrain *via* la rhizodéposition ou l'allocation d'N atmosphérique au compartiment racinaire. Cependant, cette méthode peut être contrainte par l'apport initial de ^{15}N, qui est une source d'azote pouvant retarder l'établissement de la fixation symbiotique chez les Fabacées (Luciński *et al.*, 2002; Voisin et Gastal, 2015). L'ensemble des résultats présentés ici montre également que l'utilisation de la méthode de dilution isotopique pour mesurer la rhizodéposition de l'N atmosphérique a d'autres limites. Elle est basée sur l'incorporation d'azote atmosphérique pauvre en ^{15}N dans un sol plus riche en ^{15}N et nos résultats obtenus avec le blé montrent que l'absorption d'N soluble par les plantes peut également réduire la proportion de ^{15}N dans le sol, dans le cas où la fraction soluble de l'N du sol est plus riche en ^{15}N que la fraction insoluble. Bien que le ^{15}N ait été apporté 6 ans avant l'expérimentation et que le sol ait également été enrichi en saccharose pour stimuler l'organisation de l'N minéral par la microflore (Giller et Witty, 1987; Khan *et al.*, 2002), nous n'avons pas obtenu un sol marqué de manière homogène entre les fractions soluble et insoluble de l'N du sol. C'est pourquoi l'estimation de la rhizodéposition de l'N atmosphérique mise au point dans ce travail a nécessité également la prise en compte des quantités d'N absorbées par les plantes. La méthode de la dilution isotopique du ^{15}N dans le sol, plus facilement utilisable en double marquage $^{13}CO_2/^{15}N$, a donc été privilégiée pour l'estimation et l'analyse comparative du C et de l'N issus de la rhizodéposition (CdfR et NdfR) chez les espèces étudiées dans ce travail. Ce couplage s'appuie ainsi sur la capacité physiologique des plantes à utiliser le CO_2 et le N_2 atmosphériques, permettant de couvrir l'ensemble d'un cycle de culture. De plus cette approche est bien adaptée dans le cadre d'une comparaison multi-espèces.

1.2. Évaluation conjointe du C et N alloués à la rhizodéposition

Le processus de la rhizodéposition repose sur la diffusion de différents types de composés à partir des tissus racinaires vivants et en fin de cycle (Uren, 2001), il est donc crucial de l'estimer en tenant compte de toutes les composantes incluant l'exsudation, l'émission de mucilage et de cellules de bordure et la décomposition de cellules racinaires (Jones et al. 2009, Pausch et Kuzyakov, 2018). Cela passe ainsi par des études couvrant le cycle de croissance

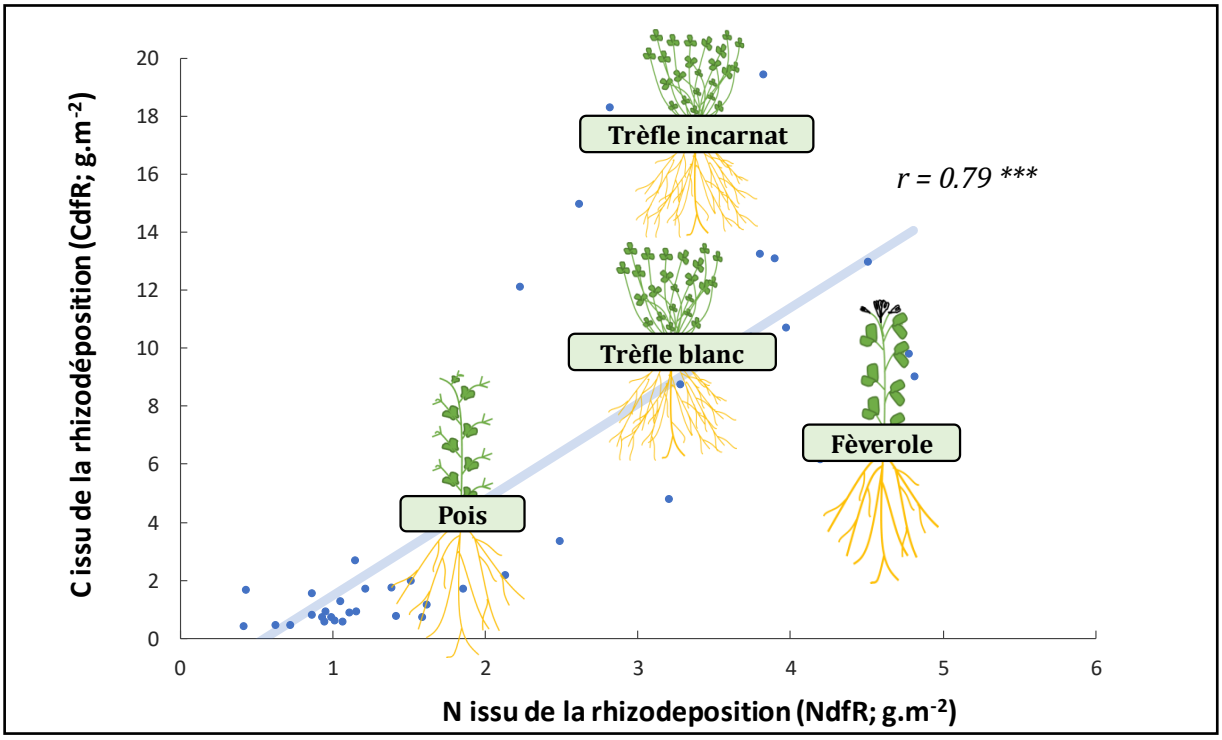


Figure 30 : Mise en relation entre la rhizodéposition du C et N pour les 4 espèces de Fabacées étudiées. Les différentes espèces sont positionnées par rapport à leurs quantités de C et N rhizodéposées pendant le développement reproducteur.

complet des plantes. Les sources C et N provenant de la rhizodéposition (CdfR et NdfR) sont d'importance écologique car c'est d'une part, une perte de C organique pour la plante évalués entre 20 et 35 % du C fixé (Pausch et Kuzyakov, 2018) et d'autre part de composés N, évalués entre 4 et 74% de l'N des plantes (Fustec *et al.*, 2010). Cependant ces éléments constituent un flux d'intrant pour la matière organique et alimentent la microflore du sol, qui est impliquée dans les activités biologiques et donc la fertilité du sol (Balesdent *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020*b*; Villarino *et al.*, 2021). Il existe également une relation linéaire entre les quantités de C et N dans le sol (Cleveland et Liptzin, 2007), indiquant une interconnexion de leur dynamique dans les processus du sol (Cellier *et al.*, 2019). Pourtant, les études réalisées pour mesurer les flux de C et d'N de l'atmosphère vers le sol à travers la rhizodéposition demeurent peu nombreuses (Wichern *et al.*, 2007; Zang *et al.*, 2018; Hupe *et al.*, 2019). L'approche utilisée ici a permis de déterminer sur le même échantillonnage les sources de C et N du sol provenant de la rhizodéposition chez différentes espèces de Fabacées à savoir le pois, la féverole, le trèfle incarnant et le trèfle blanc (**Chapitre IV B**). En effet, le recours au marquage hebdomadaire au $^{13}CO_2$ et la mesure de l'incorporation de l'N d'origine atmosphérique dans le sol ont permis de mesurer les flux de ces éléments de l'atmosphère vers le sol (rhizodéposition) *via* la photosynthèse ou la fixation biologique du N_2. Cette estimation ne concerne que la rhizodéposition nette, qui correspond à la différence entre la rhizodéposition brute (ou totale) et la part d'éléments réabsorbés par les plantes ou libérés dans l'atmosphère par respiration racinaire et microbienne.

Conformément à la première hypothèse de ce travail, la rhizodéposition du C est proportionnelle à la rhizodéposition de l'N. Les résultats obtenus indiquent une relation linéaire ($r = 0.79$) entre la rhizodéposition des 2 éléments (**Figure 30**) et suggèrent que les plantes présentant une forte capacité de rhizodéposition carbonée ont également une forte capacité de rhizodéposition azotée. Les analyses montrent aussi que les différences entre les espèces sont plus prononcées pendant le développement reproducteur. Ce résultat s'explique par la corrélation forte qui existe entre la rhizodéposition et la croissance des plantes. En effet, il est rapporté dans la littérature qu'un taux de croissance élevé des plantes est souvent associé à une rhizodéposition C et N élevée (Johnen et Sauerbeck, 1977; Lu *et al.*, 2002; Guyonnet *et al.*, 2018a). Nos résultats montrent cependant dans certains cas des capacités de rhizodéposition différentes en C et N pour la même espèce. En effet, les deux Fabacées fourragères (plus particulièrement le trèfle incarnat) sont caractérisées par une plus forte rhizodéposition du C en $g.m^{-2}$ pendant le développement reproducteur. Inversement, la féverole a l'apport le plus

important en ce qui concerne la rhizodéposition de l'N. Nos résultats montrent donc que, même si la rhizodéposition de l'N tend à augmenter avec celle du C, la relation n'est pas absolue entre les 2 éléments. Le pois a présenté la rhizodéposition ($g.m^{-2}$) la plus faible pour les deux éléments par rapport à la féverole, le trèfle blanc et le trèfle incarnat. La comparaison simultanée de ces quatre espèces n'est pas rapportée dans la littérature mais il est bien établi que les trèfles et la féverole ont une bonne capacité de rhizodéposition (Høgh-Jensen et Schjoerring, 2001; Paynel *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2019; Guinet *et al.*, 2020). Aussi, la féverole a déjà été caractérisée par une quantité plus élevée d'N rhizodéposé en comparaison avec le pois (Mayer *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2020*b*).

Le blé a été utilisé comme espèce témoin non fixatrice du N_2 mais pour laquelle nous avons pu quantifier la rhizodéposition du C et cette espèce a rhizodéposé des quantités de C proches de celles du pois. Une observation similaire a été établie entre le pois et une autre céréale (avoine) (Wichern *et al.*, 2007). Une autre étude a par ailleurs montré que le C rhizodéposé pouvait être plus élevé chez le blé par rapport au pois dans des conditions de CO_2 élevé (Butterly *et al.*, 2015). Ces résultats confirment ceux présentés dans la méta-analyse réalisée par Pausch et Kuzyakov (2018) et qui montre que les espèces dont les variétés sont sélectionnées depuis de très nombreuses années tendent à avoir des rapports parties aériennes sur racines élevés et donc une faible rhizodéposition. Cela est confirmé par les ratios « shoot : root » observés chez le blé et le pois dans notre étude. Ainsi, comme le rapportent certains travaux antérieurs (Jones *et al.*, 2004; Arcand *et al.*, 2013; Zang *et al.*, 2015), le CdfR et l'NdfR diffèrent considérablement entre les espèces suivant leur stade de développement. Cependant, les estimations par unité de surface sont à analyser avec précaution par rapport à une situation au champ car la densité racinaire des plantes varie fortement en fonction des conditions de culture. Dans cette optique, il est plus pertinent de prendre en compte les résultats de cette étude en matière de proportion (%) des éléments alloués aux différents compartiments. Les quantités de C ou N nouveaux ont été exprimés dans chaque compartiment en fonction des quantités totales de C ou N total fixées dans le système plante sol.

La répartition des ressources C et N, plus particulièrement l'allocation aux racines est fortement dépendant de l'état phénologique de la plante. Les ressources allouées aux racines augmentent pendant le stade végétatif, puis diminuent lors du développement reproducteur avec une mobilisation des ressources pour les organes reproducteurs (Schaffer *et al.*, 1982; Rossato *et al.*, 2001; Voisin *et al.*, 2003*a*). La rhizodéposition des ressources C et N de la plante vers le sol est dépendante du contenu en C et N des racines et de la proportion de ces éléments libérés par les racines au cours de la croissance de la plante (Nguyen, 2003; Jones *et al.*, 2009). Une

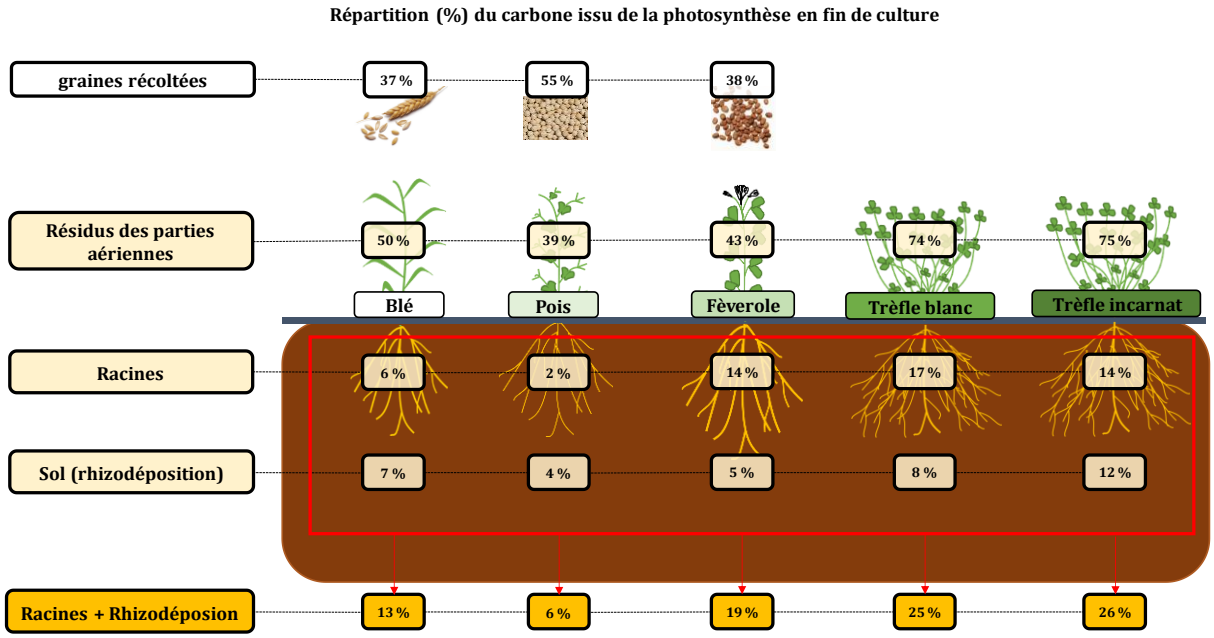


Figure 31 : Répartition (%) du carbone issu de la fixation photosynthétique dans le système plante-sol des espèces de Fabacées étudiées en fin de culture (stade reproducteur).

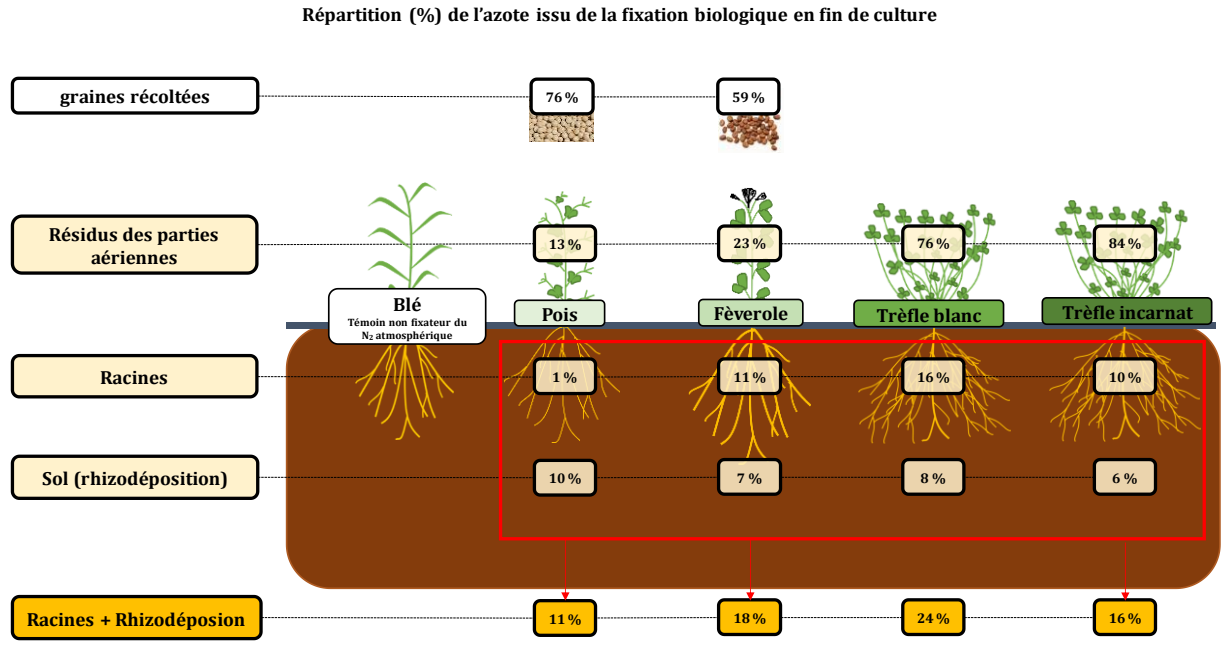


Figure 32 : Répartition (%) de l'azote issu de la fixation atmosphérique dans le système plante-sol des espèces de Fabacées étudiées en fin de culture (stade reproducteur).

proportion importante du C fixé pendant la photosynthèse peut être transférée vers le compartiment souterrain. Concernant ce transfert de C vers le sol, une analyse comparative entre des espèces de grandes cultures et des espèces prairiales montre que les espèces de prairie présentent une plus grande allocation de C au compartiment souterrain (33 % du C total net fixé) par rapport aux espèces de grandes cultures (21 % du C total net fixé) (Pausch et Kuzyakov, 2018). Cette allocation peut changer en fonction des conditions environnementales et de gestion des cultures qui peuvent affecter la croissance des plantes (Crawford *et al*., 2000; Yang et Midmore, 2005; Wang *et al.*, 2021). Dans ce travail de thèse, la détermination des proportions de C fixé dans les différents compartiments par rapport au C total fixé en fin de culture montre les mêmes tendances (**Figure 31**). En effet, les espèces de grande culture allouent entre 37 et 55% C fixé aux réserves grainières, et le pois présente la plus forte proportion. Ces espèces allouent vers le compartiment souterrain (Racines + sol), entre 6 et 19% du C fixé et cette proportion est plus forte chez la féverole en raison d'une forte production de biomasse racinaire. Chez deux espèces de trèfle étudiées ici, 25% et 26% du C fixé sont alloués au sous-sol respectivement pour le trèfle blanc et le trèfle incarnat. Ces proportions restent ainsi proches de celles observées dans la littérature. La répartition du C fixé des racines vers le sol varie très fortement entre 26% pour la féverole à 66% pour le pois. La forte différence de proportion entre les 2 protéagineuses peut s'expliquer par une forte contribution des racines fines du pois par rapport à la féverole (Mayer *et al.*, 2003).

La répartition de l'N fixé dans le système plante-sol est bien documenté et notamment dans le cadre de la compréhension des flux d'N dans les systèmes de rotation ou d'association culturale incluant les Fabacées. On estime que l'N alloué au compartiment souterrain peut varier de 14% à 68% du N total en fonction des espèces de Fabacées (McNeill *et al*., 1997; Khan *et al*., 2003; Mayer *et al.*, 2003; Wichern *et al.*, 2007). Dans notre étude (**Figure 32**), le trèfle blanc, la féverole et le trèfle incarnat ont alloué respectivement 24, 18 et 16% du N total fixé au compartiment souterrain. Cette proportion est de 11% pour le pois. Comme pour le C, la production des graines est caractérisée par une exportation plus importante d'N dans les graines chez le pois (74%) par rapport à la féverole (59%). Dans le compartiment souterrain, entre 33 et 90% de l'N est constitué par les rhizodépots et comme pour le C, le pois a eu la proportion la plus importante. Des proportions très variables entre 48 et 82% ont également été rapportées dans la littérature chez le pois (Jensen, 1996*a*; Mayer *et al.*, 2003; Schmidtke, 2005). Cela suggère une contribution importante des débris racinaires chez le pois. Ces résultats peuvent s'expliquer par les différences de cycle phénologique entre les espèces annuelles (pois et

féverole) et pérennes (trèfle blanc et trèfle incarnat) (Vertès *et al.*, 2015 ; Louarn *et al.*, 2016). En effet, les plantes annuelles se caractérisent par une plus forte décomposition de leurs racines après le remplissage des graines tandis que les plantes pérennes renouvellent continuellement leur racines car les organes aériens porteur des racines restent vivants plus longtemps (Kichah, 2016).

Certains auteurs rapportent que les proportions de C et N allouées à la rhizodéposition sont plus importantes en champs par rapport à ce qui est retrouvé en conditions contrôlées chez le pois et la féverole, en cause notamment l'expansion limitée du système racinaire (Mahieu *et al.*, 2009; Hupe *et al.*, 2019). Le développement racinaire et la rhizodéposition mesurés ici en conditions contrôlées peuvent effectivement avoir été limités par la taille des pots ce qui pourrait conduire à une sous-estimation de ce que l'on pourrait retrouver en plein champ.

1.3. Performance des plantes : détermination de la rhizodéposition spécifique

L'ensemble des résultats précédents montrent ainsi que la rhizodéposition dépend de la croissance des espèces et de la distribution des ressources entre les parties aériennes et souterraines. La détermination de la rhizodéposition spécifique par unité de C ou N atmosphérique incorporé (CdfR et NdfR spécifique) dans le système plante-sol a également montré des performances contrastées entre les espèces. Par rapport au stade de développement des plantes, le CdfR spécifique varie faiblement entre le stade végétatif et le développement reproducteur, alors que le NdfR spécifique diminue fortement entre les deux stades. Ces observations suggèrent que la contribution de l'exsudation du C est encore effective pendant le développement reproducteur (en plus de la senescence) par rapport à l'N pour lequel la diminution du NdfR spécifique peut s'expliquer par une diminution de l'exsudation de l'N (Arcand *et al.*, 2013). En fin culture, les Fabacées fourragères présentent une plus forte rhizodéposition du C en raison de leur forte allocation de C fixé au compartiment souterrain. Ces plantes sont connues pour leur contribution importante au stockage du carbone dans le sol (Todorovic *et al.*, 1999; McNally *et al.*, 2015; Loges *et al.*, 2018; Amsili et Kaye, 2021). En particulier, le trèfle incarnat a déjà été décrit comme ayant une plus forte rhizodéposition du C par rapport au triticale (Amsili, 2018). Au regard de l'N, un profil différent est trouvé, le pois est l'espèce la plus performante et l'espèce la moins performante est le trèfle incarnat. Ces observations se rapprochent de celles de Hupe *et al*. (2018) avec des profils différents entre le CdfR et l'NdfR : un flux régulier de C, dû à l'exsudation et à la sénescence des racines (du stade végétatif à la maturité), et un flux d'N susceptible d'être influencé par sa réabsorption par la plante pendant la phase de maturation. La faible performance des trèfles pourrait ainsi s'expliquer par une plus forte réabsorption d'N exsudé par les plantes (Jones *et al.*, 2004).

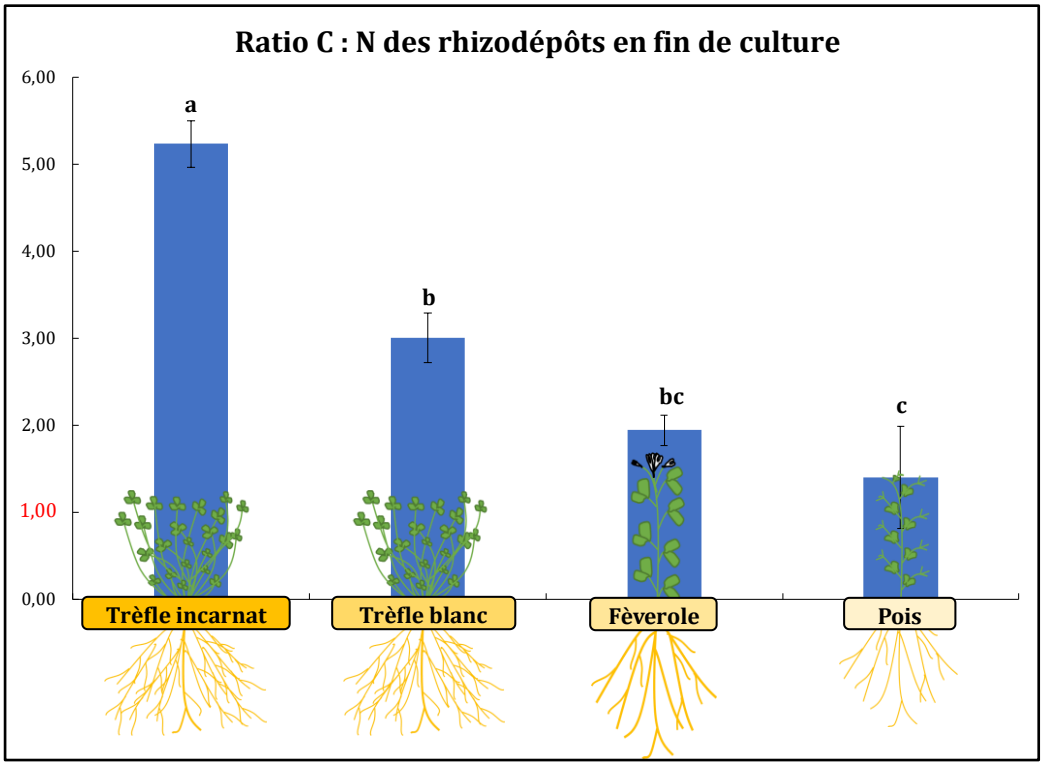


Figure 33 : Ratios C:N des rhizodépots des différentes Fabacées étudiées en fin de culture (stade reproducteur).

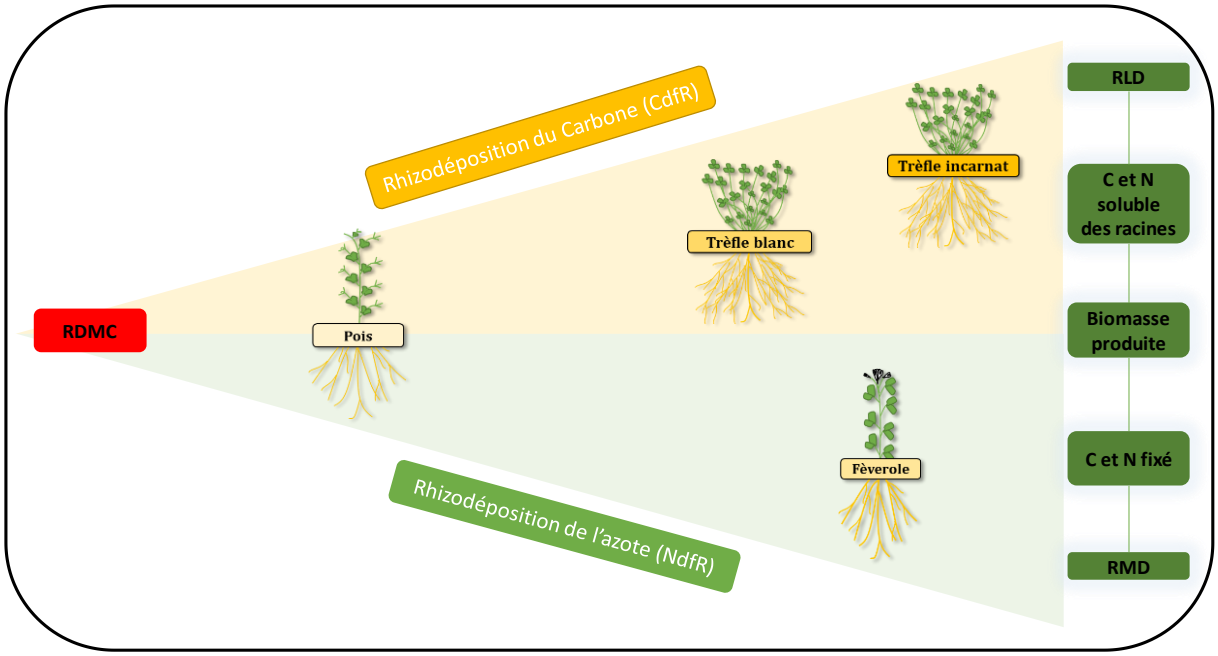


Figure 34 : Principales relations entre traits fonctionnels et la rhizodéposition du C et l'N.

RMD: Root Mass Density; RLD: Root Length Density; RDMC: Root Dry Matter Content
La rhizodéposition du C et N est positivement influencé par les traits encadrés en vert et inversement lié au trait encadré en rouge.

La performance du pois est due à une contribution plus importante des tissus racinaires, l'N des racines récoltées représentant seulement 10% de l'N souterrain. La détermination du ratio C : N des rhizodépots (**Figure 33**) montre que le pois présente le ratio le plus faible indiquant ainsi des rhizodépots riches en N pendant le développement reproducteur. Inversement, les deux espèces de trèfle ont présenté des rhizodépots pauvre en N et confirme la possibilité de réabsorption d'N pendant la croissance comme indiqué chez le soja par Zang et al. (2018). Les résultats de cette étude suggèrent que le CdfR et l'NdfR sont contrôlés par des traits différents, en particulier pendant le développement reproducteur. Les traits fonctionnels des plantes ont ainsi été étudiés afin de comprendre le déterminisme de la rhizodéposition de ces 2 éléments.

1.4. Déterminisme de la rhizodéposition du C et N

La rhizodéposition est un processus complexe et dynamique qui peut être affecté par de nombreux facteurs, tels que le stade de croissance et la variété des plantes, les propriétés du sol et les conditions expérimentales (Jones *et al*., 2004; Wichern *et al*., 2008; Fustec *et al*., 2010; Rasmussen, 2011). Dans ce contexte, cette étude s'est intéressée à l'identification des facteurs explicatifs des niveaux de rhizodéposition contrastés, lors d'une comparaison multi-espèces. Il s'agissait ici de répondre à la seconde hypothèse de ce travail de thèse qui précisait que la rhizodéposition pouvait être associée aux traits morphologiques et physiologiques des plantes. En effet, les trèfles se caractérisent par une forte production de biomasse pendant le développement reproducteur, par des tissus de meilleure qualité qui présentent un ratio C:N et un RDMC faibles (**Figure 34**). La féverole a des caractéristiques proches de celles des trèfles voir plus importantes pour certains traits (fixation du C et de l'N), tandis que le pois (de même que le blé) montre une faible croissance et un ratio C:N plus élevé au cours de cette même période. Le pois et le blé sont des espèces de grande culture sélectionnées pour la production de graines, et le développement reproducteur est caractérisé par une forte mobilisation des réserves pour l'élaboration de ces graines, et donc un faible développement des racines (Rousset, 2002; Ayupov *et al.*, 2019). Ainsi, les plantes présentant des taux de croissance élevés se distinguent par une fixation photosynthétique élevée du C atmosphérique et une fixation symbiotique de l'azote atmosphérique qui se traduisent par une rhizodéposition importante des 2 éléments. En effet, un lien étroit avait été établi entre la capacité des plantes à fixer le CO_2 par photosynthèse et la quantité de C qu'elles libèrent dans le sol (Nguyen, 2009; Pausch et Kuzyakov, 2018). Notre travail de thèse montre ainsi clairement que la photosynthèse est le moteur de la rhizodéposition du C, les plantes qui fixent le plus de C atmosphérique sont celles qui en libèrent le plus dans le sol. De même, la libération d'N dans le sol par les Fabacées est

associée à leur fonction physiologique d'utilisation de l'N atmosphérique (Wichern *et al.*, 2008; Fustec *et al.*, 2010; Chalk *et al.*, 2014). Les relations fortes que nous obtenons entre fixation de l'N atmosphérique et rhizodéposition de l'N montrent donc que la fixation biologique de l'azote atmosphérique est le déterminant principal de la rhizodéposition de l'N.

Notre travail montre également l'importance du développement racinaire pour la rhizodéposition du C mais également de l'N. Dans la mesure où le processus de rhizodéposition est étroitement lié à la biomasse racinaire, il est communément reconnu que le processus de sénescence racinaire est un des principaux facteurs qui intervient dans la rhizodéposition (Jones *et al.*, 2009; Baptist *et al.*, 2015; Roumet *et al.*, 2016; Hupe *et al.*, 2018). Plusieurs études ont ainsi établi l'importance des racines fines à la fois dans la rhizodéposition (Prieto *et al.*, 2016) et le transfert de l'N vers les plantes compagnes (Louarn *et al.*, 2015). La densité de masse racinaire (RMD) et la rhizodéposition (C et N) sont fortement et positivement corrélées ce qui confirme cette contribution pour les trèfles et la féverole. La même observation est faite avec la densité de longueur racinaire (RLD) et notamment pour les trèfles, en effet plus les racines sont longues plus la rhizodéposition serait importante (Nguyen, 2013; Williams *et al.*, 2022). Par ailleurs, une autre étude (Prieto *et al.*, 2016) a montré que les racines à faible teneur en matière sèche (RDMC) ont tendance à avoir une plus forte décomposition et que le RDMC est par conséquent négativement corrélé à la décomposition des racines fines. Dans notre étude, il a été observé pour les plantes après floraison, que les quantités de C et d'N sont inversement corrélées avec la RDMC, montrant une augmentation de la rhizodéposition avec la sénescence des racines. Une même relation négative est observée entre le ratio C:N des racines et la rhizodéposition des deux éléments en fin de culture. Au regard du C, un faible ratio C:N dans les racines associé à une forte quantité de C rhizodéposé suggèrent une libération importante du C des racines vers le sol pendant le développement reproducteur. Ainsi, les 2 espèces fourragères caractérisées par des fortes teneurs en C soluble après la floraison libèrent de fortes quantités de C dans le sol. Pour étayer cette observation, il a déjà été démontré que la quantité de carbone exsudée par les racines est étroitement liée à la concentration de sucres solubles dans les racines (Dilkes *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2009). Inversement pour l'N, nous avons observé, une corrélation positive entre la teneur en N soluble des racines et le NdfR pendant le stade végétatif alors qu'aucune relation similaire n'a été observée pendant le développement reproducteur. La même observation est faite par Arcand et al. (2013), chez le pois. Nos résultats confirment donc la forte contribution de l'exsudation des composés solubles au NdfR pendant le stade végétatif suivi d'une plus forte contribution de la senescence avec la maturation.

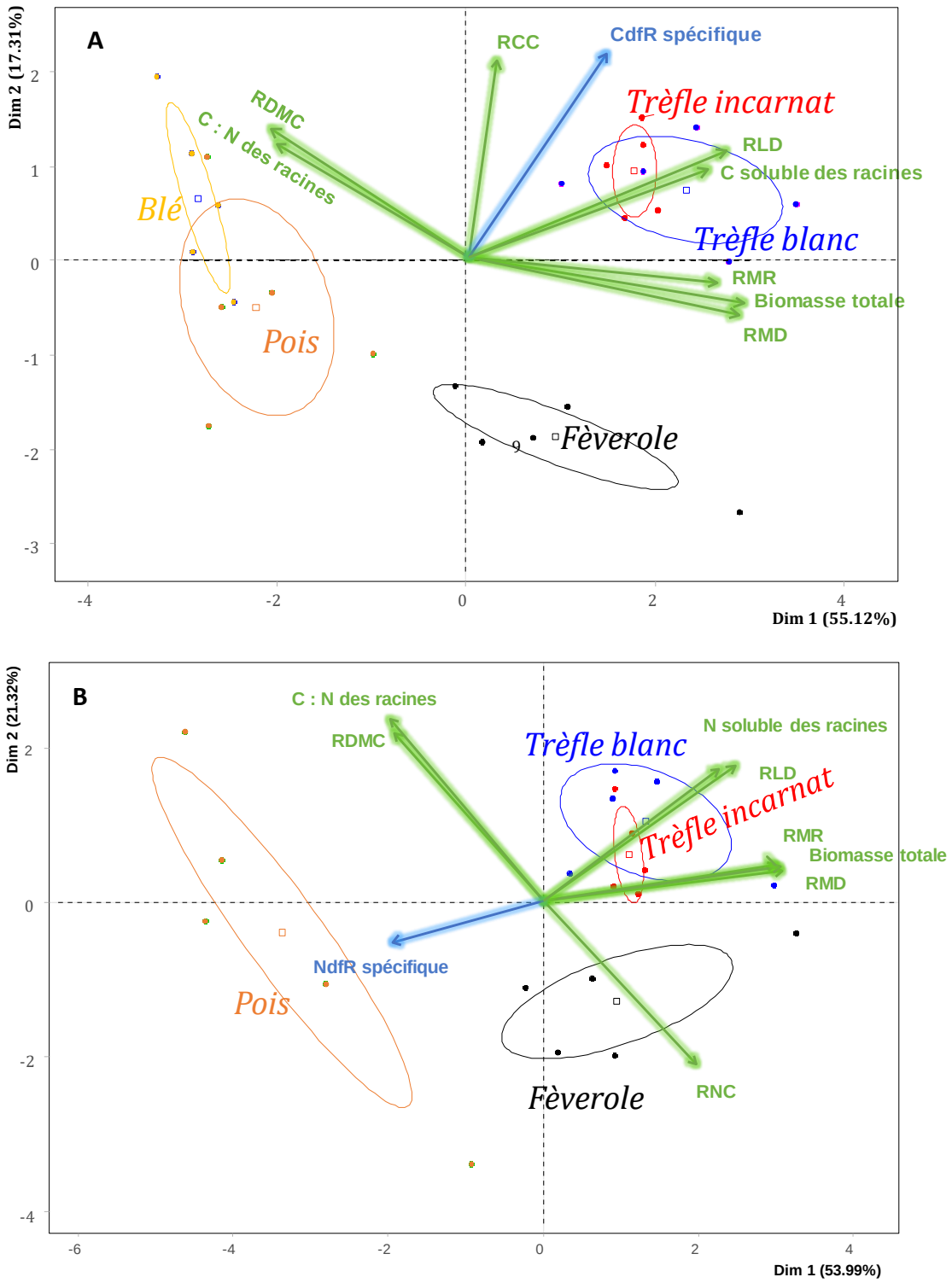


Figure 35 : Analyse en composantes principales entre la rhizodéposition spécifique du C (A) et de l'N (B) (par unité de C ou N fixé ; CdfR spécifique ou NdfR spécifique) et les traits fonctionnels des légumineuses étudiées en fin de culture (stade reproducteur).

RMD: Root Mass Density; RLD: Root Length Density; RDMC: Root Dry Matter Content; RCC: Root C Content; RNC: Root N Content; RMR: Root mass Ratio

La détermination des relations entre les traits fonctionnels et la rhizodéposition spécifique (CdfR et NdfR spécifique par unité de C et d'N total fixé) permet d'étayer les observations précédentes (**Figure 35**). En ce qui concerne le CdfR spécifique, il apparaît en effet que la performance des deux espèces de trèfle s'explique par leur contenu élevé en C soluble dans les racines et par un RLD important pendant le développement reproducteur (**Figure 35 A**). Ce résultat confirme l'importance de la sénescence racinaire dans la rhizodéposition du C en fin de culture mais suggère également une contribution significative de l'exsudation à la rhizodéposition du C pour les trèfles.

Les résultats concernant le NdfR spécifique sont totalement différents (**Figure 35 B**). En effet, il baisse fortement entre les 2 récoltes et le NdfR du pois est le plus élevé alors que le trèfle incarnat alloue une proportion plus faible que le pois à la rhizodéposition. La baisse du NdfR pourrait s'expliquer par la formation des fleurs et des grains qui sont des puits importants pour l'N dérivé de l'atmosphère. Il faut par ailleurs de nouveau noter qu'il est délicat de comparer les performances de cultures annuelles au cycle relativement court et de cultures pérennes. En effet, le pois était en sénescence avancée et il est probable que les tissus racines et les nodules sénescents aient libéré des quantités importantes dans le sol. Les ratio C:N plus faible des rhizodépôts des protéagineuses vient appuyer cette suggestion. Il ressort également de certaines études que le profil de rhizodéposition du pois change pendant le développement reproducteur avec une diminution de la rhizodéposition de C et une augmentation de la rhizodéposition d'N (Jensen, 1996*a*; Wichern *et al.*, 2007; Arcand *et al.*, 2013). En accord avec ces résultats, Mayer et al. (2003) ont analysé des racines fines provenant d'un échantillon de sol tamisé et ils ont ainsi pu constater que les racines fines représentaient 7 % de la rhizodéposition totale de l'N chez le lupin, 16 % chez la féverole et 31 % chez le pois.

La sénescence des deux espèces de trèfle était beaucoup moins prononcée et leurs tissus racinaires étaient riches en N soluble. Ainsi leur faible rhizodéposition de l'N pourrait s'expliquer par une réabsorption des composés N du sol. L'exsudation correspond à un flux bidirectionnel (Jones *et al.*, 2009), et il a été montré que le trèfle blanc réabsorbe une très forte proportion des acides aminés exsudés (Lesuffleur et Cliquet, 2010). Aussi, il est intéressant de souligner que la biomasse racinaire élevée des trèfles pourrait avoir favoriser cette réabsorption de l'N du sol, comme le suggère la corrélation négative entre le NdfR spécifique et les paramètres liés aux racines tels que le RMD, le RLD et le RMR (ratio entre la biomasse racinaire et la biomasse totale).

Les résultats de cette étude montrent un lien entre la rhizodéposition des différentes espèces étudiées et les traits en lien avec la croissance des plantes ainsi que la biomasse racinaire.

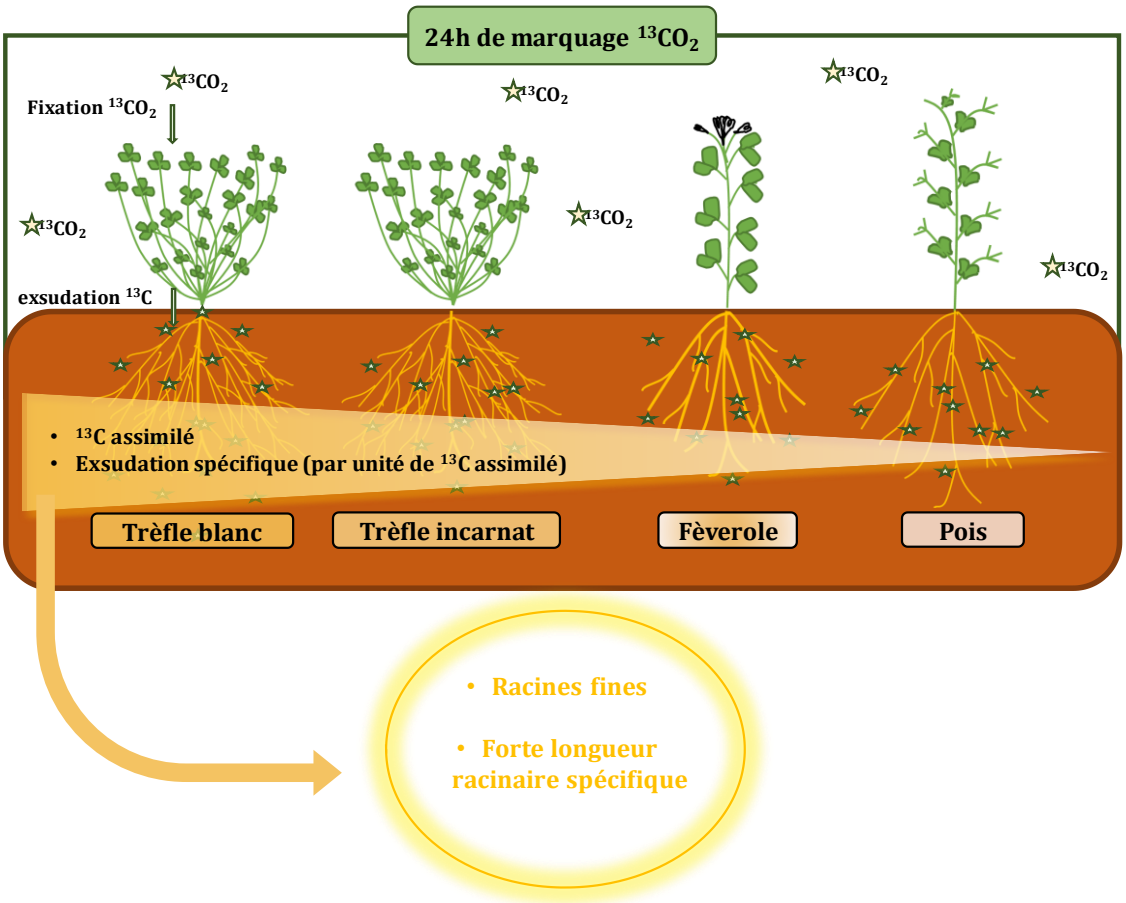


Figure 36 : Représentation schématique de l'exsudation spécifique du C récent (en 24h de marquage $^{13}CO_2$) et des traits racinaires impliqués chez les différentes Fabacées étudiées en stade végétatif.

Cependant, les traits racinaires avaient été mesurés dans cette expérimentation, non pas sur les plantes marquées, mais sur une autre culture. Cependant, des expérimentations complémentaires (**Chapitre IV C**) conduites en rhizotron pendant le stade végétatif des plantes avec un marquage au $^{13}CO_2$ avaient pour objectif de relier l'exsudation du C récent à l'architecture racinaire des espèces de Fabacées étudiées. Ces travaux confirment la relation forte entre la photosynthèse et la rhizodéposition et plus précisément entre la photosynthèse et l'exsudation (Pausch et Kuzyakov, 2018). Elle montre également que le diamètre des racines joue un rôle central dans l'exsudation du C nouvellement fixé, les racines les plus fines libérant beaucoup de C en particulier chez les trèfles comme dans la précédente étude (**Figure 36**). En effet, les racines fines ayant une densité plus faible par rapport aux racines épaisses, présentent des flux d'éléments (influx/efflux) plus importants (Jungk, 2001; McCormack *et al.*, 2015). Des relations ont également été observées entre l'exsudation spécifique et la longueur, le volume et la surface spécifiques des racines. Ces travaux confirment le fait que la rhizodéposition dépend d'une part des capacités d'acquisition des ressources et d'autre part de l'architecture racinaire (Jones *et al.*, 2009 ; Nguyen, 2013 ; Williams *et al.*, 2022).

A retenir :

- Le double marquage $^{13}CO_2$ atmosphérique ^{15}N apporté au sol permet de mesurer simultanément la rhizodéposition du carbone et de l'azote sur l'ensemble d'un cycle de culture. Cette approche est également adaptée pour l'estimation et l'analyse comparative de la rhizodéposition chez plusieurs espèces de Fabacées.
- Les plantes présentant une forte capacité de rhizodéposition carbonée, tels que la féverole, le trèfle blanc et le trèfle incarnat, ont également une forte capacité de rhizodéposition azotée. Il existe une corrélation positive entre le CdfR et le NdfR dont la proportionnalité varie en fonction des espèces.
- La rhizodéposition dépend du stade phénologique et de la répartition des ressources dans la plante.
- Les capacités de rhizodéposition peuvent être expliqués par des traits physiologiques et des traits fonctionnels racinaires
- L'exsudation de composés C solubles semble être une composante essentielle de la rhizodéposition tout au long du cycle de croissance des 4 Fabacées étudiées. A l'inverse, l'exsudation de composés N solubles intervient très peu dans la rhizodéposition de l'N en période de reproduction, qui est fortement liée à la sénescence racinaire, forte chez les 2 espèces annuelles.

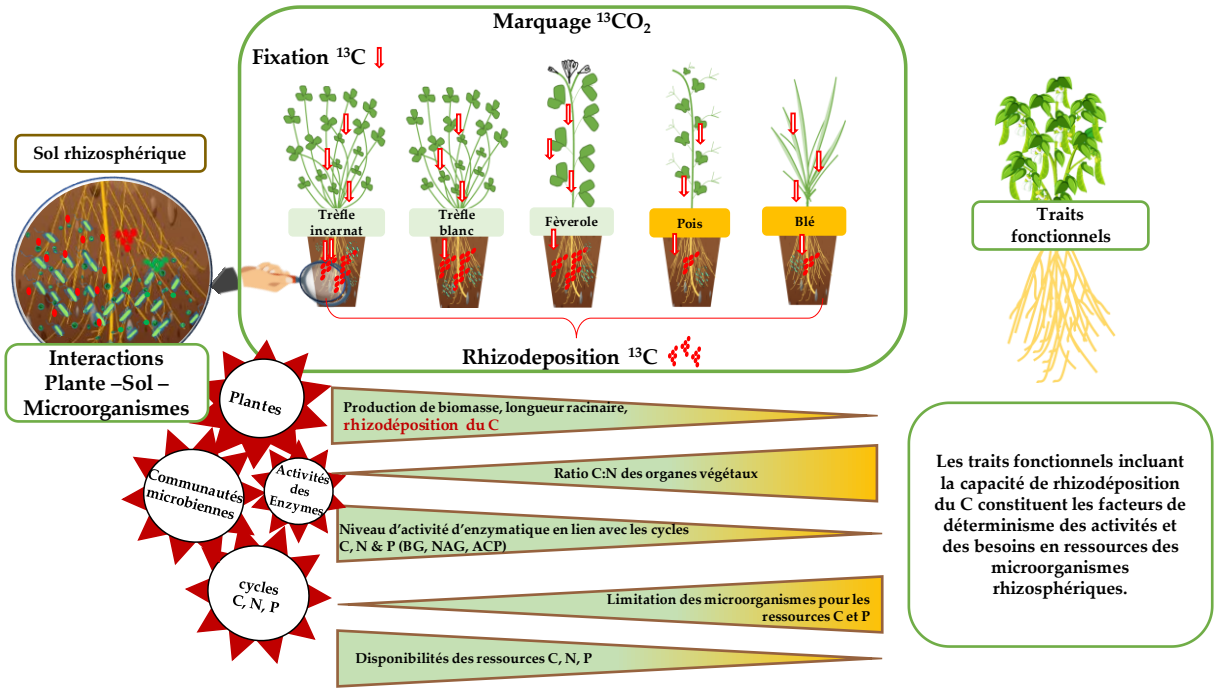


Figure 37 : Représentation schématique du lien entre la rhizodéposition du carbone et les activités enzymatiques du sol.

2. Impact de la rhizodéposition sur les activités enzymatiques et la diversité des communautés microbiennes du sol

2.1.Effet de la rhizodéposition du carbone sur les activités enzymatiques du sol

Le carbone rhizodéposé constitue un apport direct d'éléments organiques dans le sol. Les plantes peuvent réguler la décomposition de cette matière organique du sol par le biais de la rhizodéposition (Kuzyakov, 2010; Dijkstra *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2014). Les racines vivantes libèrent des substrats disponibles, utilisés comme source d'énergie primaire pour les microorganismes, stimulent la croissance microbienne dans la rhizosphère, entraînent la production d'enzymes extracellulaires, et améliorent la décomposition du carbone organique du sol par rapport à un sol nu (Kuzyakov, 2010; Zhu et Cheng, 2011; Shahzad *et al*., 2015; Zhu *et al*., 2018). Cet effet de l'apport en éléments organiques est connu sous le nom d'effet « priming » de la rhizosphère (Jones *et al.*, 2004; Cheng, 2009). Il dépend étroitement de la quantité et de la composition biochimique des éléments rhizodéposés. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'influence de la quantité de C et N rhizodéposés sur la dynamique des éléments C, N et P dans le sol. Ainsi un panel d'activités enzymatiques (β-glucosidase : BG ; N-acétyl-β-glucosaminidase : NAG ; arylamidase : ARYLN et les phosphatases acides : ACP et alcalines AKP) a été mesuré (**Chapitre IV D**).

Nos résultats montrent que l'espèce végétale et le stade de développement modifient les trois activités enzymatiques BG, NAG et ACP. Les espèces ayant présenté les quantités les plus importantes de rhizodépots à savoir la féverole, le trèfle blanc et le trèfle incarnat ont présentés les niveaux d'activités enzymatiques les plus élevés (**Figure 37**). Il est déjà établi que les espèces à forte croissance présentent une importante activité métabolique dans les racines, associée à une capacité de rhizodéposition et d'activité microbienne du sol plus conséquente (Henneron *et al.*, 2020*b*; Han *et al.*, 2020). Ces espèces présentent également un effet « priming » plus important dans leur rhizosphère pour la minéralisation du carbone organique du sol. D'après une comparaison de différentes espèces de prairies appartenant à des groupes fonctionnels contrastés, Henneron et al. (2020a) ont montré que la variation de l'effet « priming » entre les espèces est essentiellement due à l'activité photosynthétique des plantes. Cette initiation de la dégradation de la matière organique étant modulée par la production d'enzymes capables de dégrader les macromolécules, les résultats de notre étude confirment ces observations. En effet, les différences entre les espèces étudiées s'expliquent par leurs traits fonctionnels avec notamment le ratio C:N des organes végétaux, la production de biomasse et la longueur des racines. Comme montré précédemment la forte production de biomasse des

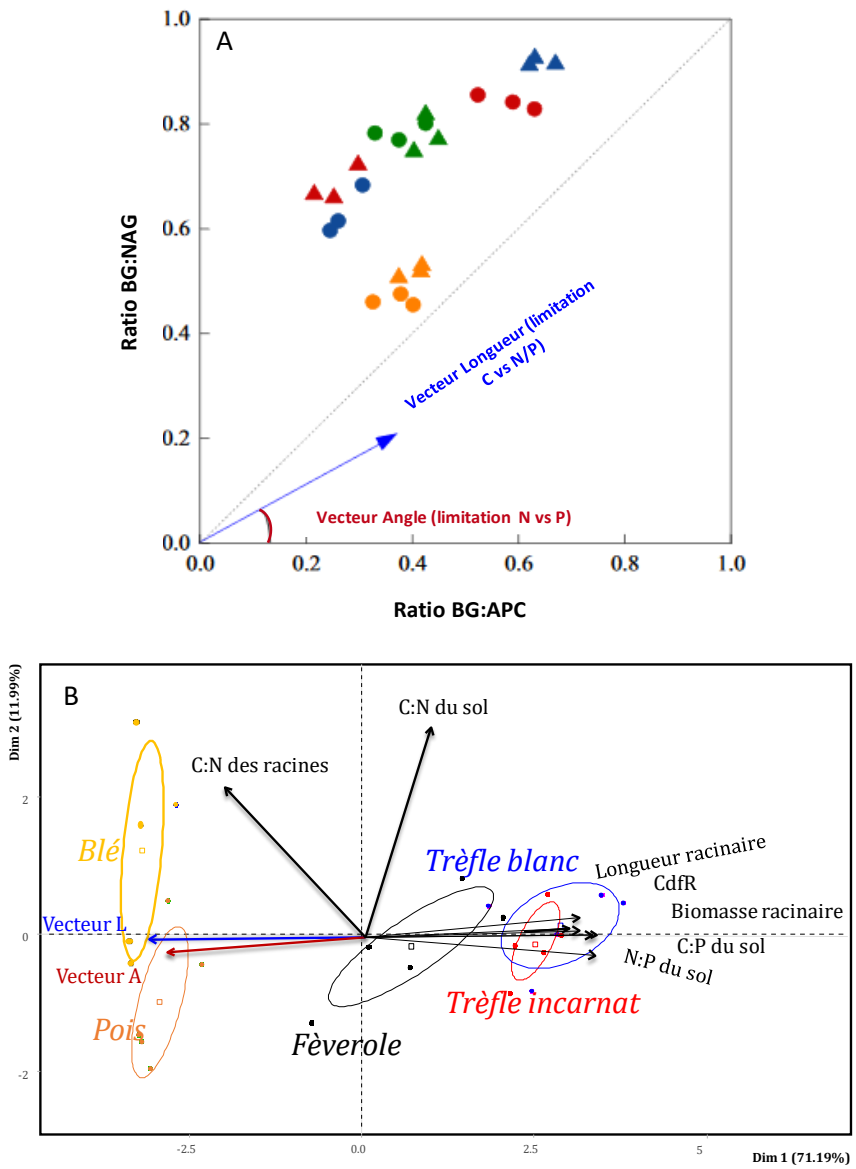


Figure 38 : (A) Exemple d'indice de Moorhead et al. (2013) sur limitation en ressources des microorganismes d'après Cui et al. (2021) ; (B) Analyse de la relation entre les traits des plantes et les besoins en ressources des microorganismes.

CdfR : C issu de la rhizodéposition, Vecteur L (limitation en C vs N/P), Vecteur A (limitation en N vs P). L'augmentation de la longueur du vecteur est interprétée comme une augmentation relative de la limitation des microorganismes en C et l'augmentation de l'angle désigne une augmentation relative de la limitation des microorganismes en P par rapport au N. BG : β-glucosidase : ; NAG : N-acétyl-β-glucosaminidase : et ACP : phosphatases acides.

trèfles et de la féverole est associée à une plus forte fixation du C qui a son tour contribue à une forte rhizodéposition. La capacité de fixation du N_2 par les Fabacées contribue également à cet effet « priming » de la rhizosphère en favorisant la photosynthèse, la rhizodéposition et certaines activités enzymatiques (Allison *et al.*, 2006; Henneron *et al.*, 2020*b*). Reconnus comme d'importants régulateurs des processus écosystémiques, notre étude montre que les traits fonctionnels des plantes influencent ainsi la dynamique des ressources du sol ainsi que les activités des microorganismes *via* la production d'enzymes. Ces résultats confirment la troisième hypothèse de ce travail de thèse, qui stipule que les différences de rhizodéposition entre les espèces étudiées engendrent des profils d'activités enzymatiques différents dans le sol.

Plusieurs facteurs influencent le fonctionnement et la production des enzymes dans la rhizosphère, notamment les exsudats racinaires, l'élévation du CO_2 atmosphérique, la croissance des plantes, le mode de gestion des sols, la température, la salinité, et les interactions plantes-microorganismes (Gianfreda, 2015; Zhang *et al.*, 2019; Thakur *et al.*, 2019; Pokharel *et al.*, 2020). Si l'ensemble des facteurs ci-dessus peuvent influencer l'expression et l'activité des enzymes dans le sol, le facteur principal qui conditionne leur production est la présence d'un substrat adéquat et les besoins en ressources des microorganismes producteurs d'enzymes dans le sol (Caldwell, 2005; Nannipieri *et al.*, 2018). D'après une théorie d'allocation de ressources, la production des enzymes n'est bénéfique que si leurs substrats sont disponibles en concentrations suffisamment élevées pour compenser les coûts de production des enzymes (Burns *et al.*, 2013; Allison *et al.*, 2014; Lashermes *et al.*, 2016). Ainsi dans cette étude l'apport élevé de rhizodépôts riches en C, observé chez la féverole et les deux espèces de trèfle, semble avoir favorisé la plus forte production d'enzymes dans leurs rhizosphères comparativement au pois et au blé. Aussi, afin d'évaluer le besoin et les limitations des microorganismes en ressources, l'approche de la stœchiométrie enzymatique a été suggérée par plusieurs auteurs (Sinsabaugh *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2012; Moorhead *et al.*, 2016*a*; Liu *et al.*, 2020). L'approche de Hill *et al*. (2012) basée sur le calcul de ratios enzymatiques BG:NAG et NAG:ACP a montré que les microorganismes sont moins limités en ressources P et C pendant le développement reproducteur chez la féverole et les trèfles. Ces observations ont été confirmées par le calcul de l'indice de Moorhead *et al*. (2013) basé sur une régression linéaire entre les ratios d'activités enzymatiques C:N et C:P (**Figure 38 A**). Là encore, la féverole et les deux trèfles présentent une faible limitation des microorganismes rhizosphériques en C et en P (**Figure 38 B**). Cette réduction de la limitation en C et P des microorganismes dans la rhizosphère de ces espèces s'explique par leurs traits fonctionnels, et notamment leur forte croissance, leurs

longueurs racinaires, et leurs capacités de rhizodéposition du C. Cependant, lors du stade végétatif, aucune corrélation significative n'a été observée entre les traits de ces espèces et ces indices de limitations des microorganismes en ressources. Les apports du C et N par le biais de la rhizodéposition étant liés, la fixation biologique de N_2 de la féverole et des trèfles contribuerait à la diminution de la limitation en P des microorganismes en fin de croissance des plantes. Ces apports stimuleraient la croissance des microorganismes et la synthèse des enzymes (Allison et Vitousek, 2005; Xiao *et al.*, 2018). Selon un modèle développé par Allison et al. (2005), l'ajout de différents substrats riches en C, N ou P entraînent des changements dans le taux de synthèse des enzymes et la disponibilité des nutriments de différentes manières. L'augmentation du substrat carboné, par exemple, augmenterait la croissance des microorganismes et la synthèse des enzymes d'acquisition du P et du N. D'après cette étude également, un microbe absorbant 100 unités de P aurait besoin de 200 unités de C et de 57 unités d'N en raison de la stœchiométrie C:N:P des enzymes. Ainsi, lorsque le C et l'N sont en abondance, la production d'enzymes pourrait favoriser l'acquisition de ressources en P. Il a également été observé dans notre précédente étude que l'apport en C pourrait influencer le pool de P du sol (**Chapitre IV C**). En effet, des relations positives ont été observées entre l'exsudation du C et les teneurs de certains acides organiques et composés P dans le sol mais ces travaux sont préliminaires et nécessitent une confirmation. Il est connu que les Fabacées peuvent augmenter la disponibilité en P du sol grâce à la libération d'acides organiques (Hinsinger, 2001; Richardson *et al.*, 2022). La stœchiométrie des éléments présents dans le sol influence les besoins en ressources des microorganismes, ainsi l'acquisition des ressources par les microorganismes se fait de manière à atteindre un équilibre homéostatique par rapport aux éléments disponibles dans le sol (Allison *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2020). Dans cette étude les indices calculés selon Moorhead et al. (2013) sont négativement corrélés aux ratio C:P et N:P, la féverole et les trèfles ayant les ratios les plus élevés. Ces éléments montrent que les besoins en ressources des microorganismes sont liés à la disponibilité des ressources dans le sol qui sont à leur tour influencées par les caractéristiques des espèces végétales. L'analyse par l'approche stœchiométrique a permis de faire le lien entre les différents compartiments (sol/plantes/ microorganismes) de la rhizosphère et de mieux comprendre les interactions plantes microorganismes qui découlent du processus de rhizodéposition C et N, qui entraine des bénéfices réciproques aux protagonistes.

2.2. Effet de la rhizodéposition du carbone sur la structure des communautés microbiennes

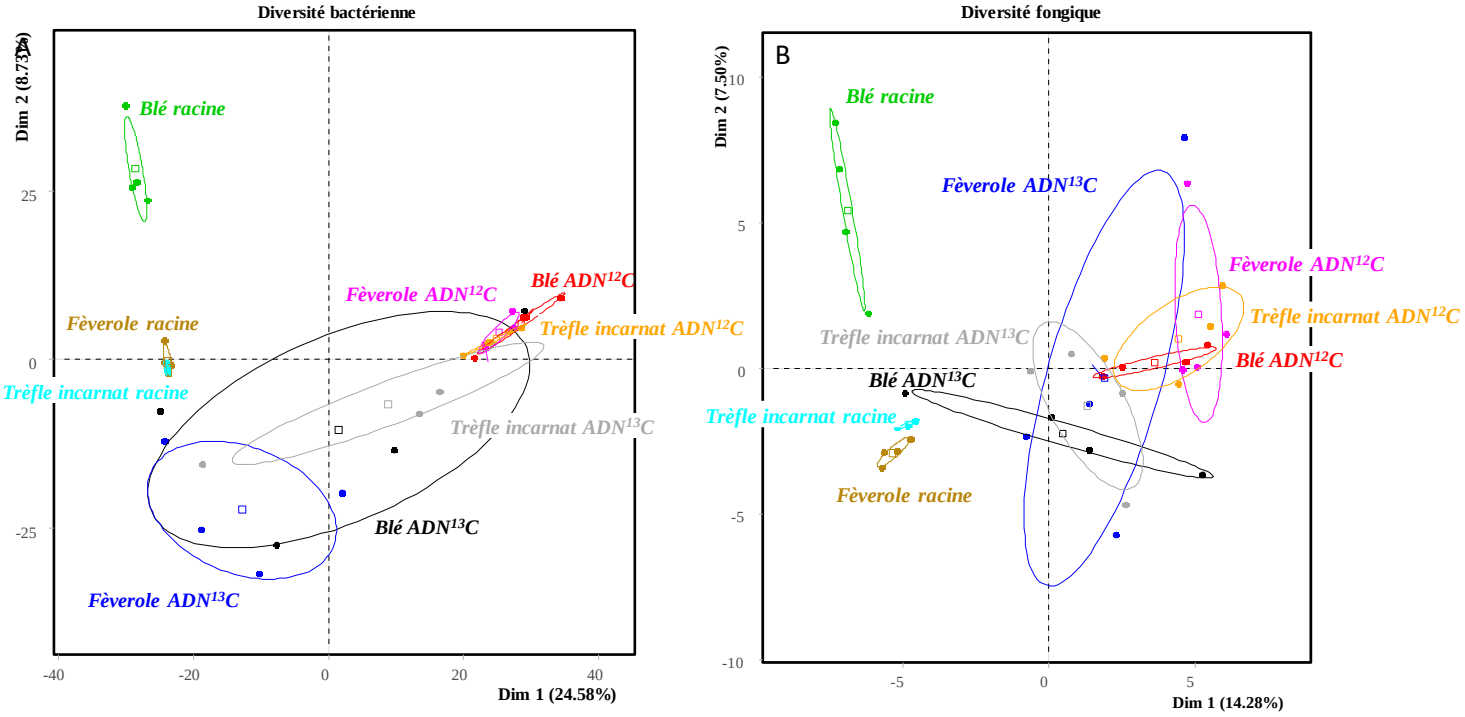


Figure 39 : Analyse en composantes principales de l'effet du couvert végétal sur la diversité bactérienne (A) et fongique (B) dans les fractions d'ADN ^{12}C et ^{13}C ainsi dans les racines.

Les études précédentes mettent en évidence des apports différents de carbone issu de la rhizodéposition chez les différentes espèces de Fabacées étudiées et confirment l'effet « priming » des flux de carbone de la plante vers sur le sol. Si nos travaux ont montré que ces flux ont un impact sur les activités des microorganismes, il convenait d'évaluer les conséquences de cette rhizodéposition du C sur la modification des communautés microbiennes du sol (**Chapitre IV E**). Il s'agissait de caractériser la structure de ces communautés bactériennes et fongiques rhizosphériques et racinaires impliquées dans l'assimilation du C rhizodéposé chez une Fabacée fourragère (trèfle incarnat), une Fabacée protéagineuse (féverole) et une Poacée (blé). Le suivi de l'évolution de la structure des communautés microbiennes a été réalisé par la technique du DNA SIP basé sur le traçage par isotope stable de l'ADN permettant alors la distinction, entre l'ADN des microorganismes métaboliquement actifs et celui des microorganismes non impliqués ou dormants (Radajewski *et al.*, 2000). L'ADN ^{13}C (ADN lourd « *heavy DNA* ») est considéré comme représentatif des communautés microbiennes qui consomment activement le C exsudé par les plantes en raison de sa teneur plus élevée en ^{13}C (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007; Achouak et Haichar, 2019). L'ADN ^{12}C (ADN léger « *light DNA* ») est considéré comme représentatif des communautés microbiennes modulées par l'effet « priming » de la rhizosphère et donc impliquées dans la dégradation de la matière organique du sol (Haichar *et al.*, 2008; Hugoni *et al.*, 2018; Guyonnet *et al.*, 2018*b*). Nos résultats montrent qu'il y a une différence inter et intra espèces végétales dans la diversité des communautés bactériennes et fongiques identifiées dans les fractions d'ADN lourdes et légères du sol rhizosphérique et dans les racines (**Figure 39 A et B**), ce qui confirme la dernière hypothèse de ce travail de thèse.

Il est connu que la présence des plantes offre, à travers les racines, différents micro-habitats pour les microorganismes dans la rhizosphère avec notamment (i) l'endorhizosphère (l'intérieur de la racine) ; (ii) le rhizoplan (la surface de la racine), et (iii) l'ectorhizosphère (les particules du sol en contact avec les exsudats racinaires) (Lynch et Whipps, 1991; Nunan *et al.*, 2005; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015). Dans ces micro-habitats les interactions spécifiques entre les microorganismes et la plante sont pilotés notamment par les exsudats racinaires (Bever *et al.*, 2010; Reinhold-Hurek *et al.*, 2015; Brtnicky *et al.*, 2021). Les résultats de notre étude confirment la présence de communautés différentes en fonction des espèces végétales dans les différents micro-habitats, à savoir dans les fractions d'ADN ^{12}C et ^{13}C du sol rhizosphérique (ectorhizosphère) et dans l'ADN des racines (rhizoplan et endorhizosphère). Les microorganismes rhizosphériques peuvent être séparés en deux catégories en fonction des espèces végétales (Hugoni *et al.*, 2018; Guyonnet *et al.*, 2018*b*). Une première catégorie est

constituée de microorganismes généralistes, qui sont largement distribués parmi les plantes et représentent le microbiote de base de chaque fraction (ADN ^{12}C ou ^{13}C). La seconde catégorie est constituée de microorganismes spécialistes, qui sont localement abondants dans une fraction variable en fonction des espèces végétales.

Dans notre étude, la comparaison intra-espèce végétale de la diversité bactérienne et fongique entre l'ADN ^{12}C et l'ADN ^{13}C des sols rhizosphériques a montré que, les exsudats de la féverole permettent le recrutement d'une communauté active plus abondante et plus diversifiée par rapport au trèfle incarnat et au blé. Cet effet de la féverole particulièrement marqué pourrait s'expliquer par la composition de ses exsudats racinaires, qui sont très riches en acides organiques et aminés (Siczek *et al.*, 2018; 2020). Ainsi, les différences de diversité microbienne entre les espèces végétales peuvent s'expliquer par la quantité et la qualité de leurs exsudats racinaires. La féverole, qui est décrite comme produisant une quantité importante d'acides organiques (Zhou *et al*., 2009; Köpke et Nemecek, 2010; Liu *et al.*, 2016), peut favoriser des microorganismes particuliers capables de cataboliser les acides organiques et de solubiliser le P dans le sol (Hafidi *et al.*, 2013; Panhwar *et al.*, 2013; Wahbi *et al.*, 2016). C'est le cas dans notre étude, puisque les *Pseudomonas* et les *Archaeospora* qui sont connus pour leur implication dans la solubilisation du P (Otieno *et al.*, 2015), sont fortement actifs dans la rhizosphère de la féverole. Le genre *Archaeospora* affilié aux Gloméromycètes abrite différentes espèces de champignons mycorhiziens (Bulgarelli *et al.*, 2013; Redecker et Schüßler, 2014). Ces espèces sont très actives dans l'assimilation du C exsudé, améliorent l'absorption des nutriments par les plantes et augmentent la résistance aux maladies (Sharma et Gupta, 2014; Hugoni *et al.*, 2018; Jadallah *et al.*, 2021). Dans la rhizosphère de la féverole, la forte diversité des microorganismes actifs comme les genres bactériens *Pseudomonas* et *Noviherbaspirillum*, et fongique *Archaeospora* est associée aux traits fonctionnels, notamment une forte croissance et un faible contenu en matière sèche (RDMC). Cette relation positive est cohérente avec les fonctions bénéfiques attribuées à ces genres et notamment sur la croissance et la santé des plantes (Soltani *et al.*, 2010; Santoyo *et al.*, 2012; Thomloudi *et al.*, 2019; Menon *et al.*, 2020). Ces observations confirment par ailleurs les résultats de l'étude de Guyonnet et al. (2018b) qui démontrent que les stratégies d'acquisition de ressources des plantes ont un impact sur le microbiote actif. En effet, ils démontrent que les plantes à forte croissance recrutent plus de microorganismes dans la rhizosphère, cette forte abondance des microorganismes est associée à une augmentation des activités de dénitrification et de respiration des communautés microbiennes dans la rhizosphère. Ces observations sont la résultante d'un taux d'exsudation plus élevé et de métabolites plus diversifiés

(Guyonnet *et al.*, 2017, 2018a). Nos précédents travaux qui ont montré cette forte capacité d'exsudation ont aussi montré que cette source de C est utilisée principalement pour la croissance et les activités des microorganismes dans le sol.

Les Fabacées sont également connues pour leurs rhizodépôts riches en acides aminés et en ammonium (Paynel et Cliquet, 2003; Lesuffleur *et al.*, 2007; Fustec *et al.*, 2010), ce qui influence fortement certains microorganismes et notamment ceux impliqués dans le cycle de l'azote. Dans notre étude, la présence de *Nitrosomonadacées* métaboliquement actifs dans la rhizosphère du trèfle incarnat semble confirmer ces observations et appuie la littérature qui rapporte une plus grande abondance de gènes de fixation de l'azote sous différentes espèces de trèfle (Rovira, 1961; Wakelin *et al.*, 2018). D'autres études suggèrent que les acides aminés et les sucres présents dans les exsudats racinaires affectent considérablement le taux d'infection des racines par les champignons mycorhiziens (Isobe et Tsuboki, 1998; Shtark *et al.*, 2021). En effet, la colonisation mycorhizienne est plus importante chez les Fabacées, probablement en raison du système racinaire généralement moins ramifié, qui les rend plus dépendantes des hyphes mycorhiziens pour l'acquisition du P (Plenchette *et al.*, 1983; Ngosong *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2016). Par ailleurs, la présence des genres bactérien *Nitrosomonadacées* et fongique *Archaeospora* impliqués dans la nutrition de la plante est à corréler avec le faible niveau de RDMC des Fabacées (Robson *et al.*, 2007; Freschet *et al.*, 2013). En effet, plus ce trait est faible plus le potentiel de nutrition des plantes en N et P est optimal (Smith *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021). L'ensemble de ces résultats confortent les observations rapportées dans la littérature qui montrent l'effet des exsudats racinaires de diverse espèces végétales dans la structuration des communautés microbiennes rhizosphériques activement impliquées dans l'utilisation de ces exsudats (Tawaraya *et al.*, 1998; Singh et Mukerji, 2006; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007; Bulgarelli *et al.*, 2013; Guyonnet *et al.*, 2018b). L'analyse de la diversité taxonomique au niveau du genre, montre que les exsudats de différentes plantes n'influencent pas les mêmes genres bactériens et fongiques. En plus de la composition des exsudats racinaires, la spécificité des microbiomes rhizosphérique et racinaire est liée aux traits fonctionnels des espèces végétales et notamment la production des biomasses aérienne et racinaire ainsi que le contenu des racines en matière sèche (RDMC). L'effet des exsudats racinaires sur les communautés microbiennes semble plus marqué sur la diversité bactérienne que la diversité fongique. Cette observation fait écho à l'hypothèse selon laquelle les champignons seraient moins ubiquistes que les bactéries dans les sols, ce qui suggère que les champignons ont des exigences plus spécifiques en matière d'habitat et de ressources par rapport aux bactéries (Mouginot *et al.*, 2014; Bahram *et al.*, 2021).

A retenir :

- Les espèces ayant présenté les quantités les plus importantes de rhizodépots à savoir la féverole, le trèfle blanc et le trèfle incarnat présentent les niveaux d'activités enzymatiques les plus élevés.
- Les différences d'activités enzymatiques s'expliquent par les traits fonctionnels avec notamment le ratio C : N des organes végétaux, la production de biomasse et la longueur des racines.
- L'analyse stœchiométrique montre que les microorganismes sont moins limités en ressources P et C pendant le développement reproducteur chez la féverole et les deux trèfles.
- La différence de rhizodeposition du C entre les espèces végétales entraine des modifications spécifiques dans la diversité des communautés bactérienne et fongique qui utilisent activement les exsudats racinaires.
- Le déterminisme de la diversité des communautés microbiennes qui utilisent les exsudats racinaires est expliqué par la production de biomasse aérienne et racinaire ainsi que le contenu en matière sèche des racines (RDMC).

Chapitre VI :

Conclusion et perspectives

Dans une perspective de préservation de l'environnement et de contribution à la sécurité alimentaire, l'intérêt pour la production des Fabacées ne cesse de s'accroître. Ainsi, dans le cadre de l'entrée en vigueur de la nouvelle PAC au 1er janvier 2023, l'accroissement des surfaces cultivées en Fabacées peut constituer une réponse à au moins 3 des 10 objectifs clés portés par la stratégie Pacte vert pour l'Europe : Contribuer à l'atténuation du changement climatique, Favoriser la gestion efficace des ressources naturelles, Répondre aux demandes de la société en matière d'alimentation et de santé.

Dans ce contexte, une meilleure compréhension des services associés à ces plantes est nécessaire afin d'améliorer les performances agronomiques des systèmes de production. Les travaux de cette thèse ont été menés en conditions contrôlées et se sont intéressés à la fourniture de carbone et d'azote dans les sols par des Fabacées fourragères et protéagineuses à travers l'étude du processus de la rhizodéposition. Ces travaux ont évalué la capacité de rhizodéposition de différentes Fabacées protéagineuses (pois et féverole) importante en région Normandie (Duquesne et Dalstein, 2016), et fourragères (trèfle blanc et trèfle incarnat), connues pour leurs potentiel de transfert d'azote en culture associée (Lesuffleur *et al.*, 2013; Génard *et al.*, 2016). Ici, nous avons également étudié les facteurs déterminants de cette rhizodéposition. Cette étude a nécessité le déploiement d'une approche d'écophysiologie reposant sur l'utilisation d'isotopes stables du carbone et de l'azote et d'une approche d'écologie fonctionnelle basée sur l'analyse des traits racinaires et la caractérisation des communautés microbiennes du sol. Un travail d'adaptation méthodologique a été réalisé et a permis d'identifier une méthode permettant de mesurer dans le système plante-sol, les flux de C et N d'origines atmosphérique, *via* la photosynthèse et la fixation biologique de l'N, tout au long de la croissance des Fabacées.

Nos résultats montrent que la rhizodéposition du C et N est fortement contrôlée par la photosynthèse et la fixation biologique de l'azote atmosphérique et ainsi par la vitesse de croissance des plantes. En conséquence, la rhizodéposition du C tend à augmenter avec la rhizodéposition de l'N. Les résultats mettent également en exergue l'intérêt particulier de la féverole et les deux trèfles (particulièrement le trèfle incarnat) en rotation, en culture intermédiaire ou en association avec d'autres espèces puisqu'ils possèdent de bonnes capacités de rhizodéposition du C et de l'N. En effet, chez la féverole, le trèfle blanc et le trèfle incarnat, des enrichissement élevés en C et N du sol par rhizodéposition et des ratios C:N des rhizodépôts plus faibles chez les Fabacées protéagineuses pendant le développement reproducteur suggèrent que (i) la rhizodéposition du carbone repose à la fois sur l'exsudation et sur la sénescence des racines (du stage végétatif à la maturité) chez les Fabacées fourragères pérennes ; (ii) Tandis que, la rhizodéposition de l'azote repose sur une forte contribution de la senescence en

particulier chez les Fabacées protéagineuses annuelles en fin de culture. L'analyse des traits fonctionnels des plantes confirme que la rhizodéposition, en tant que processus complexe et dynamique, est principalement modulée par les capacités d'acquisition des nutriments des plantes et l'architecture racinaire qui influencent le mode d'acquisition des ressources.

Les résultats obtenus ici en conditions contrôlées, ne portent que sur la rhizodéposition « brute », les flux nets sont probablement plus élevés, en particulier dans le cas du carbone car la respiration rhizosphérique a probablement consommé une grande partie du C rhizodéposé par les plantes. Il faut noter également que les flux réels qui sont mesurés en plein champ sont généralement plus élevés que ceux qui sont mesurés en conditions contrôlées en raison de la limitation du développement racinaire lié à la taille du pot (Hupe *et al.*, 2019). De plus, les flux de C et d'N mesurés dans ce travail ne permettent pas de rendre compte des flux réels en plein champ. L'enrichissement du sol lié à l'utilisation des Fabacées fait en effet intervenir également le dépôt de matière organique lié aux organes non récoltés, en particulier les racines (Uren, 2001; Hupe *et al.*, 2019).

Même si ces expérimentations basées sur la dilution isotopique du ^{15}N du sol et un marquage hebdomadaire au $^{13}CO_2$ restent contraignantes, elles permettraient l'évaluation de la contribution de l'architecture racinaires dans la rhizodéposition au champ, où l'expansion du système racinaire des plantes est plus large (Ostle *et al.*, 2003; Pausch *et al.*, 2013; Hupe *et al.*, 2019). Aussi, la rhizodéposition étant fortement influencée par le stade de développement des plantes, il serait pertinent d'évaluer la contribution des débris racinaires en les considérant à la fois en termes de biomasse et de composition biochimique, paramètre directement impliqué dans leur dégradabilité (Mayer *et al.*, 2003; Louarn *et al.*, 2015; Roumet *et al.*, 2016).

Ces travaux de thèse ont montré l'effet de la rhizodéposition sur les communautés microbiennes et leurs activités dans le sol rhizosphérique. Les espèces végétales à forte croissance (féverole, trèfle incarnat, trèfle blanc), modifient les activités enzymatiques du sol, la dynamique du C, N et P et les microbiomes rhizosphériques et racinaires. Nous avons pu montrer que cette stimulation de la microflore résulte d'une forte rhizodéposition du C. Ces résultats confirment l'effet « priming » induit par les apports en C des plantes qui favorisent la croissance des microorganismes et modifient la structure de leurs communautés dans le sol. En effet, cet effet priming particulièrement marqué chez la féverole a contribué à recruter des microbiomes rhizosphériques et racinaires spécifiques en lien avec les traits fonctionnels des plantes. Ces microbiomes sont enrichis en *Pseudomonas (bactéries)* et *Archaeospora* (champignons mycorhiziens), particulièrement impliqués dans la nutrition et la santé des plantes. Dans ce travail, seuls les apports quantitatifs de la rhizodéposition du C et N ont été

déterminés, il serait pertinent de détailler la composition et la qualité des composés exsudés par ces Fabacées (Zhou *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016; Siczek *et al.*, 2020*b*).

Quatre espèces de Fabacées ont pu être étudiées dans le cadre de ce travail. Il serait intéressant de rechercher si les différences quantitatives observées en termes de rhizodéposition du C peuvent être associées à des différences de stockage du C en suivant à plus long-terme le devenir du ^{13}C dans le sol (Cliquet *et al.*, 2022 ; Veloso *et al.*, 2019). Par ailleurs, ces différences ont été obtenues en conditions contrôlées, l'utilisation d'outils isotopiques adaptées permettrait de vérifier si des traits similaires pilotent la rhizodéposition en plein champ. La technique des marquages en pulse du ^{13}C (Bahn et al., 2013 ; Riederer et al. 2015) et de l'abondance isotopique naturelle du ^{15}N (Fustec *et al.*, 2010 ; Louarn *et al.*, 2015) pourraient en particulier être utilisées.

L'utilisation des méthodes mises en œuvre dans ce travail pourrait permettre d'élargir les études comparatives de la rhizodéposition à d'autres espèces d'intérêt environnemental. Cela permettrait d'orienter le choix des espèces à cultiver pour une valorisation optimale de leurs fonctions et une meilleure gestion des systèmes de culture. Outre les Fabacées, d'autres familles d'espèces végétales, dont les Brassicacées et les Poacées, utilisées comme cultures intermédiaires multi-services ou CIMS pourraient être ciblées (Justes et Richard, 2017). En effet, la rhizodéposition en tant que trait fonctionnel agissant sur les communautés microbiennes du sol et leur activités enzymatiques constitue un levier important pour maximiser les bénéfices des systèmes de cultures et piloter, par la succession culturale, l'émergence de microbiomes du sol performant pour la nutrition et la santé des plantes et adaptés à la diversité des contextes agropédoclimatiques. Dans ce sens, l'utilisation des approches SIP « stable isotope probing » offrent différentes possibilités d'étude des interactions plantes microorganismes. Une des possibilités intéressantes des approches SIP est la recherche de nouveaux gènes d'intérêt biotechnologique pour la croissance des plantes et d'autres fonctions (Bulgari *et al.*, 2015).

Références bibliographiques

Abalos D, De Deyn GB, Kuyper TW, Van Groenigen JW. 2014. Plant species identity surpasses species richness as a key driver of N2O emissions from grassland. Global change biology 20, 265–275.

Abalos D, Groenigen JW van, Deyn GBD. 2018. What plant functional traits can reduce nitrous oxide emissions from intensively managed grasslands? Global Change Biology 24, e248–e258.

Abatenh E, Gizaw B, Tsegaye Z, Wassie M. 2017. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. Open Journal of Environmental Biology 2, 038–046.

Achouak W, Abrouk D, Guyonnet J, Barakat M, Ortet P, Simon L, Lerondelle C, Heulin T, Haichar F el Z. 2019. Plant hosts control microbial denitrification activity. FEMS Microbiology Ecology 95.

Achouak W, Haichar F el Z. 2019. Stable Isotope Probing of Microbiota Structure and Function in the Plant Rhizosphere. In: Dumont MG,, In: Hernández García M, eds. Stable Isotope Probing. New York, NY: Springer New York, 233–243.

Acosta-Martínez V, Tabatabai M. 2001. Tillage and residue management effects on arylamidase activity in soils. Biology and Fertility of Soils 34, 21–24.

Adeboye MKA, Iwuafor ENO, Agbenin JO. 2005. Rotation effects of grain and herbaceous legumes on maize yield and chemical properties of an alfisol in the Northern Guinea savanna, Nigeria. Nigerian Journal of Soil and Environmental Research 6, 22–31.

Adetunji AT, Lewu FB, Mulidzi R, Ncube B. 2017. The biological activities of β-glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. Journal of soil science and plant nutrition 17, 794–807.

Adetunji AT, Ncube B, Mulidzi R, Lewu FB. 2020. Potential use of soil enzymes as soil quality indicators in agriculture. Frontiers in Soil and Environmental Microbiology, 57.

Adhikari K, Hartemink AE. 2016. Linking soils to ecosystem services — A global review. Geoderma 262, 101–111.

Ahkami AH, Allen White R, Handakumbura PP, Jansson C. 2017. Rhizosphere engineering: Enhancing sustainable plant ecosystem productivity. Rhizosphere 3, 233–243.

Ahmadzadeh F, Khoshgoftarmanesh AH. 2019. Release of phytosiderophores from roots of wheat and triticale under nickel-deficient conditions. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 182, 708–714.

Allan Downie J. 1994. Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. Trends in Microbiology 2, 318–324.

Allison SD. 2005. Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments. Ecology Letters 8, 626–635.

Allison SD, Chacon SS, German DP. 2014. Substrate concentration constraints on microbial decomposition. Soil Biology and Biochemistry 79, 43–49.

Allison SD, Nielsen C, Hughes RF. 2006. Elevated enzyme activities in soils under the invasive nitrogen-fixing tree Falcataria moluccana. Soil Biology and Biochemistry 38, 1537–1544.

Allison SD, Vitousek PM. 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. Soil Biology and Biochemistry 37, 937–944.

Allison SD, Weintraub MN, Gartner TB, Waldrop MP. 2011. Evolutionary-Economic Principles as Regulators of Soil Enzyme Production and Ecosystem Function. In: Shukla G,, In: Varma A, eds. Soil Biology. Soil Enzymology. Berlin, Heidelberg: Springer, 229–243.

Almeida DS, Delai LB, Sawaya ACHF, Rosolem CA. 2020. Exudation of organic acid anions by tropical grasses in response to low phosphorus availability. Scientific Reports 10, 1–8.

Almeida RF, Naves ER, da Mota RP. 2015. Soil quality: Enzymatic activity of soil β-glucosidase. Global Journal of Agricultural Research and Reviews 3, 146–150.

Alori ET, Glick BR, Babalola OO. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. Frontiers in microbiology 8, 971.

Altieri MA. 2002. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. Agriculture, Ecosystems & Environment 93, 1–24.

Altieri MA. 2018. Agroecology: The Science Of Sustainable Agriculture, Second Edition. CRC Press.

Altobelli F, Benedetti A, Calles T, et al. 2016. Soils and Pulses: Symbiosis for Life - World. ReliefWeb.

Amador JA, Jones RD. 1997. Response of carbon mineralization to combined changes in soil moisture and carbon-phosphorus ratio in a low phosphorus histosol. Soil Science 162, 275–282.

Amsili JP, Kaye JP. 2021. Root traits of cover crops and carbon inputs in an organic grain rotation. Renewable Agriculture and Food Systems 36, 182–191.

Amy C, Avice J-C, Laval K, Bressan M. 2022. Are native phosphate-solubilizing bacteria a relevant alternative to mineral fertilizations for crops? Part II: PSB inoculation enables a halving of P input and improves the microbial community in the rapeseed rhizosphere. Rhizosphere 21, 100480.

Anderson CR, Condron LM, Clough TJ, Fiers M, Stewart A, Hill RA, Sherlock RR. 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. Pedobiologia 54, 309–320.

Antonious GF. 2003. Impact of soil management and two botanical insecticides on urease and invertase activity. Journal of Environmental Science and Health, Part B 38, 479–488.

Aponte H, Meli P, Butler B, Paolini J, Matus F, Merino C, Cornejo P, Kuzyakov Y. 2020. Meta-analysis of heavy metal effects on soil enzyme activities. Science of The Total Environment 737, 139744.

Arcand MM, Knight JD, Farrell RE. 2013. Temporal dynamics of nitrogen rhizodeposition in field pea as determined by 15N labeling. Canadian Journal of Plant Science 93, 941–950.

Aschi A, Aubert M, Riah-Anglet W, Nélieu S, Dubois C, Akpa-Vinceslas M, Trinsoutrot-Gattin I. 2017. Introduction of Faba bean in crop rotation: Impacts on soil chemical and biological characteristics. Applied Soil Ecology 120, 219–228.

Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque A, Islam MZ, Shahidullah SM, Meon S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology 8.

Ayupov DS, Davletov FA, Asylbaev IG, Kuznetsov IY, Akhmadullina II, Dmitriev AM, Vakhitova RK, Satarov MY, Avsakhov FF, Irgalina RS. 2019. Selection of high-yielding, high-tech varieties of field pea (Pisum sativum L.). Legume Research-An International Journal 42, 615–619.

Bachelier G. 1963. La vie animale dans les sols.

Baetz U. 2016. Root exudates as integral part of belowground plant defence. Belowground Defence Strategies in Plants. Springer, 45–67.

Baetz U, Martinoia E. 2014. Root exudates: the hidden part of plant defense. Trends in plant science 19, 90–98.

Bahram M, Netherway T, Frioux C, Ferretti P, Coelho LP, Geisen S, Bork P, Hildebrand F. 2021. Metagenomic assessment of the global diversity and distribution of bacteria and fungi. Environmental Microbiology 23, 316–326.

Bai X, Dippold M, An S, Wang B, Zhang H, Loeppmann S. 2021. Extracellular enzyme activity and stoichiometry: The effect of soil microbial element limitation during leaf litter decomposition. Ecological Indicators 121, 107200.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology 57, 233–266.

Bakker PAHM, Berendsen RL, Doornbos RF, Wintermans PCA, Pieterse CMJ. 2013. The rhizosphere revisited: root microbiomics. Frontiers in Plant Science 4.

Bahn M, Lattanzi FA, Hasibeder R, Wild B, Koranda M, Danese V, Brüggemann N, Schmitt M, Siegwolf R, Richter A (2013) Responses of belowground carbon allocation dynamics to extended shading in mountain grassland. New Phytologist 198: 116–126

Balesdent J, Derrien D, Fontaine S, Kirman S, Klumpp K, Loiseau P, Marol C, Nguyen C, Péan M, Personeni E. 2011. Contribution de la rhizodéposition aux matières organiques du sol, quelques implications pour la modélisation de la dynamique du carbone. Etude et Gestion des Sols, 16.

Bandick AK, Dick RP. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. Soil Biology and Biochemistry 31, 1471–1479.

Baptist F, Aranjuelo I, Legay N, Lopez-Sangil L, Molero G, Rovira P, Nogués S. 2015. Rhizodeposition of organic carbon by plants with contrasting traits for resource acquisition: responses to different fertility regimes. Plant and Soil 394, 391–406.

Bardgett R. 2005. The biology of soil: a community and ecosystem approach. Oxford university press.

Bardgett RD, Mommer L, De Vries FT. 2014. Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. Trends in Ecology & Evolution 29, 692–699.

Bardgett RD, van der Putten WH. 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. Nature 515, 505–511.

Basu S, Kumar G, Chhabra S, Prasad R. 2021. Chapter 13 - Role of soil microbes in biogeochemical cycle for enhancing soil fertility. In: Verma JP,, In: Macdonald CA,, In: Gupta VK,, In: Podile AR, eds. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Elsevier, 149–157.

Baveye PC, Baveye J, Gowdy J. 2016. Soil “ecosystem” services and natural capital: critical appraisal of research on uncertain ground. Frontiers in Environmental Science 4, 41.

Bazot S, Blum H, Robin C. 2008. Nitrogen rhizodeposition assessed by a 15NH3 shoot pulse-labelling of Lolium perenne L. grown on soil exposed to 9 years of CO2 enrichment. Environmental and Experimental Botany 63, 410–415.

Becana M, Sprent JI. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. Physiologia Plantarum 70, 757–765.

Bedoussac L, Tribouillois H, Bonilla DP, Journet E-P, Justes E. 2018. Évaluation de systèmes de culture avec et sans légumineuses. . Agriculture, 13.

Bell C, Carrillo Y, Boot CM, Rocca JD, Pendall E, Wallenstein MD. 2014. Rhizosphere stoichiometry: are C : N : P ratios of plants, soils, and enzymes conserved at the plant species-level? New Phytologist 201, 505–517.

Benizri E, Nguyen C, Piutti S, Slezack-Deschaumes S, Philippot L. 2007. Additions of maize root mucilage to soil changed the structure of the bacterial community. Soil biology and biochemistry 39, 1230–1233.

Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. Trends in Plant Science 17, 478–486.

Bergersen FJ, Turner GL, Peoples MB, Gault RR, Morthorpe LJ, Brockwell J. 1992. Nitrogen fixation during vegetative and reproductive growth of irrigated soybeans in the field: application of δ 15N methods. Australian Journal of Agricultural Research 43, 145–153.

Bernard L, Mougel C, Maron P-A, et al. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from 13 C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. Environmental Microbiology 9, 752–764.

Bever JD, Dickie IA, Facelli E, Facelli JM, Klironomos J, Moora M, Rillig MC, Stock WD, Tibbett M, Zobel M. 2010. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. Trends in ecology & evolution 25, 468–478.

Binkley D, Vitousek P. 1989. Soil nutrient availability. In: Pearcy RW,, In: Ehleringer JR,, In: Mooney HA,, In: Rundel PW, eds. Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation. Dordrecht: Springer Netherlands, 75–96.

Bobille H, Limami AM, Robins RJ, Cukier C, Le Floch G, Fustec J. 2016. Evolution of the amino acid fingerprint in the unsterilized rhizosphere of a legume in relation to plant maturity. Soil Biology and Biochemistry 101, 226–236.

Bocking CR, Blyth MG. 2018. Oxygen uptake and denitrification in soil aggregates. Acta Mechanica 229, 595–612.

Bonaldi K, Gargani D, Prin Y, Fardoux J, Gully D, Nouwen N, Goormachtig S, Giraud E. 2011. Nodulation of Aeschynomene afraspera and A. indica by Photosynthetic Bradyrhizobium Sp. Strain ORS285: The Nod-Dependent Versus the Nod-Independent Symbiotic Interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions® 24, 1359–1371.

Bonkowski M, Villenave C, Griffiths B. 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. Plant and Soil 321, 213–233.

Bonny S. 2010. L'intensification écologique de l'agriculture: voies et défis

Borase DN, Murugeasn S, Nath CP, Hazra KK, Singh SS, Kumar N, Singh U, Praharaj CS. 2021. Long-term impact of grain legumes and nutrient management practices on soil microbial activity and biochemical properties. Archives of Agronomy and Soil Science 67, 2015–2032.

Bourget B. 2016. Les légumineuses et la PAC. Rencontres participatives Légumineuses Grand Sud - Agropolis International, Montpellier, France.

Bowles TM, Acosta-Martínez V, Calderón F, Jackson LE. 2014. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. Soil Biology and Biochemistry 68, 252–262.

Bowsher AW, Ali R, Harding SA, Tsai C-J, Donovan LA. 2015. Analysis of wild sunflower (Helianthus annuus L.) root exudates using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 178, 776–786.

Bozino A, Régnier E, Soler L-G, Thomas A. 2021. Vers une alimentation saine et durable ?

Bressan M, Roncato M-A, Bellvert F, Comte G, Haichar F el Z, Achouak W, Berge O. 2009. Exogenous glucosinolate produced by Arabidopsis thaliana has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. The ISME Journal 3, 1243–1257.

Brodie E, Edwards S, Clipson N. 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. FEMS Microbiology Ecology 45, 105–114.

Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM. 2008. Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. Applied and Environmental Microbiology 74, 738–744.

Brtnicky M, Kintl A, Hammerschmiedt T, Mustafa A, Elbl J, Kucerik J, Vyhnanek T, Skladanka J, Hunady I, Holatko J. 2021. Clover Species Specific Influence on Microbial Abundance and Associated Enzyme Activities in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils. Agronomy 11, 2214.

Brusseau ML. 2019. Ecosystems and Ecosystem Services. Environmental and Pollution Science. Elsevier, 89–102.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. Annual Review of Plant Biology 64, 807–838.

Bulgari R, Cocetta G, Trivellini A, Vernieri P, Ferrante A. 2015. Biostimulants and crop responses: a review. Biological Agriculture & Horticulture 31, 1–17.

Bünemann EK, Bongiorno G, Bai Z, et al. 2018. Soil quality – A critical review. Soil Biology and Biochemistry 120, 105–125.

Bürgmann H, Meier S, Bunge M, Widmer F, Zeyer J. 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. Environmental Microbiology 7, 1711–1724.

Bürgmann H, Widmer F, Von Sigler W, Zeyer J. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. Applied and Environmental Microbiology 70, 240–247.

Burney JA, Davis SJ, Lobell DB. 2010. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 12052–12057.

Burns RG. 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. Soil Biology and Biochemistry 14, 423–427.

Burns RG. 1986. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. Interactions of soil minerals with natural organics and microbes 17, 429–451.

Burns RG, DeForest JL, Marxsen J, Sinsabaugh RL, Stromberger ME, Wallenstein MD, Weintraub MN, Zoppini A. 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. Soil Biology and Biochemistry 58, 216–234.

Burns RG, Dick RP. 2002. Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. CRC Press.

Buscot F, Varma A (Eds.). 2005. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. New York: Springer.

Butler JL, Williams MA, Bottomley PJ, Myrold DD. 2003. Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow. Applied and Environmental Microbiology 69, 6793–6800.

Butterly CR, Armstrong R, Chen D, Tang C. 2015. Carbon and nitrogen partitioning of wheat and field pea grown with two nitrogen levels under elevated CO2. Plant and Soil 391, 367–382.

C. Nguyen. 2013. La libération de composés organiques par les racines (rhizodéposition): modélisation et impact sur la biodisponibilité des éléments minéraux pour les plantes.

Cakmak I, Erenoglu B, Gülüt KY, Derici R, Römheld V. 1998. Light-mediated release of phytosiderophores in wheat and barley under iron or zinc deficiency. Plant and Soil 202, 309–315.

Calabi-Floody M, Medina J, Rumpel C, Condron LM, Hernandez M, Dumont M, de la Luz Mora M. 2018. Smart fertilizers as a strategy for sustainable agriculture. Advances in agronomy. Elsevier, 119–157.

Caldwell BA. 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. Pedobiologia 49, 637–644.

Calvaruso C, Blanchart A, Bertin S, Grand C, Pierart A, Eglin T. 2021. Quels paramètres du sol mesurer pour évaluer les fonctions et les services écosystémiques associés ?

Canarini A, Merchant A, Dijkstra FA. 2016. Drought effects on Helianthus annuus and Glycine max metabolites: from phloem to root exudates. Rhizosphere 2, 85–97.

Cantarel AAM, Pommier T, Desclos-Theveniau M, et al. 2015. Using plant traits to explain plant–microbe relationships involved in nitrogen acquisition. Ecology 96, 788–799.

Carlsson G, Huss-Danell K. 2003. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. Plant and Soil 253, 353–372.

Carof M, Laperche A, Cannavo P, et al. 2018. Valorisation des interactions plante-sol pour la nutrition et la santé des plantes. 69, 71–82.

Cellier P, Pellerin S, Recous S, Vertès F. 2019. Bouclage des cycles: des approches renouvelées et plus englobantes des cycles biogéochimiques.

Cellier P, Schneider A, Thiebeau P, Vertes F. 2015. Impacts environnementaux de l'introduction de légumineuses dans les systèmes de production.

Chalk PM, Peoples MB, McNeill AM, Boddey RM, Unkovich MJ, Gardener MJ, Silva CF, Chen D. 2014. Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of 15N-enriched techniques. Soil Biology and Biochemistry 73, 10–21.

Chen R, Senbayram M, Blagodatsky S, Myachina O, Dittert K, Lin X, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. 2014. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. Global Change Biology 20, 2356–2367.

Cheng W. 2009. Rhizosphere priming effect: Its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C–N budgets. Soil Biology and Biochemistry 41, 1795–1801.

Cheng W-L, Ko W-C, Lee N-Y, Chang C-M, Lee C-C, Li M-C, Li C-W. 2014. Pneumomediastinum in patients with AIDS: a case report and literature review. International Journal of Infectious Diseases 22, 31–34.

Cheviron N, Grondin V, Marrauld C, et al. 2021. Inter-laboratory validation of an ISO test method for measuring enzyme activities in soil samples using colorimetric substrates. Environmental Science and Pollution Research.

Chibuike GU, Obiora SC. 2014. Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. Applied and Environmental Soil Science 2014, e752708.

cholez C. 2016. Les contrats de production dans les filières légumineuses à graines: un moyen d'encourager l'acquisition et le transfert de connaissances techniques? Atelier Prospectif Recherches Légumineuses. Paris, France, 1 p.

Cholez C, Magrini M-B. 2014. Cultiver des légumineuses à graines en pure ou en association avec des céréales : points de vue d'acteurs du système sociotechnique agricole. Innovations Agronomiques 40, 43–59.

Chorley GPH. 1981. The Agricultural Revolution in Northern Europe, 1750–1880: Nitrogen, Legumes, and Crop Productivity. Economic History Review 34, 71–93.

Cleveland CC, Liptzin D. 2007. C:N:P stoichiometry in soil: is there a "Redfield ratio" for the microbial biomass? Biogeochemistry 85, 235–252.

Cliquet JB, Roussel C, Lemauviel-Lavenant S, Morvan-Bertrand A.2022. Fate of recently fixed C in plant-soil monoliths from permanent grasslands. 29th European Grassland Congress "Grasslands at the heart of circular and sustainable food system" In press

Comby M, Lacoste S, Baillieul F, Profizi C, Dupont J. 2016. Spatial and Temporal Variation of Cultivable Communities of Co-occurring Endophytes and Pathogens in Wheat. Frontiers in Microbiology 7, 403.

Condron LM, Turner BL, Cade-Menun BJ. 2015. Chemistry and Dynamics of Soil Organic Phosphorus. Phosphorus: Agriculture and the Environment. John Wiley & Sons, Ltd, 87–121.

Cooper JE. 2004. Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. Incorporating Advances in Plant Pathology. Advances in Botanical Research. Academic Press, 1–62.

Corey RB. 1990. Physical-Chemical Aspects of Nutrient Availability. Soil testing and plant analysis 3, 11–24.

Crawford MC, Grace PR, Oades JM. 2000. Allocation of carbon to shoots, roots, soil and rhizosphere respiration by barrel medic (Medicago truncatula) before and after defoliation. Plant and Soil 227, 67–75.

Crecchio C, Mimmo T, Bulgarelli D, Pertot I, Pii Y, Perazzolli M, Scagliola M, Cesco S. 2018. Beneficial Soil Microbiome for Sustainable Agriculture Production. In: Lichtfouse E, ed. Sustainable Agriculture Reviews. Sustainable Agriculture Reviews 31. Cham: Springer International Publishing, 443–481.

Crews TE, Peoples MB. 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.

Crowther TW, Hoogen J van den, Wan J, Mayes MA, Keiser AD, Mo L, Averill C, Maynard DS. 2019. The global soil community and its influence on biogeochemistry. Science 365.

Cui Y, Bing H, Fang L, Jiang M, Shen G, Yu J, Wang X, Zhu H, Wu Y, Zhang X. 2021. Extracellular enzyme stoichiometry reveals the carbon and phosphorus limitations of microbial metabolisms in the rhizosphere and bulk soils in alpine ecosystems. Plant and Soil 458, 7–20.

Dakora FD, Phillips DA. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. In: Adu-Gyamfi JJ, ed. Developments in Plant and Soil Sciences. Food Security in

Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities. Dordrecht: Springer Netherlands, 201–213.

Datt N, Singh D. 2019. Enzymes in Relation to Soil Biological Properties and Sustainability. In: Meena RS,, In: Kumar S,, In: Bohra JS,, In: Jat ML, eds. Sustainable Management of Soil and Environment. Singapore: Springer, 383–406.

Dedieu B, Prados E. 2022. Quels défis pour l'agriculture? , Inria, INRAe Livre Blanc N°6, 22–31.

Dharmakeerthi, R. and Thenabadu, M., 1996. Urease activity in soils : a review. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 24(3), pp.159–195.

Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. 1993. Aluminum tolerance in wheat (Triticum aestivum L.)(II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices). Plant physiology 103, 695–702.

DeLonge MS, Miles A, Carlisle L. 2016. Investing in the transition to sustainable agriculture. Environmental Science & Policy 55, 266–273.

Dénarié J, Cullimore J. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Cell 74, 951–954.

Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?: Root exudates and rhizosphere bacteria. FEMS Microbiology Ecology 72, 313–327.

Deprince A. 2003. La faune du sol. Diversité, méthodes d'étude, fonctions et perspectives. Le Courrier de l'environnement de l'INRA 49, 123–138.

D'haeze W, Holsters M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. Glycobiology 12, 79R-105R.

Dhamala NR, Rasmussen J, Carlsson G, Søegaard K, Eriksen J. 2017. N transfer in three-species grass-clover mixtures with chicory, ribwort plantain or caraway. Plant and Soil 413, 217–230.

Diatta AA, Thomason WE, Abaye O, Thompson TL, Battaglia ML, Vaughan LJ, Lo M, Filho JFDCL. 2020. Assessment of Nitrogen Fixation by Mungbean Genotypes in Different Soil Textures Using 15N Natural Abundance Method. Journal of Soil Science and Plant Nutrition.

Dick RP. 2020. Methods of Soil Enzymology. John Wiley & Sons.

Dick WA, Tabatabai MA. 1999. Use of immobilized enzymes for bioremediation. Bioremediation of contaminated soils 37, 315–338.

Dijkstra FA, Carrillo Y, Pendall E, Morgan JA. 2013. Rhizosphere priming: a nutrient perspective. Frontiers in microbiology 4, 216.

Dilkes NB, Jones DL, Farrar J. 2004. Temporal Dynamics of Carbon Partitioning and Rhizodeposition in Wheat. Plant Physiology 134, 706–715.

Dini-Andreote F, van Elsas JD. 2019. The soil microbiome—An overview. Modern Soil Microbiology, Third Edition, 37–48.

Dodor D, Tabatabai M. 2002. Effects of cropping systems and microbial biomass on arylamidase activity in soils. Biology and Fertility of Soils 35, 253–261.

Dodor DE, Tabatabai MA. 2007. Arylamidase activity as an index of nitrogen mineralization in soils. Communications in soil science and plant analysis 38, 2197–2207.

Domanski G, Kuzyakov Y, Siniakina SV, Stahr K. 2001. Carbon flows in the rhizosphere of ryegrass (Lolium perenne). Journal of Plant Nutrition and Soil Science 164, 381.

Doran JW, Safley M. 1997. Defining and assessing soil health and sustainable productivity. Biological indicators of soil health., 1–28.

Dotaniya ML, Aparna K, Dotaniya CK, Singh M, Regar KL. 2019. Chapter 33 - Role of Soil Enzymes in Sustainable Crop Production. In: Kuddus M, ed. Enzymes in Food Biotechnology. Academic Press, 569–589.

Dove NC, Arogyaswamy K, Billings SA, et al. 2020. Continental-scale patterns of extracellular enzyme activity in the subsoil: an overlooked reservoir of microbial activity. Environmental Research Letters 15, 1040a1.

Downie JA. 2007. PLANT SCIENCE: Infectious Heresy. Science 316, 1296–1297.

Duarte RDC, Santos CS, Vasconcelos MW. 2020. Legume Responses and Adaptations to Nutrient Deficiencies. In: Hasanuzzaman M,, In: Araújo S,, In: Gill SS, eds. The Plant Family Fabaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses. Singapore: Springer, 373–392.

Dubach M, Russelle MP. 1994. Forage legume roots and nodules and their role in nitrogen transfer. Agronomy Journal 86, 259–266.

Duc G, Blancard S, Hénault C, et al. 2010a. Potentiels et leviers pour développer la production et l'utilisation des protéagineux dans le cadre d'une agriculture durable en Bourgogne. , 18.

Duc G, Mignolet C, Carrouée B, Huyghe C. 2010b. Importance économique passée et présente des légumineuses: Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. Innovations agronomiques 11, 1–24.

Duflot V (2018) Actualités. OCL, 25(5), N501

Dumont MG, Murrell JC. 2005. Stable isotope probing — linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiology 3, 499–504.

Dundek P, Holík L, Rohlík T, Hromádko L, Vranová V, Rejšek K, Formánek P. 2014. Methods of plant root exudates analysis: a review. Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis 59, 241–246.

Duquesne A, Dalstein A. 2016. Pôle Economie et Prospective des Chambres d'agriculture de Normandie.

Eglin T, Cousin I, Walter C. 2021. Contribution aux réflexions sur les concepts de fonctions des sols et de services écosystémiques, et leur évaluation. , 4.

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.

Emmerson M, Morales MB, Oñate JJ, et al. 2016. Chapter Two - How Agricultural Intensification Affects Biodiversity and Ecosystem Services. In: Dumbrell AJ,, In: Kordas RL,, In: Woodward G, eds. Large-Scale Ecology: Model Systems to Global Perspectives. Advances in Ecological Research. Academic Press, 43–97.

European Commission. Soil Thematic Strategy, COM(2006) 231 — European Environment Agency.

Fageria NK, Stone LF. 2006. Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. Journal of Plant Nutrition 29, 1327–1356.

Fagorzi C, Checcucci A, DiCenzo GC, Debiec-Andrzejewska K, Dziewit L, Pini F, Mengoni A. 2018. Harnessing Rhizobia to Improve Heavy-Metal Phytoremediation by Legumes. Genes 9, 542.

Faucon M-P. 2020. Plant–Soil Interactions as Drivers of the Structure and Functions of Plant Communities. Diversity 12, 452.

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin M-H, Lin Y-H, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology 52, 61–76.

Fierer N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. Nature Reviews Microbiology 15, 579–590.

Fierer N, Bradford MA, Jackson RB. 2007. Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria. Ecology 88, 1354–1364.

Finkel OM, Castrillo G, Herrera Paredes S, Salas González I, Dangl JL. 2017. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. Current Opinion in Plant Biology 38, 155–163.

Franke AC, van den Brand GJ, Vanlauwe B, Giller KE. 2018. Sustainable intensification through rotations with grain legumes in Sub-Saharan Africa: A review. Agriculture, Ecosystems & Environment 261, 172–185.

Freschet GT, Bellingham PJ, Lyver PO, Bonner KI, Wardle DA. 2013. Plasticity in above- and belowground resource acquisition traits in response to single and multiple environmental factors in three tree species. Ecology and Evolution 3, 1065–1078.

Freschet GT, Violle C, Roumet C, Garnier E. 2018. Interactions entre le sol et la végétation: structure des communautés de plantes et fonctionnement du sol.

Fustec J, Lesuffleur F, Mahieu S, Cliquet J-B. 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. Agronomy for Sustainable Development 30, 57–66.

Ganeshamurthy AN. 2009. Soil changes following long-term cultivation of pulses. The Journal of Agricultural Science 147, 699.

Garcia C, Nannipieri P, Hernandez T. 2018. Chapter 9 - The Future of Soil Carbon. In: Garcia C,, In: Nannipieri P,, In: Hernandez T, eds. The Future of Soil Carbon. Academic Press, 239–267.

Garg N, Geetanjali. 2009. Symbiotic Nitrogen Fixation in Legume Nodules: Process and Signaling: A Review. In: Lichtfouse E,, In: Navarrete M,, In: Debaeke P,, In: Véronique S,, In: Alberola C, eds. Sustainable Agriculture. Dordrecht: Springer Netherlands, 519–531.

Garnica M, Bacaicoa E, Mora V, San Francisco S, Baigorri R, Zamarreño AM, Garcia-Mina JM. 2018. Shoot iron status and auxin are involved in iron deficiency-induced phytosiderophores release in wheat. BMC plant biology 18, 105.

Garnier E, Navas M-L. 2012. A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. Agronomy for Sustainable Development 32, 365–399.

Gasser M, Hammelehle A, Oberson A, Frossard E, Mayer J. 2015. Quantitative evidence of overestimated rhizodeposition using 15N leaf-labelling. Soil Biology and Biochemistry 85, 10–20.

Gaume A, Mächler F, De León C, Narro L, Frossard E. 2001. Low-P tolerance by maize (Zea mays L.) genotypes: significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. Plant and soil 228, 253–264.

Ge T, Li B, Zhu Z, Hu Y, Yuan H, Dorodnikov M, Jones DL, Wu J, Kuzyakov Y. 2017. Rice rhizodeposition and its utilization by microbial groups depends on N fertilization. Biology and Fertility of Soils 53, 37–48.

Genard T. 2016. Potentiel agronomique et environnemental des associations Fabacées-colza.

Génard T, Etienne P, Laîné P, Yvin J-C, Diquélou S. 2016. Nitrogen transfer from Lupinus albus L., Trifolium incarnatum L. and Vicia sativa L. contribute differently to rapeseed (Brassica napus L.) nitrogen nutrition. Heliyon 2, e00150.

German DP, Chacon SS, Allison SD. 2011. Substrate concentration and enzyme allocation can affect rates of microbial decomposition. Ecology 92, 1471–1480.

Ghosh A, Singh AB, Kumar RV, Manna MC, Bhattacharyya R, Rahman MM, Sharma P, Rajput PS, Misra S. 2020. Soil enzymes and microbial elemental stoichiometry as bio-indicators of soil quality in diverse cropping systems and nutrient management practices of Indian Vertisols. Applied Soil Ecology 145, 103304.

Gianfreda L. 2015. Enzymes of importance to rhizosphere processes. Journal of soil science and plant nutrition, 0–0.

Gianfreda L, Rao MA. 2014. Enzymes in agricultural sciences. OMICS Group International Foster.

Gianfreda L, Ruggiero P. 2006. Enzyme activities in soil. Nucleic acids and proteins in soil. Springer, 257–311.

Giller, K.E. and J.F. Witty, 1987. Immobilized 15N-fertilizer sources improve the accuracy of fielkd estimates of N2-fixation by isotope dilution. Soil Biol. Biochem., 19: 459-463.

Gkarmiri K, Mahmood S, Ekblad A, Alström S, Högberg N, Finlay R. 2017. Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere Soil of Oilseed Rape (FE Loeffler, Ed.). Applied and Environmental Microbiology 83.

Glenk K, McVittie A, Moran D. 2012. Deliverable D3. 1: Soil and soil organic carbon within an ecosystem service approach linking biophysical and economic data. SmartSOIL Report.

Goh C-H, Veliz Vallejos DF, Nicotra AB, Mathesius U. 2013. The Impact of Beneficial Plant-Associated Microbes on Plant Phenotypic Plasticity. Journal of Chemical Ecology 39, 826–839.

Götz KP, Herzog H. 2000. Distribution and Utilization of 15 N in Cowpeas Injected into the Stem Under Influence of Water Deficit. Isotopes in Environmental and Health Studies 36, 111–121.

Goyal SS, Huffaker RC. 1984. Nitrogen Toxicity in Plants. Nitrogen in Crop Production. John Wiley & Sons, Ltd, 97–118.

Graaff M-AD, Six J, Kessel CV. 2007. Elevated CO2 increases nitrogen rhizodeposition and microbial immobilization of root-derived nitrogen. New Phytologist 173, 778–786.

Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. Soil biology and biochemistry 37, 395–412.

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.

Griffon M. 2014. L'agroécologie, un nouvel horizon pour l'agriculture. Études, 31–39.

Gu Y, Wang P, Kong CH. 2009. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety. European Journal of Soil Biology 45, 436–441.

Guinet M. 2019. Quantification des flux d'azote induits par les cultures de légumineuses et étude de leurs déterminants : comparaison de 10 espèces de légumineuses à graines. Thèse Université de Bourgogne Franche Conte.

Guinet M, Nicolardot B, Voisin A-S. 2020a. Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling. European Journal of Agronomy 120, 126151.

Guinet M, Nicolardot B, Voisin A-S. 2020b. Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling. European Journal of Agronomy 120, 126151.

Gully D, Czernic P, Cruveiller S, et al. 2018. Transcriptome Profiles of Nod Factor-independent Symbiosis in the Tropical Legume Aeschynomene evenia. Scientific Reports 8, 10934.

Guo T, Zhang Q, Ai C, Liang G, He P, Lei Q, Zhou W. 2020. Analysis of microbial utilization of rice straw in paddy soil using a DNA-SIP approach. Soil Science Society of America Journal 84, 99–114.

Gust AA, Willmann R, Desaki Y, Grabherr HM, Nürnberger T. 2012. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. Trends in Plant Science 17, 495–502.

Guyonnet JP, Cantarel AAM, Simon L, Haichar F el Z. 2018a. Root exudation rate as functional trait involved in plant nutrient-use strategy classification. Ecology and Evolution 8, 8573–8581.

Guyonnet JP, Guillemet M, Dubost A, Simon L, Ortet P, Barakat M, Heulin T, Achouak W, Haichar F el Z. 2018b. Plant Nutrient Resource Use Strategies Shape Active Rhizosphere Microbiota Through Root Exudation. Frontiers in Plant Science 9.

Guyonnet JP, Vautrin F, Meiffren G, Labois C, Cantarel AAM, Michalet S, Comte G, Haichar F el Z. 2017. The effects of plant nutritional strategy on soil microbial denitrification activity through rhizosphere primary metabolites. FEMS Microbiology Ecology 93.

Hafidi M, Ouahmane L, Thioulouse J, Sanguin H, Boumezzough A, Prin Y, Baudoin E, Galiana A, Duponnois R. 2013. Managing Mediterranean nurse plants-mediated effects on soil microbial functions to improve rock phosphate solubilization processes and early growth of Cupressus atlantica G. Ecological Engineering 57, 57–64.

Haichar F el Z, Heulin T, Guyonnet JP, Achouak W. 2016. Stable isotope probing of carbon flow in the plant holobiont. Current Opinion in Biotechnology 41, 9–13.

Haichar F el Z, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T, Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. The ISME Journal 2, 1221–1230.

Haichar F el Z, Roncato M-A, Achouak W. 2012. Stable isotope probing of bacterial community structure and gene expression in the rhizosphere of Arabidopsis thaliana. FEMS Microbiology Ecology 81, 291–302.

Hale MG, Moore LD, Griffin GJ. 1978. Root exudates and exudation. Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology. Elsevier, 163–203.

Han M, Sun L, Gan D, Fu L, Zhu B. 2020. Root functional traits are key determinants of the rhizosphere effect on soil organic matter decomposition across 14 temperate hardwood species. Soil Biology and Biochemistry 151, 108019.

Hartmann A, Schmid M, Tuinen D van, Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. Plant and Soil 321, 235–257.

Hartwig UA. 1998. The regulation of symbiotic N2 fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 1, 92–120.

Harwood RR. 1990. A history of sustainable agriculture. Sustainable agricultural systems., 3–19.

Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Hung S-H, Huang E, Huang C-C. 2021. Roles of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Stimulating Salinity Stress Defense in Plants: A Review. International Journal of Molecular Sciences 22, 3154.

Heichel GH, Henjum KI. 1991. Dinitrogen fixation, nitrogen transfer, and productivity of forage legume-grass communities. Crop Science 31, 202–208.

Henneron L, Cros C, Picon-Cochard C, Rahimian V, Fontaine S. 2020a. Plant economic strategies of grassland species control soil carbon dynamics through rhizodeposition. Journal of Ecology 108, 528–545.

Henneron L, Kardol P, Wardle DA, Cros C, Fontaine S. 2020b. Rhizosphere control of soil nitrogen cycling: a key component of plant economic strategies. The New Phytologist.

Hernández T, Chocano C, Moreno J-L, García C. 2016. Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (Lactuca sativa L.) crops—Effects on soil and plant. Soil and Tillage Research 160, 14–22.

Hertenberger G, Wanek W. 2004. Evaluation of methods to measure differential15N labeling of soil and root N pools for studies of root exudation. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18, 2415–2425.

Hill BH, Elonen CM, Seifert LR, May AA, Tarquinio E. 2012. Microbial enzyme stoichiometry and nutrient limitation in US streams and rivers. Ecological Indicators 18, 540–551.

Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. , 23.

Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. Plant and soil 321, 117–152.

Hinsinger P, Betencourt E, Bernard L, Brauman A, Plassard C, Shen J, Tang X, Zhang F. 2011. P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. Plant physiology 156, 1078–1086.

Hinsinger P, Plassard C, Jaillard B. 2006. Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry. Journal of Geochemical Exploration 88, 210–213.

Hjort K, Presti I, Elväng A, Marinelli F, Sjöling S. 2014. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics. Applied Microbiology and Biotechnology 98, 2819–2828.

Hodge A, Paterson E, Thornton B, Millard P, Killham K. 1997. Effects of photon flux density on carbon partitioning and rhizosphere carbon flow of Lolium perenne. Journal of Experimental Botany 48, 1797–1805.

Høgh-Jensen H, Schjoerring JK. 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. Soil Biology and Biochemistry 33, 439–448.

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.

Horwath W. 2007. Carbon cycling and formation of soil organic matter. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, 303–339.

Howden SM, Soussana J-F, Tubiello FN, Chhetri N, Dunlop M, Meinke H. 2007. Adapting agriculture to climate change. Proceedings of the national academy of sciences 104, 19691–19696.

Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM. 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. Botany 92, 267–275.

Hugoni M, Luis P, Guyonnet J, Haichar F el Z. 2018. Plant host habitat and root exudates shape fungal diversity. Mycorrhiza 28, 451–463.

Hupe A. 2016. A secret world - C and N rhizodeposition of pea, influenced by plant development and growing conditions, thesis University of Kassel.

Hupe A, Schulz H, Bruns C, Haase T, Heß J, Dyckmans J, Joergensen RG, 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.

Hupe A, Schulz H, Bruns C, Haase T, Heß J, Joergensen RG, Wichern F. 2018. Even flow? Changes of carbon and nitrogen release from pea roots over time. Plant and Soil 431, 143–157.

Hupe A, Schulz H, Bruns C, Joergensen RG, Wichern F. 2016. Digging in the dirt – Inadequacy of belowground plant biomass quantification. Soil Biology and Biochemistry 96, 137–144.

Hütsch BW, 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.

IDRISSI NEA. 2014. La faune du sol: reconnaissance et biologie des principaux groupes. Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires 1, 60–66.

Inaba S, Ikenishi F, Itakura M, Kikuchi M, Eda S, Chiba N, Katsuyama C, Suwa Y, Mitsui H, Minamisawa K. 2012. N2O Emission from Degraded Soybean Nodules Depends on Denitrification by Bradyrhizobium japonicum and Other Microbes in the Rhizosphere. Microbes and Environments 27, 470–476.

Iqbal MA, Iqbal A, Seydoşoğlu S, Turan N, Ozyazici MA, EL Sabagh A. 2022. Temperate Forage Legumes Production, Weeds Dynamics, and Soil C:N Economy Under Organic Wastes. In: Hasanuzzaman M,, In: Ahammed GJ,, In: Nahar K, eds. Managing Plant Production Under Changing Environment. Singapore: Springer Nature, 403–420.

Isobe K, Tsuboki Y. 1998. Relationship between the Amount of Root Exudate and the Infection Rate of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Gramineous and Leguminous Crops. Plant Production Science 1, 37–38.

Jadallah SO, ALsaadi AH, Majeed AAR. 2021. Evaluation of Some Mycorrhizae Strains on Improving Nutrients Absorption in Maize Plant Grown in (Sirte–Libya) Saline Soil. Rochester, NY: Social Science Research Network.

Janzen HH, Bruinsma Y. 1989. Methodology for the quantification of root and rhizosphere nitrogen dynamics by exposure of shoots to 15N-labelled ammonia. Soil Biology and Biochemistry 21, 189–196.

Jastrow JD, Miller RM, Lussenhop J. 1998. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. Soil Biology and Biochemistry 30, 905–916.

Jebara SH, Ayed SA, Chiboub M, Fatnassi IC, Saadani O, Abid G, Jebara M. 2019. Chapter 19 - Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soils by Using Legumes Inoculated by Efficient and Cadmium-Resistant Plant Growth-Promoting Bacteria. In: Hasanuzzaman M,, In: Prasad MNV,, In: Fujita M, eds. Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants. Academic Press, 479–493.

Jehmlich N, Vogt C, Lünsmann V, Richnow HH, von Bergen M. 2016. Protein-SIP in environmental studies. Current Opinion in Biotechnology 41, 26–33.

Jensen B. 1993. Rhizodeposition by 14CO2-pulse-labelled spring barley grown in small field plots on sandy loam. Soil Biology and Biochemistry 25, 1553–1559.

Jensen ES. 1996a. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. Soil Biology and Biochemistry 28, 65–71.

Jensen ES. 1996b. Grain yield, symbiotic N2 fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. Plant and Soil 182, 25–38.

Jeuffroy M-H, Biarnes V, Cohan J-P, Corre-Hellou G, Gastal F, Jouffret P, Justes E, Landé N, Louarn G, Plantureux S. 2015. Performances agronomiques et gestion des légumineuses dans les systèmes de productions végétales.

Jílková V, Sim A, Thornton B, Jandová K, Cajthaml T, Paterson E. 2020. Impact of plant species and atmospheric CO2 concentration on rhizodeposition and soil microbial activity and community composition. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 183, 327–337.

Johnen BG, Sauerbeck DR. 1977. A tracer technique for measuring growth, mass and microbial breakdown of plant roots during vegetation. Ecological Bulletins, 366–373.

Jones DL, Hodge A, Kuzyakov Y. 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist 163, 459–480.

Jones DL, Nguyen C, Finlay RD. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. Plant and Soil 321, 5–33.

Jouan J. 2020. Valorisation économique et environnementale des complémentarités culture-élevage à travers la production locale de légumineuses: approche par modélisation de l'Ouest de la France.

Julier B, Huyghe C. 2010. Quelles légumineuses fourragères (espèces et variétés) et quelles conduites pour améliorer l'autonomie protéique des élevages herbivores ? Innovations Agronomiques 11, 101.

Jungk A. 2001. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 164, 121–129.

Justes E, Richard G. 2017. Contexte, concepts et définition des cultures intermédiaires multi-services. Innovations Agronomiques 62, 1–15.

Justes E, Thiébeau P, Avice J-C, Lemaire G, Volenec JJ, Ourry A. 2002. Influence of summer sowing dates, N fertilization and irrigation on autumn VSP accumulation and dynamics of spring regrowth in alfalfa (Medicago sativa L.). Journal of Experimental Botany 53, 111–121.

Kalev SD, Toor GS. 2018. Chapter 3.9 - The Composition of Soils and Sediments. In: Török B,, In: Dransfield T, eds. Green Chemistry. Elsevier, 339–357.

Kalyani SS, Sharma J, Dureja P, Singh S. 2010. Influence of endosulfan on microbial biomass and soil enzymatic activities of a tropical alfisol. Bulletin of environmental contamination and toxicology 84, 351–356.

Kandeler E, Stemmer M, Gerzabek MH. 2005. Role of microorganisms in carbon cycling in soils. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer, 139–157.

Karaca A, Cetin SC, Turgay OC, Kizilkaya R. 2011. Soil Enzymes as Indication of Soil Quality. In: Shukla G,, In: Varma A, eds. Soil Biology. Soil Enzymology. Berlin, Heidelberg: Springer, 119–148.

Karthikeyan S, Orellana LH, Johnston ER, Hatt JK, Löffler FE, Ayala-del-Río HL, González G, Konstantinidis KT. 2020. Metagenomic characterization of soil microbial communities in the Luquillo experimental forest (Puerto Rico) and implications for nitrogen cycling. bioRxiv, 2020.06.15.153866.

Kaštovská E, Edwards K, Šantrůčková H. 2017. Rhizodeposition flux of competitive versus conservative graminoid: contribution of exudates and root lysates as affected by N loading. Plant and Soil 412, 331–344.

Kazmierczak T, Yang L, Boncompagni E, Meilhoc E, Frugier F, Frendo P, Bruand C, Gruber V, Brouquisse R. 2020. Chapter Seven - Legume nodule senescence: a coordinated death mechanism between bacteria and plant cells. In: Frendo P,, In: Frugier F,, In: Masson-Boivin C, eds. Regulation of Nitrogen-Fixing Symbioses in Legumes. Advances in Botanical Research. Academic Press, 181–212.

Keerthisinghe G, Hocking PJ, Ryan PR, Delhaize E. 1998. Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (Lupinus albus L.). Plant, Cell & Environment 21, 467–478.

Khan DF, Peoples MB, Chalk PM, Herridge DF. 2002a. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of 15N and non isotopic methods. , 13.

Khan WDF, Peoples MB, Herridge DF. 2002b. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. Plant and Soil 245, 327–334.

Khan DF, Peoples MB, Schwenke GD, Felton WL, Chen D, Herridge DF. 2003. Effects of below-ground nitrogen on N balances of field-grown fababean, chickpea, and barley. Australian Journal of Agricultural Research 54, 333–340.

Kibblewhite MG, Ritz K, Swift MJ. 2008. Soil health in agricultural systems. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 363, 685–701.

Kichah E. 2016. Architecture racinaire des espèces herbacées: diversité de mise en place et plasticité. , 174.

Kim TH, Ourry A, Boucaud J, Lemaire G. 1993. Partitioning of Nitrogen Derived from N2 Fixation and Reserves in Nodulated Medicago sativa L. During Regrowth. Journal of Experimental Botany 44, 555–562.

Kim J, Rees DC. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry 33, 389–397.

Köpke U, Nemecek T. 2010. Ecological services of faba bean. Field Crops Research 115, 217–233.

Koranda M, Schnecker J, Kaiser C, Fuchslueger L, Kitzler B, Stange CF, Sessitsch A, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A. 2011. Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech – The influence of plant C exudates. Soil Biology and Biochemistry 43, 551–558.

Kremen C, Miles A. 2012. Ecosystem Services in Biologically Diversified versus Conventional Farming Systems: Benefits, Externalities, and Trade-Offs. Ecology and Society 17.

Kumar S, Meena RS, Lal R, Singh Yadav G, Mitran T, Meena BL, Dotaniya ML, EL-Sabagh A. 2018. Role of Legumes in Soil Carbon Sequestration. In: Meena RS,, In: Das A,, In: Yadav GS,, In: Lal R, eds. Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Singapore: Springer, 109–138.

Kuzyakov Y. 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. Soil Biology and Biochemistry 42, 1363–1371.

Kuzyakov Y, Blagodatskaya E. 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. Soil Biology and Biochemistry 83, 184–199.

Kuzyakov Y, Domanski G. 2000a. Carbon input by plants into the soil. Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 421–431.

Kuzyakov Y, Domanski G. 2000b. Carbon input by plants into the soil. Review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 421–431.

Kuzyakov Y, Schneckenberger 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.

Labalette F, Guiavarc'h Y. 2016. Etats des lieux des productions et des échanges des légumineuses à graines. , 41.

Ladd JN, Foster RC, Nannipieri P, Oades JM. 1996. Soil structure and biological activity. Soil biochemistry 9, 23–78.

Lal R. 2015. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. Sustainability 7, 5875–5895.

Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S. 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. Microbiological Research 169, 2–17.

Lasbleiz R, Stokkink D. 2015. L'agroécologie: Inscrire l'agriculture dans la transition. Note d'analyse, Pour la solidarité.

Lashermes G, Gainvors-Claisse 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.

Lautre Y. 2020. Accroître l'indépendance en protéines végétales de la France.

Lawrie AC, Wheeler CT. 1973. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of Pisum sativum L. in relation to the fixation of nitrogen. New Phytologist 72, 1341–1348.

Le Noë J, Billen G, Garnier J. 2019. Trajectoires des systèmes de production agricole en France depuis la fin du XIXe siècle : une approche biogéochimique. Innovations Agronomiques 72, 149–161.

LeBauer DS, Treseder KK. 2008. Nitrogen Limitation of Net Primary Productivity in Terrestrial Ecosystems Is Globally Distributed. Ecology 89, 371–379.

Lecuyer B, Chatellier V, Daniel K. 2013. Le marché des engrais, la volatilité des prix et la dépendance de l'agriculture européenne.

Ledgard SF, Freney JR, Simpson JR. 1985. Assessing nitrogen transfer from legumes to associated grasses. Soil Biology and Biochemistry 17, 575–577.

Lee CG, Watanabe T, Sato Y, Murase J, Asakawa S, Kimura M. 2011. Bacterial populations assimilating carbon from 13C-labeled plant residue in soil: Analysis by a DNA-SIP approach. Soil Biology and Biochemistry 43, 814–822.

Lesuffleur F. 2007. Rhizodéposition à court terme de l'azote et exsudation racinaire des acides aminés par le trèfle blanc (Trifolium repens L.). Caen.

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.

Lesuffleur F, Salon C, Jeudy C, Cliquet JB. 2013. Use of a 15N2 labelling technique to estimate exudation by white clover and transfer to companion ryegrass of symbiotically fixed N. Plant and Soil 369, 187–197.

Levy-Booth DJ, Prescott CE, Grayston SJ. 2014. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 75, 11–25.

Li M, Chen Z, Qian J, Wei F, Zhang G, Wang Y, Wei G, Hu Z, Dong L, Chen S. 2020. Composition and function of rhizosphere microbiome of Panax notoginseng with discrepant yields. Chinese medicine 15, 1–12.

Li Z, Tian D, Wang B, Wang J, Wang S, Chen HYH, Xu X, Wang C, He N, Niu S. 2019. Microbes drive global soil nitrogen mineralization and availability. Global Change Biology 25, 1078–1088.

Lipton DS, Blanchar RW, Blevins DG. 1987. Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed Medicago sativa L. Seedlings. Plant Physiology 85, 315–317.

Liu J, Chen J, Chen G, Guo J, Li Y. 2020. Enzyme stoichiometry indicates the variation of microbial nutrient requirements at different soil depths in subtropical forests (J Paz-Ferreiro, Ed.). PLOS ONE 15, e0220599.

Liu Y, Ge T, Zhu Z, et al. 2019. Carbon input and allocation by rice into paddy soils: A review. Soil Biology and Biochemistry 133, 97–107.

Liu S, He F, Kuzyakov Y, Xiao H, Hoang DTT, Pu S, Razavi BS. 2022. Nutrients in the rhizosphere: A meta-analysis of content, availability, and influencing factors. Science of The Total Environment, 153908.

Liu H, Tang C, Li C. 2016. The effects of nitrogen form on root morphological and physiological adaptations of maize, white lupin and faba bean under phosphorus deficiency. AoB Plants 8.

Loges R, Bunne I, Reinsch T, Malisch C, Kluß C, Herrmann A, Taube F. 2018. Forage production in rotational systems generates similar yields compared to maize monocultures but improves soil carbon stocks. European Journal of Agronomy 97, 11–19.

Louarn G, Faverjon L, Bijelić Z, Julier B. 2016. Dynamique de l'azote dans les associations graminées -légumineuses : quels leviers pour valoriser l'azote fixé ? Fourrages 226, 135–142.

Louarn G, Pereira-Lopès E, Fustec J, Mary B, Voisin A-S, de Faccio Carvalho PC, Gastal F. 2015. The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white clover-based grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. Plant and Soil 389, 289–305.

Lu Y, Watanabe A, Kimura M. 2002. Contribution of plant-derived carbon to soil microbial biomass dynamics in a paddy rice microcosm. Biology and Fertility of Soils 36, 136–142.

Luciński R, Polcyn W, Ratajczak L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes. Acta Biochimica Polonica 49, 537–546.

Luo Y, Zhu Z, Liu S, Peng P, Xu J, Brookes P, Ge T, Wu J. 2019. Nitrogen fertilization increases rice rhizodeposition and its stabilization in soil aggregates and the humus fraction`. Plant and Soil 445, 125–135.

Lupwayi NZ, Kennedy AC. 2007. Grain Legumes in Northern Great Plains: Impacts on Selected Biological Soil Processes. Agronomy Journal 99, 1700–1709.

Lynch JM, Whipps JM. 1991. The Rhizosphere and Plant Growth. by DL Keister and B. Crogen (Kluwer, Amsterdam, 1991).

Mackenzie FT. 1999. Global Biogeochemical Cycles and the Physical Climate System. , 76.

Madsen EL. 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. Current opinion in biotechnology 22, 456–464.

Mahieu S. 2008. Assessment of the below ground contribution of field grown pea (Pisum sativum L.) to the soil N pool.

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.

Mahieu S, Fustec J, Jensen ES, Crozat Y. 2009. Does labelling frequency affect N rhizodeposition assessment using the cotton-wick method? Soil Biology and Biochemistry 41, 2236–2243.

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic press.

Marschner P, Rengel Z. 2012. Nutrient availability in soils. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Elsevier, 315–330.

Marschner H, Römheld V, Kissel M. 1987. Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. Physiologia Plantarum 71, 157–162.

Marschner P, Yang C-H, Lieberei R, Crowley DE. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 33, 1437–1445.

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends in Microbiology 17, 458–466.

Masson-Boivin C, Sachs JL. 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. Current Opinion in Plant Biology 44, 7–15.

Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ. 1997. Agricultural Intensification and Ecosystem Properties. Science 277, 504–509.

Matsumoto H, Okada K, Takahashi E. 1979. Excretion products of maize roots from seedling to seed development stage. Plant and Soil 53, 17–26.

Mayer J, Buegger F, Jensen ES, Schloter 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.

McCormack ML, Dickie IA, Eissenstat DM, et al. 2015. Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. New Phytologist 207, 505–518.

McDaniel MD, Tiemann LK, Grandy AS. 2014. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. Ecological Applications 24, 560–570.

McGill WB, Cole CV. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma 26, 267–286.

McNally SR, Laughlin DC, Rutledge S, Dodd MB, Six J, Schipper LA. 2015. Root carbon inputs under moderately diverse sward and conventional ryegrass-clover pasture: implications for soil carbon sequestration. Plant and Soil 392, 289–299.

McNeill AM, Hood RC, Wood M. 1994. Direct measurement of nitrogen fixation by Trifolium repens L. and Alnus glutinosa L. using 15N2. Journal of Experimental Botany 45, 749–755.

McNeill AM, Zhu C, Fillery IRP. 1997. Use of in situ 15N-labelling to estimate the total below-ground nitrogen of pasture legumes in intact soil–plant systems. Australian Journal of Agricultural Research 48, 295–304.

Meena RS, Das A, Yadav GS, Lal R. 2018a. Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Springer.

Meena BL, Fagodiya RK, Prajapat K, Dotaniya ML, Kaledhonkar MJ, Sharma PC, Meena RS, Mitran T, Kumar S. 2018b. Legume Green Manuring: An Option for Soil Sustainability. In: Meena RS,, In: Das A,, In: Yadav GS,, In: Lal R, eds. Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Singapore: Springer, 387–408.

Meena RS, Lal R. 2018. Legumes and sustainable use of soils. Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Springer, 1–31.

Meharg AA. 1994. A critical review of labelling techniques used to quantify rhizosphere carbon-flow. Plant and Soil 166, 55–62.

Meier IC, Finzi AC, Phillips RP. 2017. Root exudates increase N availability by stimulating microbial turnover of fast-cycling N pools. Soil Biology and Biochemistry 106, 119–128.

Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiology Reviews 37, 634–663.

Menon RR, Kumari S, Viver T, Rameshkumar N. 2020. Flavobacterium pokkalii sp. nov., a novel plant growth promoting native rhizobacteria isolated from pokkali rice grown in coastal saline affected agricultural regions of southern India, Kerala. Microbiological Research 240, 126533.

Merbach W, Schulze J, Richert M, Rrocco E, Mengel K. 2000. A comparison of different 15N application techniques to study the N net rhizodeposition in the plant-soil system. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163, 375–379.

Mergel A, Schmitz O, Mallmann T, Bothe H. 2001. Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. FEMS Microbiology Ecology 36, 33–42.

Miflin BJ, Cullimore JV. 1984. Nitrogen Assimilation in the Legume-Rhizobium Symbiosis: A Joint Endeavour. In: Verma DPS,, In: Hohn T, eds. Plant Gene Research. Genes Involved in Microbe-Plant Interactions. Vienna: Springer, 129–178.

Mimmo T, Hann S, Jaitz L, Cesco S, Gessa CE, Puschenreiter M. 2011. Time and substrate dependent exudation of carboxylates by Lupinus albus L. and Brassica napus L. Plant Physiology and Biochemistry 49, 1272–1278.

Mimmo T, Pii Y, Valentinuzzi F, Astolfi S, Lehto N, Robinson B, Brunetto G, Terzano R, Cesco S. 2018. Nutrient availability in the rhizosphere: a review. Acta Horticulturae, 13–28.

Minchin FR, Witty JF. 2005. Respiratory/Carbon Costs of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes. In: Lambers H,, In: Ribas-Carbo M, eds. Advances in Photosynthesis and Respiration. Plant Respiration: From Cell to Ecosystem. Dordrecht: Springer Netherlands, 195–205.

Ministère de l'argiculture et de l'alimentation. 2020. France Relance : le plan protéines végétales accélère son déploiement avec 26 nouveaux projets sur tout le territoire.

Moorhead DL, Rinkes ZL, Sinsabaugh RL, Weintraub MN. 2013. Dynamic relationships between microbial biomass, respiration, inorganic nutrients and enzyme activities: informing enzyme-based decomposition models. Frontiers in Microbiology 4.

Moorhead DL, Sinsabaugh RL, Hill BH, Weintraub MN. 2016a. Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. Soil Biology and Biochemistry 93, 1–7.

Moorhead DL, Sinsabaugh RL, Hill BH, Weintraub MN. 2016b. Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. Soil Biology and Biochemistry 93, 1–7.

Moreau D, Bardgett RD, Finlay RD, Jones DL, Philippot L. 2019. A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. Functional Ecology 33, 540–552.

Moroenyane I, Tremblay J, Yergeau É. 2021. Temporal and spatial interactions modulate the soybean microbiome. FEMS Microbiology Ecology 97.

Mouginot C, Kawamura R, Matulich KL, Berlemont R, Allison SD, Amend AS, Martiny AC. 2014. Elemental stoichiometry of Fungi and Bacteria strains from grassland leaf litter. Soil Biology and Biochemistry 76, 278–285.

Muruganandam S, Israel D, Robarge W. 2006. Activities of N-mineralization Enzymes Associated with Soil Aggregates in Three Different Tillage Systems. American Society of Agronomy Abstracts.

Muruganandam S, Israel DW, Robarge WP. 2009. Activities of Nitrogen-Mineralization Enzymes Associated with Soil Aggregate Size Fractions of Three Tillage Systems. Soil Science Society of America Journal 73, 751–759.

Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T. 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell 7, 869–885.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. European journal of soil science 54, 655–670.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G, Valori F. 2008. Effects of Root Exudates in Microbial Diversity and Activity in Rhizosphere Soils. In: Nautiyal CS,, In: Dion P, eds. Soil Biology. Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence. Berlin, Heidelberg: Springer, 339–365.

Nannipieri P, Trasar-Cepeda C, Dick RP. 2018. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. Biology and Fertility of Soils 54, 11–19.

Navas M, Benito M, Rodríguez I, Masaguer A. 2011. Effect of five forage legume covers on soil quality at the Eastern plains of Venezuela. Applied Soil Ecology 49, 242–249.

Nelson LM. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Crop management 3, 1–7.

Ngosong C, Jarosch M, Raupp J, Neumann E, Ruess L. 2010. The impact of farming practice on soil microorganisms and arbuscular mycorrhizal fungi: Crop type versus long-term mineral and organic fertilization. Applied Soil Ecology 46, 134–142.

Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23, 375–396.

Nguyen C. 2009. Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls. In: Lichtfouse E,, In: Navarrete M,, In: Debaeke P,, In: Véronique S,, In: Alberola C, eds. Sustainable Agriculture. Dordrecht: Springer Netherlands, 97–123.

Nielsen UN, Wall DH, Six J. 2015. Soil Biodiversity and the Environment. Annual Review of Environment and Resources 40, 63–90.

Nunan N, Daniell TJ, Singh BK, Papert A, McNicol JW, Prosser JI. 2005. Links between Plant and Rhizoplane Bacterial Communities in Grassland Soils, Characterized Using Molecular Techniques. Applied and Environmental Microbiology 71, 6784–6792.

Oburger E, Dell‘mour M, Hann S, Wieshammer G, Puschenreiter M, Wenzel WW. 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.

Oburger E, Jones DL. 2018. Sampling root exudates – Mission impossible? Rhizosphere 6, 116–133.

Oburger E, Schmidt H. 2016. New Methods To Unravel Rhizosphere Processes. Trends in Plant Science 21, 243–255.

Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annual Review of Genetics 45, 119–144.

Ostle N, Whiteley AS, Bailey MJ, Sleep D, Ineson P, Manefield M. 2003. Active microbial RNA turnover in a grassland soil estimated using a 13CO2 spike. Soil Biology and Biochemistry 35, 877–885.

Otieno N, Lally R, Kiwanuka S, Lloyd A, Ryan D, Germaine K, Dowling D. 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. Frontiers in Microbiology 6.

Ott T, van Dongen JT, Gu¨nther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005. Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development. Current Biology 15, 531–535.

Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID, Lafuente A, Caviedes MÁ. 2011. Legume–Rhizobium Symbioses as a Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. In: Khan MS,, In: Zaidi A,, In: Goel R,, In: Musarrat J, eds. Environmental Pollution. Biomanagement of Metal-Contaminated Soils. Dordrecht: Springer Netherlands, 95–123.

Panhwar QA, Jusop S, Naher UA, Othman R, Razi MI. 2013. Application of Potential Phosphate-Solubilizing Bacteria and Organic Acids on Phosphate Solubilization from Phosphate Rock in Aerobic Rice. The Scientific World Journal 2013, e272409.

Parvin K, Nahar K, Bhuiyan TF, Hasanuzzaman M. 2020. Fabaceae Plants Response and Tolerance to High Temperature Stress. The Plant Family Fabaceae. Springer, 337–371.

Paterson E. 2003. Importance of rhizodeposition in the coupling of plant and microbial productivity. European Journal of Soil Science 54, 741–750.

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.

Paungfoo-Lonhienne C, Wang W, Yeoh YK, Halpin N. 2017. Legume crop rotation suppressed nitrifying microbial community in a sugarcane cropping soil. Scientific Reports 7.

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.

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.

Paynel F, Cliquet JB. 2003. N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds. Agronomie 23, 503–510.

Paynel F, Lesuffleur F, Bigot J, Diquélou S, Cliquet J-B. 2008. A study of 15N transfer between legumes and grasses. Agronomy for Sustainable Development 28, 281–290.

Pelletier P, Surault F, Gastal F, Besnard A. 2016. Mieux comprendre les dynamiques d'évolution des légumineuses dans les associations et les prairies multi-espèces. Les légumineuses fourragères et prairiales : Quoi de neuf ? Les Journées de l'AFPF. Paris, France: Association Française pour la Production Fourragère (AFPF). Versailles, FRA., 247 p.

Pelzer E, Bedoussac L, Corre - Hellou G, Jeuffroy M-H, Métivier T, Naudin C. 2014. Association de cultures annuelles combinant une légumineuse et une céréale : retours d'expériences d'agriculteurs et analyse. Innovations Agronomiques 40, 73–91.

Peoples MB, Brockwell J, Herridge DF, et al. 2009. The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. Symbiosis 48, 1–17.

Peoples MB, Chalk PM, Unkovich MJ, Boddey RM. 2015. Can differences in 15N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? Soil Biology and Biochemistry 87, 97–109.

Peoples MB, Herridge DF, Ladha JK. 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? Plant and Soil 174, 3–28.

Pertriaux. 2019. Premier bilan du soja made in Normandy. l'Agriculteur Normand.

Philippot L, Kuffner M, Chèneby D, Depret G, Laguerre G, Martin-Laurent F. 2006. Genetic structure and activity of the nitrate-reducers community in the rhizosphere of different cultivars of maize. Plant and Soil 287, 177–186.

Pirhofer-Walzl K, Rasmussen J, Høgh-Jensen H, Eriksen J, Søegaard K, Rasmussen J. 2012. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. Plant and Soil 350, 71–84.

Pittarello M, Dal Ferro N, Chiarini F, Morari F, Carletti P. 2021. Influence of Tillage and Crop Rotations in Organic and Conventional Farming Systems on Soil Organic Matter, Bulk Density and Enzymatic Activities in a Short-Term Field Experiment. Agronomy 11, 724.

Plante AF. 2007. 15 - SOIL BIOGEOCHEMICAL CYCLING OF INORGANIC NUTRIENTS AND METALS. In: Paul EA, ed. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition). San Diego: Academic Press, 389–432.

Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. Plant and soil 70, 199–209.

Plénet D, Simon S. 2015. Abstract. Sciences Eaux Territoires 16, 58–63.

Pointereau P. 2001. Légumineuses : quels enjeux écologiques ? Le Courrier de l'environnement de l'INRA, 69–72.

Pokharel P, Ma Z, Chang SX. 2020. Biochar increases soil microbial biomass with changes in extra- and intracellular enzyme activities: a global meta-analysis. Biochar 2, 65–79.

Poth M, La Favre JS, Focht DD. 1986. Quantification by direct 15N dilution of fixed N2 incorporation into soil by Cajanus cajan (Pigeon Pea). Soil Biology and Biochemistry 18, 125–127.

Preece C, Peñuelas J. 2016. Rhizodeposition under drought and consequences for soil communities and ecosystem resilience. Plant and Soil 409, 1–17.

Priest FG. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. Bacteriological Reviews 41, 711–753.

Prieto I, Stokes A, Roumet C. 2016. Root functional parameters predict fine root decomposability at the community level. Journal of Ecology 104, 725–733.

Puissant J, Jones B, Goodall T, et al. 2019. The pH optimum of soil exoenzymes adapt to long term changes in soil pH. Soil Biology and Biochemistry 138, 107601.

PUJIC P, NORMAND P. 2009. La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes: Interactions plantes/micro-organismes. Biofutur (Puteaux), 26–29.

Punja ZK, Zhang Y-Y. 1993. Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases. Journal of Nematology 25, 526–540.

Rabot E, Keller C, Ambrosi J-P, Robert S. 2017. Revue des méthodes multiparamétriques pour l'estimation de la qualité des sols dans le cadre de l'aménagement du territoire. Etude et Gestion des Sols, 14.

Rabot E, Wiesmeier M, Schlüter S, Vogel H-J. 2018. Soil structure as an indicator of soil functions: a review. Geoderma 314, 122–137.

Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature 403, 646–649.

Rao CS, Grover M, Kundu S, Desai S. 2017. Soil enzymes. Encyclopedia of soil science. Taylor & Francis, Boca Raton.

Rasmussen J. 2011. Why we need to restrict the use of "rhizodeposition" and the Janzen and Bruinsma equation. Soil Biology and Biochemistry 43, 2213–2214.

Rasmussen J, Gylfadóttir T, Dhalama NR, 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.

Raza A, Zahra N, Hafeez MB, Ahmad M, Iqbal S, Shaukat K, Ahmad G. 2020. Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology. In: Hasanuzzaman M,, In: Araújo S,, In: Gill SS, eds. The Plant Family Fabaceae: Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses. Singapore: Springer, 43–74.

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

Redecker D, Schüßler A. 2014. 9 Glomeromycota. In: McLaughlin DJ,, In: Spatafora JW, eds. The Mycota. Systematics and Evolution: Part A. Berlin, Heidelberg: Springer, 251–269.

Regus JU, Gano KA, Hollowell AC, Sofish V, Sachs JL. 2015. Lotus hosts delimit the mutualism–parasitism continuum of B radyrhizobium. Journal of Evolutionary Biology 28, 447–456.

Reinhold-Hurek B, Bünger W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T. 2015. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. Annual Review of Phytopathology 53, 403–424.

Rejmánková E, Sirová D. 2007. Wetland macrophyte decomposition under different nutrient conditions: relationships between decomposition rate, enzyme activities and microbial biomass. Soil Biology and Biochemistry 39, 526–538.

Rezgui C. 2020. 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.

Rezgui C, Riah-Anglet W, Benoit M, Bernard PY, Laval K, Trinsoutrot-Gattin I. 2020. Impacts of the Winter Pea Crop (Instead of Rapeseed) on Soil Microbial Communities, Nitrogen Balance and Wheat Yield. Agriculture 10, 548.

Riah W, Laval K, Laroche-Ajzenberg E, Mougin C, Latour X, Trinsoutrot-Gattin I. 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. Environmental chemistry letters 12, 257–273.

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.

Ribbons RR, Levy-Booth DJ, Masse J, Grayston SJ, McDonald MA, Vesterdal L, Prescott CE. 2016. Linking microbial communities, functional genes and nitrogen-cycling processes in forest floors under four tree species. Soil Biology and Biochemistry 103, 181–191.

Richardson AE, George TS, Hens M, Delhaize E, Ryan PR, Simpson RJ, Hocking PJ. 2022. Organic anions facilitate the mobilization of soil organic phosphorus and its subsequent lability to phosphatases. Plant and Soil.

Riederer M, Pausch J, Kuzyakov Y, Foken T. 2015. Partitioning NEE for absolute C input into various ecosystem pools by combining results from eddy-covariance, atmospheric flux partitioning and 13CO2 pulse labeling. Plant and Soil 390, 61–76.

Rietz DN, Haynes RJ. 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. Soil Biology and Biochemistry 35, 845–854.

Robson TM, Lavorel S, Clement J-C, Le Roux X. 2007. Neglect of mowing and manuring leads to slower nitrogen cycling in subalpine grasslands. Soil Biology and Biochemistry 39, 930–941.

Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. The ISME Journal 1, 283–290.

Rossato L, Laine P, Ourry A. 2001. Nitrogen storage and remobilization in Brassica napus L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. Journal of Experimental Botany 52, 1655–1663.

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

Rousk J, Bengtson P. 2014. Microbial regulation of global biogeochemical cycles. Frontiers in Microbiology 5.

Rousset M. 2002. Bread wheat breeding for grain and flour quality parameters. Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France (France).

Rovira AD. 1961. Rhizobium numbers in the rhizospheres of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. Australian Journal of Agricultural Research 12, 77–83.

Rroço 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.

Rudel TK, Schneider L, Uriarte M, Turner BL, DeFries R, Lawrence D, Geoghegan J, Hecht S, Ickowitz A, Lambin EF. 2009. Agricultural intensification and changes in cultivated areas, 1970–2005. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 20675–20680.

Russell CA, Fillery IRP. 1996. Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. Australian Journal of Agricultural Research 47, 1047–1059.

Russelle MP, Allan DL, Gourley CJP. 1994. Direct assessment of symbiotically fixed nitrogen in the rhizosphere of alfalfa. Plant and Soil 159, 233–243.

Saarnio S, Wittenmayer L, Merbach W. 2004. Rhizospheric exudation of Eriophorum vaginatum L. — Potential link to methanogenesis. Plant and Soil 267, 343–355.

Sachs JL, Ehinger MO, Simms EL. 2010. Origins of cheating and loss of symbiosis in wild Bradyrhizobium. Journal of evolutionary biology 23, 1075–1089.

Sachs JL, Quides KW, Wendlandt CE. 2018. Legumes versus rhizobia: a model for ongoing conflict in symbiosis. New Phytologist 219, 1199–1206.

Safronova VI, Piluzza G, Bullitta S, Belimov AA. 2011. Use of legume-microbe symbioses for phytoremediation of heavy metal polluted soils: advantages and potential problems. Handbook for phytoremediation. Nova Publishers, New York, 443–470.

Sainju UM, Ghimire R, Pradhan GP. 2019. Nitrogen Fertilization I: Impact on Crop, Soil, and Environment. Nitrogen Fixation.

Sameshima-Saito R, Chiba K, Hirayama J, Itakura M, Mitsui H, Eda S, Minamisawa K. 2006. Symbiotic Bradyrhizobium japonicum Reduces N2O Surrounding the Soybean Root System via Nitrous Oxide Reductase. Applied and Environmental Microbiology 72, 2526–2532.

Sannino F, Gianfreda L. 2001. Pesticide influence on soil enzymatic activities. Chemosphere 45, 417–425.

Santos SR, Silva E de B, Alleoni LRF, Grazziotti PH. 2017. Citric acid influence on soil phosphorus availability. Journal of Plant Nutrition 40, 2138–2145.

Santoyo G, Orozco-Mosqueda Ma del C, Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of Bacillus and Pseudomonas: a review. Biocontrol Science and Technology 22, 855–872.

Sarapatka B. 2003. Phosphatase activities (ACP, ALP) in agroecosystem soils.

Sardans J, Peñuelas J, Estiarte M. 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. Applied Soil Ecology 39, 223–235.

Sarkar JM, Leonowicz A, Bollag J-M. 1989. Immobilization of enzymes on clays and soils. Soil Biology and Biochemistry 21, 223–230.

Sawatsky N, Soper RJ. 1991. A quantitative measurement of the nitrogen loss from the root system of field peas (Pisum avense L.) grown in the soil. Soil Biology and Biochemistry 23, 255–259.

Schäffer A. 1993. Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystem. Soil biochemistry 8, 273–340.

Schaffer WM, Inouye RS, Whittam TS. 1982. Energy allocation by an annual plant when the effects of seasonality on growth and reproduction are decoupled. The American Naturalist 120, 787–815.

Scheider A, Huyghe C, Maleplade T, Labalette F, Peyronnet C, Carrouée E. 2015. Rôle deslégumineuses dans l'agriculture française. Schneider A. & Huyghe C.(Coordonnateurs), Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables, Quae, Versailles, France.

Schenck zu Schweinsberg-Mickan M, Jörgensen RG, 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.

Scheu S. 2002. The soil food web: structure and perspectives. European Journal of Soil Biology 38, 11–20.

Schiltz S, Munier-Jolain N, Jeudy C, Burstin J, Salon C. 2005. Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by 15N in vivo labeling throughout seed filling. Plant Physiology 137, 1463–1473.

Schirawski J, Perlin MH. 2018. Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. International Journal of Molecular Sciences 19, 1374.

Schlesinger WH, Andrews JA. 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. Biogeochemistry 48, 7–20.

Schmeer M, Loges R, Dittert K, Senbayram M, Horn R, Taube F. 2014. Legume-based forage production systems reduce nitrous oxide emissions. Soil and Tillage Research 143, 17–25.

Schmidtke K. 2005. How to calculate nitrogen rhizodeposition: a case study in estimating N rhizodeposition in the pea (Pisum sativum L.) and grasspea (Lathyrus sativus L.) using a continuous 15N labelling split-root technique. Soil Biology and Biochemistry 37, 1893–1897.

Schneider A, Huyghe C. 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. éditions Quae.

Schrader LE, Domska D, Jung PE, Peterson LA. 1972. Uptake and Assimilation of Ammonium-N and Nitrate-N and Their Influence on the Growth of Corn (Zea mays L.)1. Agronomy Journal 64, 690–695.

Schultze M, Kondorosi A. 1998. Regulation of Symbiotic Root Nodule Development. Annual Review of Genetics 32, 33–57.

Sekaran U, Sandhu SS, Qiu Y, Kumar S, Gonzalez Hernandez JL. 2020. Biochar and manure addition influenced soil microbial community structure and enzymatic activities at eroded and depositional landscape positions. Land Degradation & Development 31, 894–908.

Serban A, Nissenbaum A. 1986. Humic acid association with peroxidase and catalase. Soil Biology and Biochemistry 18, 41–44.

Shahzad T, Chenu C, Genet P, Barot S, Perveen N, Mougin C, Fontaine S. 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. Soil Biology and Biochemistry 80, 146–155.

Shamseldin A, Abdelkhalek A, Sadowsky MJ. 2017. Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. Symbiosis 71, 91–109.

Sharma S, Aneja MK, Mayer J, Munch JC, Schloter M. 2005. Characterization of Bacterial Community Structure in Rhizosphere Soil of Grain Legumes. Microbial Ecology 49, 407–415.

Sharma M, Gupta SK. 2014. Approaches and Trends in Plant Disease Management. Scientific Publishers.

Shtark O, Puzanskiy R, Avdeeva G, et al. 2021. Metabolic Alterations in Pisum sativum Roots during Plant Growth and Arbuscular Mycorrhiza Development. Plants 10, 1033.

Siczek A, Frąc M, Gryta A. 2020a. Forecrop Effects on Abundance and Diversity of Soil Microorganisms during the Growth of the Subsequent Crop. Agronomy 10, 1971.

Siczek A, Frąc M, Gryta A, Kalembasa S, Kalembasa D. 2020b. Variation in soil microbial population and enzyme activities under faba bean as affected by pentachlorophenol. Applied Soil Ecology 150, 103466.

Siczek A, Frąc M, Kalembasa S, Kalembasa D. 2018. Soil microbial activity of faba bean (Vicia faba L.) and wheat (Triticum aestivum L.) rhizosphere during growing season. Applied Soil Ecology 130, 34–39.

Siczek A, Lipiec J. 2016. Impact of Faba Bean-Seed Rhizobial Inoculation on Microbial Activity in the Rhizosphere Soil during Growing Season. International Journal of Molecular Sciences 17, 784.

Sierra J, Daudin D, Domenach A-M, Nygren P, Desfontaines L. 2007. Nitrogen transfer from a legume tree to the associated grass estimated by the isotopic signature of tree root exudates: A comparison of the 15N leaf feeding and natural 15N abundance methods. European Journal of Agronomy 27, 178–186.

Sims JL, Sims RC, Matthews JE. 1990. Approach to Bioremediation of Contaminated Soil. Hazardous Waste and Hazardous Materials 7, 117–149.

Singh G, Mukerji KG. 2006. Root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity. Microbial activity in the rhizoshere. Springer, 39–53.

Sinsabaugh RL, Antibus RK, Linkins AE, McClaugherty CA, Rayburn L, Repert D, Weiland T. 1993. Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. Ecology 74, 1586–1593.

Sinsabaugh RL, Hill BH, Follstad Shah JJ. 2009. Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. Nature 462, 795–798.

Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, et al. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. Ecology Letters 11, 1252–1264.

Six J, Bossuyt H, Degryze S, Denef K. 2004. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. Soil and Tillage Research 79, 7–31.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G. 2001. Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. Applied and Environmental Microbiology 67, 4742–4751.

Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal

roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. Plant physiology 156, 1050–1057.

Soltani AA, Khavazi K, Rahmani H, Omidvari M, Abbaszadeh Dahaji P, Hamed M. 2010. Plant Growth Promoting Characteristics in Some Flavobacterium spp. Isolated from Soils of Iran. Journal of Agricultural Science 2.

de Sousa RS, Nunes LAPL, Antunes JEL, de Araujo ASF. 2019. Maize rhizosphere soil stimulates greater soil microbial biomass and enzyme activity leading to subsequent enhancement of cowpea growth. Environmental Sustainability 2, 89–94.

Sprent JI, Thomas RJ. 1984. Nitrogen nutrition of seedling grain legumes: some taxonomic, morphological and physiological constraints. Plant, Cell & Environment 7, 637–645.

Stagnari F, Maggio A, Galieni A, Pisante M. 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. Chemical and Biological Technologies in Agriculture 4, 2.

Steinauer K, Chatzinotas A, Eisenhauer N. 2016. Root exudate cocktails: the link between plant diversity and soil microorganisms? Ecology and Evolution 6, 7387–7396.

Sterner RW, Elser JJ. 2002. Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press.

Stevenel P, Frossard E, Abiven S, Rao IM, Tamburini F, Oberson A. 2019. Using a Tri-Isotope (13C, 15N, 33P) Labelling Method to Quantify Rhizodeposition. In: Reinhardt D,, In: Sharma AK, eds. Methods in Rhizosphere Biology Research. Singapore: Springer Singapore, 169–195.

Stougaard J. 2000. Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. Plant Physiology 124, 531–540.

Strehmel N, Böttcher C, Schmidt S, Scheel D. 2014. Profiling of secondary metabolites in root exudates of Arabidopsis thaliana. Phytochemistry 108, 35–46.

Subhani A, Changyong H, Zhengmiao X, Min L, El-ghamry AM. 2001. Impact of Soil Environment and Agronomic Practices on Microbial/Dehydrogenase Enzyme Activity in Soil. A Review. Pakistan Journal of Biological Sciences 4, 333–338.

Sultani MI, Gill MA, Anwar MM, Athar M. 2007. Evaluation of soil physical properties as influenced by various green manuring legumes and phosphorus fertilization under rain fed conditions. International Journal of Environmental Science & Technology 4, 109–118.

Sutton MA, Howard CM, Erisman JW, Billen G, Bleeker A, Grennfelt P, Van Grinsven H, Grizzetti B. 2011. The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives. Cambridge University Press.

Swift MJ, Heal OW, Anderson JM, Anderson JM. 1979. Decomposition in terrestrial ecosystems. Univ of California Press.

Tabatabai MA. 1994. Soil enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties 5, 775–833.

Tabatabai MA, Ekenler M, Senwo ZN. 2010. Significance of enzyme activities in soil nitrogen mineralization. Communications in soil science and plant analysis 41, 595–605.

Tabatabai MA, García-Manzanedo AM, Acosta-Martınez V. 2002. Substrate specificity of arylamidase in soils. Soil Biology and Biochemistry 34, 103–110.

Talukdar D. 2013. Leguminosae. In: Maloy S,, In: Hughes K, eds. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). San Diego: Academic Press, 212–216.

Tang X, Bernard L, Brauman A, Daufresne T, Deleporte P, Desclaux D, Souche G, Placella SA, Hinsinger P. 2014. Increase in microbial biomass and phosphorus availability in the rhizosphere of intercropped cereal and legumes under field conditions. Soil Biology and Biochemistry 75, 86–93.

Tang H, Li C, Cheng K, Shi L, Wen L, Li W, Xiao X. 2021. Effects of different tillage management on rhizosphere soil nitrogen mineralization and its extracellular enzyme activity in a double-cropping rice paddy field of southern China. Land Degradation & Development 32, 4933–4943.

Tang X, Placella SA, Daydé F, Bernard L, Robin A, Journet E-P, Justes E, Hinsinger P. 2016. Phosphorus availability and microbial community in the rhizosphere of intercropped cereal and legume along a P-fertilizer gradient. Plant and Soil 407, 119–134.

Tawaraya K, Hashimoto K, Wagatsuma T. 1998. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita. Mycorrhiza 8, 67–70.

Tegeder M, Masclaux-Daubresse C. 2018. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. New Phytologist 217, 35–53.

Terzano R, Cesco S, Mimmo T. 2015. Dynamics, thermodynamics and kinetics of exudates: crucial issues in understanding rhizosphere processes. Plant and soil 386, 399–406.

Thakur MP, Del Real IM, Cesarz S, Steinauer K, Reich PB, Hobbie S, Ciobanu M, Rich R, Worm K, Eisenhauer N. 2019. Soil microbial, nematode, and enzymatic responses to elevated CO2, N fertilization, warming, and reduced precipitation. Soil Biology and Biochemistry 135, 184–193.

Thénard V, Jost J, Choisis J, Magne M-A. 2014. Applying agroecological principles to redesign and to assess dairy sheep farming systems.

Thoma JA, Spradlin JE, Dygert S. 1971. 6 Plant and animal amylases. The enzymes. Elsevier, 115–189.

Thomas F, Archambeaud M. 2005. Couverts végétaux. Techniques Culturales Simplifiées 33, 12–25.

Thomloudi E-E, Tsalgatidou PC, Douka D, Spantidos T-N, Dimou M, Venieraki A, Katinakis P. 2019. Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants - The compatibility issue. Hellenic Plant Protection Journal 12, 61–77.

Tian T, Reverdy A, She Q, Sun B, Chai Y. 2020. The role of rhizodeposits in shaping rhizomicrobiome. Environmental Microbiology Reports 12, 160–172.

Tikhonovich IA, Provorov NA. 2007. Chapter 14 - Beneficial plant–microbe interactions. In: Dyakov YuT,, In: Dzhavakhiya VG,, In: Korpela T, eds. Studies in Plant Science. Comprehensive and Molecular Phytopathology. Amsterdam: Elsevier, 365–420.

Tittonell P. 2014. Ecological intensification of agriculture—sustainable by nature. Current Opinion in Environmental Sustainability 8, 53–61.

Todorovic C, Nguyen C, Robin C, Guckert A. 1999. 14C-assimilate partitioning within white clover plant–soil system: effects of photoperiod/temperature treatments and defoliation. European Journal of Agronomy 11, 13–21.

Tomasi N, Weisskopf L, Renella G, Landi L, Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P, Torrent J, Martinoia E, Cesco S. 2008. Flavonoids of white lupin roots participate in phosphorus mobilization from soil. Soil Biology and Biochemistry 40, 1971–1974.

Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Current Opinion in Microbiology 5, 240–245.

Tosi M, Brown S, Machado PVF, Wagner-Riddle C, Dunfield K. 2020. Short-term response of soil N-cycling genes and transcripts to fertilization with nitrification and urease inhibitors, and relationship with field-scale N2O emissions. Soil Biology and Biochemistry 142, 107703.

Trenkel ME. 1997. Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. International Fertilizer Industry Association Paris.

Turbé A. 2010. Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers. , 251.

Turgeon R. 1989. The sink-source transition in leaves. Annual review of plant biology 40, 119–138.

Udvardi M, Poole PS. 2013. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. Annual Review of Plant Biology 64, 781–805.

Uijttewaal A, Chapuis S, Crocq G, Lépée P. 2016. Quoi de neuf en matière de récolte et conservation des légumineuses fourragères. Actes des Journées de l'AFPF, ce document.

Uren NC. 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. p. 19–40. R. Pinton et al.(ed.) The rhizosphere: Biogeochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, New York. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. p. 19–40. In R. Pinton et al.(ed.) The rhizosphere: Biogeochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, New York.

Vandenkoornhuyse P, Mahé S, Ineson P, Staddon P, Ostle N, Cliquet J-B, Francez A-J, Fitter AH, Young JPW. 2007. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 16970–16975.

Varin S, Cliquet J-B, Personeni E, Avice J-C, Lemauviel-Lavenant S. 2010. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (Trifolium repens L.)? Journal of Experimental Botany 61, 225–234.

Veloso MG, Cecagno D, Bayer C. 2019. Legume cover crops under no-tillage favor organomineral association in microaggregates and soil C accumulation. Soil and Tillage Research 190, 139–146.

Velten S, Leventon J, Jager N, Newig J. 2015. What Is Sustainable Agriculture? A Systematic Review. Sustainability 7, 7833–7865.

Verma P, Yadav AN, Kumar V, Singh DP, Saxena AK. 2017. Beneficial Plant-Microbes Interactions: Biodiversity of Microbes from Diverse Extreme Environments and Its Impact for Crop Improvement. In: Singh DP,, In: Singh HB,, In: Prabha R, eds. Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts. Singapore: Springer, 543–580.

Vertes F, Jeuffroy M-H, Justes E, Thiebeau 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.

Vertès F, Jeuffroy M-H, Louarn G, Voisin A-S, Justes E. 2015. Légumineuses et prairies temporaires : des fournitures d'azote pour les rotations. , 14.

Vijayakumar V. 2018. Symbiotic Tripartism in the Model Plant Family of Legumes and Soil Sustainability. Legumes for Soil Health and Sustainable Management. Springer, 173–203.

Villarino SH, Pinto P, Jackson RB, Piñeiro G. 2021. Plant rhizodeposition: A key factor for soil organic matter formation in stable fractions. Science Advances 7, eabd3176.

Vitousek PM, Howarth RW. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? Biogeochemistry 13, 87–115.

Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. Plant Cell Reports 39, 3–17.

Voisin A-S, Gastal F. 2015. Nutrition azotée et fonctionnement agrophysiologique spécifique des légumineuses. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Editions Quae, 512 p.

Voisin A-S, Guéguen J, Huyghe C, Jeuffroy M-H, Magrini M-B, Meynard JM, Mougel C, Pellerin S, Pelzer E. 2013a. Les légumineuses dans l'Europe du XXIè siècle: Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs? Quels nouveaux défis pour la recherche? , 31.

Voisin A-S, Guéguen J, Huyghe C, Jeuffroy M-H, Magrini M-B, Meynard JM, Mougel C, Pellerin S, Pelzer E. 2013b. Les légumineuses dans l'Europe du XXIè siècle : Quelle place dans les systèmes agricoles et alimentaires actuels et futurs ? Quels nouveaux défis pour la recherche ? Innovations Agronomiques 30, 283–312.

Voisin A-S, Nicolardot B, Cellier P, Jeuffroy M-H. 2017. Les services écosystémiques rendus par les légumineuses vis-à-vis du cycle de l'azote.4 p.

Voisin A-S, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR. 2003a. Seasonal Patterns of 13C Partitioning Between Shoots and Nodulated Roots of N2-or Nitrate-fed Pisum sativum L. Annals of Botany 91, 539–546.

Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR. 2003b. Root and Nodule Growth in Pisum sativum L. in Relation to Photosynthesis: Analysis Using 13C-labelling. Annals of Botany 92, 557–563.

Voisin A-S, Salon C, Munier-Jolain NG, Ney B. 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (Pisum sativum L.). Plant and Soil 243, 31–42.

Vong P-C, Dedourge O, Lasserre-Joulin F, Guckert A. 2003. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. Soil biology and biochemistry 35, 1651–1661.

Vranova V, Rejsek K, Formanek P. 2013. Proteolytic activity in soil: A review. Applied Soil Ecology 70, 23–32.

de Vries FT, Bardgett RD. 2016. Plant community controls on short-term ecosystem nitrogen retention. New Phytologist 210, 861–874.

Wahbi S, Prin Y, Thioulouse J, et al. 2016. Impact of Wheat/Faba Bean Mixed Cropping or Rotation Systems on Soil Microbial Functionalities. Frontiers in Plant Science 7.

Wakelin S, Tillard G, Ham R van, Ballard R, Farquharson E, Gerard E, Geurts R, Brown M, Ridgway H, O'Callaghan M. 2018. High spatial variation in population size and symbiotic performance of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii with white clover in New Zealand pasture soils. PLOS ONE 13, e0192607.

Wall DH, Behan-Pelletier V, Ritz K, Herrick JE, Jones TH, Six J, Strong DR, Putten WH van der. 2012. Soil Ecology and Ecosystem Services. OUP Oxford.

Wallenstein MD, Vilgalys RJ. 2005. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. Pedobiologia 49, 665–672.

Wang R, Cavagnaro TR, Jiang Y, Keitel C, Dijkstra FA. 2021. Carbon allocation to the rhizosphere is affected by drought and nitrogen addition. Journal of Ecology 109, 3699–3709.

Wang L, Gan Y, Bainard LD, Hamel C, St-Arnaud M, Hijri M. 2020a. Expression of N-cycling genes of root microbiomes provides insights for sustaining oilseed crop production. Environmental Microbiology 22, 4545–4556.

Wang Y, Lambers H. 2020. Root-released organic anions in response to low phosphorus availability: recent progress, challenges and future perspectives. Plant and Soil 447, 135–156.

Wang X, Yang Y, Pei K, Zhou J, Peixoto L, Gunina A, Zeng Z, Zang H, Rasmussen J, Kuzyakov Y. 2020b. Nitrogen rhizodeposition by legumes and its fate in agroecosystems: A field study and literature review. Land Degradation & Development.

Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume – rhizobial mutualism. Cellular Microbiology 14, 334–342.

Warembourg FR, Roumet C. 1989. Why and how to estimate the cost of symbiotic N 2 fixation? A progressive approach based on the use of 14 C and 15 N isotopes. Plant and Soil 115, 167–177.

Wenzel WW, Wieshammer G, Fitz WJ, Puschenreiter M. 2001. Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution. Plant and Soil 237, 37–45.

Wezel A, Brives H, Casagrande M, Clément C, Dufour A, Vandenbroucke P. 2016. Agroecology territories: places for sustainable agricultural and food systems and biodiversity conservation. Agroecology and Sustainable Food Systems 40, 132–144.

Wezel A, Jauneau J-C. 2011. Agroecology – Interpretations, Approaches and Their Links to Nature Conservation, Rural Development and Ecotourism. In: Campbell WB,, In: Lopez Ortiz S, eds. Issues in Agroecology – Present Status and Future Prospectus. Integrating Agriculture, Conservation and Ecotourism: Examples from the Field. Dordrecht: Springer Netherlands, 1–25.

Whipps JM. 1990. Carbon economy. The rhizosphere., 59–97.

Wichern F, Eberhardt E, Mayer J, Joergensen RG, Müller T. 2008. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. Soil Biology and Biochemistry 40, 30–48.

Wichern F, Mayer J, Joergensen RG, Müller T. 2007. Rhizodeposition of C and N in peas and oats after 13C–15N double labelling under field conditions. Soil Biology and Biochemistry 39, 2527–2537.

Williams A, Langridge H, Straathof AL, Muhamadali H, Hollywood KA, Goodacre R, de Vries FT. 2022. Root functional traits explain root exudation rate and composition across a range of grassland species. Journal of Ecology 110, 21–33.

Wilson DO, Reisenauer HM. 1963. Determination of leghemoglobin in legume nodules. Analytical Biochemistry 6, 27–30.

Wu A-L, Jiao X-Y, Wang J-S, Dong E-W, Guo J, Wang L-G, Sun A-Q, Hu H-W. 2021. Sorghum rhizosphere effects reduced soil bacterial diversity by recruiting specific bacterial species under low nitrogen stress. Science of The Total Environment 770, 144742.

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.

Wurst S, De Deyn GB, Orwin K. 2012. Soil biodiversity and functions. Soil ecology and ecosystem services, 28–44.

Xiao W, Chen X, Jing X, Zhu B. 2018. A meta-analysis of soil extracellular enzyme activities in response to global change. Soil Biology and Biochemistry 123, 21–32.

Xu G, Fan X, Miller AJ. 2012. Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. Annual Review of Plant Biology 63, 153–182.

Xu Z, Yu G, Zhang X, He N, Wang Q, Wang S, Wang R, Zhao N, Jia Y, Wang C. 2017. Soil enzyme activity and stoichiometry in forest ecosystems along the North-South Transect in eastern China (NSTEC). Soil Biology and Biochemistry 104, 152–163.

Yadav BK, Akhtar MohdS, Panwar J. 2015. Rhizospheric Plant-Microbe Interactions: Key Factors to Soil Fertility and Plant Nutrition. In: Arora NK, ed. Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. New Delhi: Springer India, 127–145.

Yang Z, Midmore DJ. 2005. Modelling plant resource allocation and growth partitioning in response to environmental heterogeneity. Ecological Modelling 181, 59–77.

Yasmin K, Cadisch G, Baggs EM. 2006. Comparing 15N-labelling techniques for enriching above- and below-ground components of the plant-soil system. Soil Biology and Biochemistry 38, 397–400.

Yasmin K, Cadisch G, Baggs EM. 2010. The significance of below-ground fractions when considering N and C partitioning within chickpea (Cicer arietinum L.). Plant and Soil 327, 247–259.

Yevdokimov I, Larionova A, Blagodatskaya E. 2016. Microbial immobilisation of phosphorus in soils exposed to drying-rewetting and freeze-thawing cycles. Biology and Fertility of Soils 52, 685–696.

Zaidi A, Khan MS, Rizvi A, Saif S, Ahmad B, Shahid Mohd. 2017. Role of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Legume Improvement. In: Zaidi A,, In: Khan MS,, In: Musarrat J, eds. Microbes for Legume Improvement. Cham: Springer International Publishing, 175–197.

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.): C and N rhizodeposition of soya bean and oat. European Journal of Soil Science 69, 625–633.

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.) (Z Cheng, Ed.). PLOS ONE 10, e0121132.

Zelenev VV, van Bruggen AHC, Semenov AM. 2005. Modeling wave-like dynamics of oligotrophic and copiotrophic bacteria along wheat roots in response to nutrient input from a growing root tip. Ecological Modelling 188, 404–417.

Zhang X, Dippold MA, Kuzyakov Y, Razavi BS. 2019. Spatial pattern of enzyme activities depends on root exudate composition. Soil Biology and Biochemistry 133, 83–93.

Zhou LL, Cao J, Zhang FS, Li L. 2009. Rhizosphere acidification of faba bean, soybean and maize. Science of The Total Environment 407, 4356–4362.

Zhou L, Liu S, Shen H, Zhao M, Xu L, Xing A, Fang J. 2020. Soil extracellular enzyme activity and stoichiometry in China's forests. Functional Ecology 34, 1461–1471.

Zhu B, Cheng W. 2011. Rhizosphere priming effect increases the temperature sensitivity of soil organic matter decomposition. Global Change Biology 17, 2172–2183.

Zhu Z, Ge T, Liu S, Hu Y, Ye R, Xiao M, Tong C, Kuzyakov Y, Wu J. 2018. Rice rhizodeposits affect organic matter priming in paddy soil: The role of N fertilization and plant growth for enzyme activities, CO 2 and CH 4 emissions. Soil Biology and Biochemistry 116, 369–377.

Mohamed KANTE

Thèse de l'Université de Rouen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-alimentaires).

Titre : Rhizodéposition du carbone et de l'azote chez quatre espèces de Fabacées, conséquences sur la structure et l'activité du microbiote du sol

Résumé : L'utilisation des Fabacées dans les systèmes agricoles présente de nombreux avantages pour la préservation de l'environnement et le renforcement de la sécurité alimentaire. Parmi les nombreux services écosystémiques qu'ils fournissent, les Fabacées enrichissent le sol en carbone (C) et en azote (N) grâce à leur capacité à utiliser à la fois le C et l'N atmosphérique à travers la symbiose qu'elles forment avec les rhizobiacées et soutiennent ainsi les activités microbiennes rhizosphériques. Les travaux de cette thèse se sont intéressés à la fourniture de carbone et d'azote dans les sols à travers l'étude du processus de la rhizodéposition et de son impact sur la structure et l'activité des communautés microbiennes rhizosphériques. Ils ont porté sur deux Fabacées protéagineuses (pois et féverole) et deux Fabacées fourragères (trèfle blanc et trèfle incarnat) alors que le blé a été utilisé comme espèce non fixatrice d'N atmosphérique. Les objectifs de ce travail de thèse consistaient à évaluer (i) les flux de C et d'N de l'atmosphère vers le sol liés à la rhizodéposition, (ii) les conséquences sur la dynamique du C, de l'N et du phosphore (P) du sol par la mesure des activités enzymatiques et (iii) l'effet sur la structure des communautés microbiennes actives dans le sol. Les plantes ont été cultivées en conditions contrôlées. Une approche combinant le marquage au $^{13}CO_2$ et la méthode de dilution au ^{15}N du sol par l'N atmospherique a été mise en œuvre pour mesurer la rhizodéposition des plantes tout au long de leur croissance en relation avec les traits fonctionnels. Un panel d'activités enzymatiques clefs en lien avec le cycle du C, de l'N et du P a été mesuré et la technique de sondage isotopique ^{13}C de l'ADN « DNA SIP » a été utilisée pour étudier le lien entre la rhizodéposition et la structure des communauté bactériennes et fongiques actives dans la rhizosphère. Nos résultats montrent que les rhizodéposition du C et de l'N sont fortement contrôlées par la photosynthèse et la fixation biologique de l'azote atmosphérique et en conséquence par la vitesse de croissance des plantes. Ils montrent également que la féverole et les deux trèfles possèdent de bonnes capacités de rhizodéposition du C et de l'N. D'autres traits liés à l'architecture des racines sont apparus comme de bons prédicteurs de la rhizodéposition des plantes. Nous avons également constaté que les espèces présentant les quantités les plus importantes de rhizodépots présentent les niveaux d'activités enzymatiques les plus élevés dans le sol. Aussi, cet apport en nutriments N et C contribue aux besoins nutritionnels et à la croissance des microorganismes dans le sol. L'analyse de la structure des commuanutés actives montre que la féverole est associée à un microbiome rhizosphérique diversifié et enrichi en bactéries et champignons bénéfiques. Le determinisme des communautés actives est expliqué par la production de biomasse et la teneur en matière sèche des racines. Par ailleurs, l'analyse qualitative des exsudats devrait permettre de mieux comprendre l'impact de la rhizodéposition sur les microbiotes rhizosphèriques. Les comparaisons d'espèces observées ici en conditions contrôlées devront être validées par des approches complémentaires en plein champ.

Mots clés : Fabacées, Rhizodéposition, Marquage isotopique, Carbone, Azote, Microorganismes

Title: Carbon and nitrogen rhizodeposition from four Fabaceae species, consequences on soil microbiota structure and activity

Abstract: Fabaceae use in agricultural systems has many benefits for the environment and for food security. Among the numerous ecosystem services provided, Fabaceae enrich the soil with both carbon (C) and nitrogen (N) because of their ability to use both atmospheric C and N sources in symbiosis with Rhizobiaceae and are an important driver of soil ecology because they support microbial activities. The work of this thesis focused on C and N soil inputs through the study of the rhizodeposition process and its impact on soil microbial communities. Two grain Fabaceae (pea and faba bean) and two forage Fabaceae (white clover and crimson clover) and a non-fixing Poaceae, wheat, were studied. The objectives were to assess (i) the flux of C and N from the atmosphere (through plant photosynthesis and biological N fixation) to the soil; (ii) the consequences on C, N and P dynamics by measuring soil enzyme activities and (iii) on rhizospheric active microbial communities. Plants were grown under controlled conditions. An approach combining $^{13}CO_2$ labeling and the method measuring the dilution of soil ^{15}N by atmospheric N was carried out to measure plant rhizodeposition all along plant growth in relation with functional traits. Key enzyme activities related to C, N and P cycles were measured and the stable ^{13}C DNA isotope probing (DNA SIP) method was used to study the incorporation of plant-exuded ^{13}C into microbial communities. Our results show that rhizodepositions of C and N are strongly controlled by photosynthesis and biological nitrogen fixation of atmospheric nitrogen and consequently by the growth rate of plants. High rhizodeposition fluxes are observed for faba bean and both clover species. Traits related to root architecture appeared as good predictors of plant rhizodeposition. We also found that species with the highest amounts of rhizodeposition had the highest levels of enzyme activities in soil. This study also shows that N and C nutrient supply contributes to the nutritional requirements and growth of microorganisms in the soil. The study of the structure of active microbial communities showed that faba bean is associated with a diversified rhizospheric microbiome enriched in beneficial bacteria and fungi. The determinism of active microbial communities was explained by biomass production and root dry matter content. Qualitative analysis of root exudates should provide a better understanding of the impact of rhizodeposition on soil microbiota. The species comparisons observed here under controlled conditions will have to be validated by complementary approaches in the field.

Key words: Fabaceae, Rhizodeposition, Isotopic labeling, Carbon, Nitrogen, Microorganisms