



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

93600 00833

(11) 2005 BAZOT S.



Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources
Procédés Produits Environnement

Institut National Polytechnique de Lorraine

Ecole National Supérieur d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Unité Mixte de Recherche INRA-INPL Agronomie Environnement Nancy Colmar



N° attribué par la bibliothèque
051NPL043NT

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'INPL

Discipline : Sciences Agronomiques

présentée et soutenue publiquement

par

Stéphane Bazot

le 2 juin 2005

Contribution à l'étude de l'allocation des
photoassimilats récents dans la plante et la rhizosphère
chez une graminée pérenne
(*Lolium perenne* L.)

Jury :

M. Jean-Bernard Cliquet	Maître de conférence, Université de Caen	Rapporteur
M. Jean-François Soussana	Directeur de recherche INRA, Clermont Ferrand	Rapporteur
M. Herbert Blum	Chercheur, ETH Zurich	Examineur
M. Daniel Epron	Professeur, Université Henri Poincaré	Examineur
M. Christophe Nguyen	Chargé de recherche INRA, Nancy	Examineur
M. Christophe Robin	Chargé de recherche INRA, Nancy	Examineur

Seul je n'aurais pu réaliser le travail présenté dans cette thèse. A toutes les étapes de sa mise en œuvre, de nombreuses personnes y ont contribué. Je tiens donc à les remercier tout particulièrement et très chaleureusement.

*Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR INRA-INPL Agronomie-Environnement de Nancy. C'est donc au directeur de ce laboratoire, **Sylvain Plantureux** que vont mes premiers remerciements.*

*D'autre part, sans directeur de thèse, il n'y aurait pas de thèse! Je remercie donc tout particulièrement **Christophe Robin**, mon directeur de thèse de m'avoir avant tout fait confiance, de m'avoir confié ce travail de thèse et fait découvrir le métier passionnant qu'est celui de chercheur. Je te remercie, Christophe, pour ton suivi, ta disponibilité, ton aide, et ton implication dans mon travail ; tu étais là avec moi sur le terrain à faire de la Suisse un vrai gruyère avec une machine quelque peu « capricieuse »!!! Merci également de m'avoir permis d'être impliqué dans des collaborations (ETH Zurich) et dans un programme Européen (CONSIDER) mais aussi de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux workshops et colloques afin de présenter mon travail.*

*Je remercie également **Christophe Nguyen** pour m'avoir initié aux tests Glucose ^{14}C , ainsi que pour ses conseils et son aide pour les analyses statistiques, ainsi que **Emile Benizri** pour ses explications concernant les étalements bactériens et les tests Biolog®. Je tiens également à remercier **Chhoy Vong** pour ses conseils avisés pour la manipulation des isotopes radioactifs et du compteur à scintillation liquide pas toujours simple.*

*Un immense merci, à **Herbert Blum** et **Manuel Schneider**, chercheurs à l'ETH de Zurich, pour leur patience, leur aide et leurs conseils lors de nos péripéties sur le dispositif FACE Suisse. Merci Herbert pour vos relectures de l'article sur l'expérimentation FACE.*

*Merci à **Juha Mikola**, chercheur à l'Université de Jyväskylä en Finlande. Merci de votre participation active à mon travail, sans vous l'expérimentation défoliation ainsi que la rédaction de l'article défoliation auraient été beaucoup moins enrichissantes, merci également de votre accueil lors de notre visite en Finlande.*

*Toute ma gratitude va également à **Claude Bazard**, chargé de recherche à l'INRA de Mirecourt. Grâce à vous, la gestion de mes parcelles de ray grass de l'expérimentation défoliation a été beaucoup plus simple. Merci pour votre convivialité et votre aide technique.*

*Merci à **Pascale Maillard**, chargée de recherche à l'INRA de Champenoux pour son aide dans la compréhension des calculs concernant les isotopes stables du carbone (^{13}C).*

*Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage pour leurs remarques et leurs conseils. Merci à **Jérôme Balesdent**, directeur de recherche INRA au CEA de Cadarache ainsi qu'à **Jean Marc Guehl**, directeur de recherche à l'INRA de Champenoux.*

*J'exprime toute ma gratitude à **Jean Bernard Cliquet**, maître de conférence à l'Université de Caen et **Jean François Soussana**, directeur de recherche à l'INRA de Clermont Ferrand pour avoir accepté de juger mon manuscrit en tant que rapporteur. Merci à **Daniel Epron**, président du jury, professeur à l'Université Henri Poincaré à Nancy d'avoir bien voulu juger ce travail en tant qu'examineur.*

*Une part des analyses effectuée pendant ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide précieuse de **Patrice Marchal**, technicien au laboratoire. Un grand merci également à **Dominique Thiery** pour la fabrication des pots de culture, des containers de marquage et son aide sur le terrain ainsi qu'à **Michel Philbert** pour les lyophilisations.*

*Par ailleurs trois étudiants ont participé activement à la réalisation de ma thèse lors de leur stage. **Lina Ulff**, lors de son stage de fin d'étude, m'a secondé efficacement dans la récolte, l'analyse des échantillons et l'interprétation des résultats de l'expérimentation FACE. **Jennifer Tavernier**, lors de son stage de DEA a contribué activement à la mise en place de l'expérimentation défoliation et l'analyse des échantillons. Finalement **Pierre Louis Bonicoli**, lors de son stage de classe préparatoire d'entrée à l'ENSAIA a également participé significativement à l'analyse des échantillons de l'expérimentation défoliation.*

*Il m'est également impossible d'oublier la patience d'ange de **Thamara Olivier**, secrétaire du laboratoire, pour la mise en place des remboursements de mes différents déplacements ! Mais aussi merci pour votre grande gentillesse et votre disponibilité lors de la résolution des différents problèmes administratifs. Merci également à **Anne Marie Claude** et **Amina Gautier**, techniciennes au laboratoire qui m'ont également facilité le passage des commandes et la gestion des produits.*

Merci également aux autres membres du laboratoire Agronomie –Environnement qui ont participé de près ou de loin à mon travail de thèse.

*Les activités d'enseignement ont également occupé une part importante de ma thèse. Je remercie infiniment **Dominique Morlot**, professeur à L'IUT de Yutz-Thionville, mon tuteur de monitorat. Merci de m'avoir fait découvrir les joies de l'enseignement. Votre gentillesse, votre aide, vos conseils aussi bien pédagogiques que scientifiques m'ont été précieux. Je remercie également vivement l'ensemble de l'équipe pédagogique de l'IUT pour leur accueil. Au-delà de mon tuteur, c'est au CIES de Lorraine que je suis reconnaissant. Merci pour les formations et les journées de détente offertes.*

*J'exprime également toute ma sympathie à **Odile** et **Sophie**. Odile ma « co-bureautaire » et amie, et Sophie amie thésarde voisine souvent en visite pour mon plus grand plaisir. Merci à **Seb** et **PE** pour les bonnes soirées et les parties de tarots ! Je tiens à vous remercier pour votre amitié et votre bonne humeur pendant ces trois années ! Toutes ma gratitude va également aux anciens et nouveaux thésards et post-doc de la « thésards vallée » !! Merci à **Anne-Laure, Benoît, Boris, Fabienne, Fred, Karine, Robert, Romain, Sébastien, Minh, Vincent...***

*Je dois également beaucoup à **mes parents, mes grands-parents** pour leur soutien moral et financier !!! lors de mes années d'études (ouf j'en suis enfin venu à bout !!). Merci infiniment à **Jeannette et Roger**, vous avez*

également été toujours présents et à l'écoute pendant ces trois années de thèse. Merci également à tous les autres que je ne cite pas ici, ma famille, mes amis...

*Enfin, le dernier mot est pour toi **Gaëlle**, tout au long de cette thèse, tu as participé à mes moments d'enthousiasme mais aussi de doute et d'incertitude. Tu as toujours été là pour m'écouter patiemment, me rassurer, me donner confiance. Merci infiniment...*

INTRODUCTION GENERALE.....	11
A. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
I. Cycle du carbone et importance des écosystèmes prairiaux	14
1. La plante : un pourvoyeur de carbone dans la rhizosphère	15
2. Place des graminées pérennes dans le bilan de carbone des sols	16
II. Les transferts de carbone dans le continuum atmosphère plante sol	17
1. La répartition des assimilats carbonés dans la plante	18
1.1. Les relations source-puits.....	18
1.2. Modification des relations source-puits	19
2. Rhizosphère et rhizodéposition	21
2.1. La rhizosphère	21
2.2. La rhizodéposition.....	22
2.2.1. Composition :.....	22
2.2.2. Quantification	23
2.2.3. Localisation.....	24
2.3. Rôle trophique des rhizodépôts.....	24
2.3.1. Manifestations de l'effet rhizosphère.....	25
2.3.2. Conséquences de l'effet rhizosphère	26
Figure 4: Représentation schématique des effets positifs et négatifs directs et indirects des rhizodépôts sur la croissance de la plante (d'après Jones <i>et al.</i> , 2003).	27
3. Outils d'étude des transferts de carbone dans le continuum atmosphère-plante-sol.....	27
3.1. Traçages isotopiques	28
3.1.1. Marquage court et marquage long des photoassimilats	29
3.1.2. Abondance naturelle en ¹³ C	30
3.2. Les variables indicatrices de la rhizodéposition.....	30
3.2.1. Approche phénotypique d'étude des micro-organismes.....	31
3.2.2. Approche génétique d'étude des micro-organismes	31
3.3. Couplage des techniques isotopiques et des techniques de biologie moléculaire...	32
3.4. Utilisation des micro-organismes bio-senseurs.....	33
III. Facteurs modulant les transferts de carbone dans le système plante-sol-micro-organismes	35

1. Le dioxyde de carbone.....	37
1.1. Activité photosynthétique, production de biomasse et CO ₂	37
1.2. Sorties de carbone de la plante.....	39
1.2.1. La respiration	39
1.2.2. La rhizodéposition	39
1.3. Les communautés microbiennes	41
2. La défoliation.....	42
2.1. La défoliation affecte la répartition du carbone dans la plante	42
2.2. La défoliation affecte les entrées de carbone dans le sol	43
2.2.1. Augmentation de la rhizodéposition suite à la défoliation.....	43
2.2.2. Aucun effet de la défoliation sur la rhizodéposition.....	44
2.2.3. Diminution de la rhizodéposition.....	45
3. L'azote	46
3.1. Répartition des assimilats et production de biomasse	46
3.2. Disponibilité en azote et rhizodéposition	46
3.3. Interactions carbone-azote.....	47
B. OBJECTIFS DE LA THESE.....	49
C. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	51
I. Matériel végétal	51
II. Marquage des parties aériennes des plantes au ¹⁴CO₂ ou au ¹³CO₂.....	51
2.1. Séparation hermétique du compartiment souterrain.....	51
2.2. Déroulement du marquage : les étapes clés.....	54
2.2.1. Production de ¹⁴ CO ₂ et de ¹³ CO ₂ dans l'atmosphère.....	54
2.2.2. Maintien de l'activité spécifique dans la chambre	54
2.2.3. Fin du marquage.....	56
III. Marquage des parties aériennes des plantes au ¹⁵NH₃.....	56
IV. Récolte	57
V. Analyses.....	59
5.1 Analyses du C de la biomasse microbienne : technique d'extraction fumigation.....	59
5.1.1. Principe.....	59
5.1.2. Pré-extraction	59

5.1.3. Fumigation des échantillons.....	60
5.1.4. Extraction des échantillons fumigés et des échantillons non fumigés	60
Figure 12 : Représentation schématique de la pré extraction, fumigation extraction (Vance <i>et al.</i> , 1987).	
5.2. Analyse du carbone total	61
5.2. Analyse du carbone total	62
5.2.1. Poudres des échantillons végétaux et de sol.....	62
5.2.2. Solutions.....	62
5.3. Analyse des concentrations en glucides totaux dans les tissus végétaux	63
5.4. Analyse du ^{14}C	63
5.4.1. Echantillons végétaux	63
5.4.2. Echantillons de sol	63
5.4.3. Echantillons liquides	64
5.4.4. Expression des résultats	64
5.5. Analyse du carbone 13 et de l'azote 15	65
D. CONTRIBUTION DU CARBONE NOUVELLEMENT ASSIMILÉ A LA RHIZODÉPOSITION.....	68
I. Matériel et méthodes	70
1.1. Conditions de culture.....	70
1.1.1. Le sol.....	70
1.1.2. Les plantes.....	70
1.2. Dispositif expérimental.....	70
1.2.1. Dispositifs de culture.....	70
1.2.2. Culture des plantes	72
1.3. Marquage long des parties aériennes au ^{14}C et au ^{13}C et récolte.....	72
1.4. Expression des résultats.....	73
1.5. Analyses statistiques.....	74
II. Résultats.....	76
2.1. Production de biomasse	76
2.2. Répartition du carbone dans la plante et dans le sol.....	76
2.2.1. Répartition du carbone à la fin de chaque marquage : ^{14}C lors du premier marquage et ^{13}C lors du second marquage	76
2.2.2. Répartition du carbone 13 et du carbone 14 à la fin du second marquage.....	77

2.3. Contribution des deux sources de carbone à la rhizodéposition.....	78
2.4. Biomasse microbienne.....	80
III. Discussion.....	81
3.1. Répartition du carbone dans la plante.....	81
3.2. Contribution du carbone récemment assimilé à la rhizodéposition.....	82
IV. Conclusion.....	86
<i>E. CONSÉQUENCES DE L'ÉLEVATION DE LA CONCENTRATION EN CO₂ ATMOSPHÉRIQUE SUR LA RÉPARTITION DES PHOTO-ASSIMILATS RÉCENTS ET LA RHIZODÉPOSITION CHEZ LOLIUM PÉRENNE.....</i>	<i>88</i>
I. Matériels et méthodes	90
1.1. Dispositif expérimental.....	90
1.2. Mise en place de l'essai.....	90
1.3. Marquage des parties aériennes au ¹⁴ CO ₂ et au ¹⁵ NH ₃ et récolte	92
1.4. Mesure de la minéralisation du carbone total et du carbone 14 dans le sol adhérent.	93
1.5. Expression des résultats du marquage à l'azote 15	93
1.6. Analyses statistiques.....	94
II. Résultats.....	95
2.1. Production de biomasse végétale.....	95
2.2. Allocation de carbone 14 et de l'azote 15 au compartiment souterrain	96
2.3. Concentrations en glucides totaux dans les organes végétaux	100
2.4. Quantités de carbone dans la biomasse microbienne	101
2.5. Cinétique de minéralisation du carbone total et des composés organiques ¹⁴ C (C rhizodéposé et turnover de la biomasse microbienne marquée) dans le sol adhérent	101
III. Discussion.....	105
3.1. Production de biomasse et répartition des photo-assimilats dans le système plante-sol	105
3.2. Concentration en carbone total du sol et devenir des photoassimilats récents dans la rhizosphère.....	108
3.3. Répartition de l'azote 15 dans la plante et rhizodéposition azotée.....	109
IV. Conclusion.....	110

<i>F. INFLUENCE DE LA DÉFOLIATION SUR LA RÉPARTITION DES ASSIMILATS DANS LA PLANTE ET LES TRANSFERTS DE CARBONE VERS LA RHIZOSPHERE</i>	112
I. Matériels et méthodes	116
1.1. Dispositif expérimental	116
1.2. Echantillonnages	116
1.3. Analyses sur les plantes et le sol.	117
1.4. Analyses sur le compartiment microbien	117
1.4.1. Evaluation de l'activité microbienne et de la disponibilité en C pour la biomasse microbienne	118
1.4.2. Dénombrement des bactéries cultivables du sol	118
1.4.3. Analyse des aptitudes cataboliques des communautés microbiennes (Biolog®)	119
1.5. Analyse de la communauté de nématodes	120
1.6. Analyses statistiques	120
II. Résultats	121
2.1. Production de biomasse végétale	121
2.2. Concentrations en carbone total, azote total des organes végétaux et en glucides totaux dans les racines	122
2.3. Concentration en carbone et en azote du sol	124
2.4. Compartiment microbien	125
III. Discussion	129
3.1. La défoliation modifie la répartition de carbone dans la plante	129
3.2. La disponibilité en carbone et en azote dans la rhizosphère n'est pas modifiée par la défoliation	130
IV. Conclusion	132
<i>G. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES</i>	133
<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	137
<i>FIGURES</i>	159
<i>TABLEAUX</i>	164

<i>PHOTOGRAPHIES.....</i>	<i>166</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>167</i>

INTRODUCTION GENERALE

Le sol est le plus souvent un milieu très hétérogène en raison de sa composition et de l'activité biologique qui s'y déroule. Cette activité biologique dépend notamment du carbone entrant dans le sol depuis la plante. En effet, selon la zone de sol considérée et la composition des matières organiques qui s'y trouvent, les organismes vivants du sol opèrent des transformations de nature et d'intensité diverses influençant ainsi la qualité des sols. Le développement et l'activité de ces organismes, en particulier les micro-organismes, sont souvent limités par la disponibilité en carbone organique facilement assimilable. Ainsi, la plante et les couverts végétaux jouent un rôle majeur dans l'activité biologique du sol, en alimentant le sol en C organique. Les débris végétaux (litières de parties aériennes, racines en décomposition) constituent une zone de fortes activités biologiques (« hot spot ») appelée « **détritusphère** » (Stemmer *et al.*, 1999) au même titre que le volume de sol entourant les racines vivantes, la **rhizosphère**. Ce terme a été introduit par Hiltner (1904) qui avait constaté une plus forte densité de micro-organismes dans cette zone à proximité des racines vivantes que dans le reste du sol. La rhizosphère est un milieu extrêmement complexe, où s'opèrent de multiples interactions entre la plante, le sol et les organismes telluriques. Sous l'influence du fonctionnement de la racine, la rhizosphère est caractérisée par des conditions abiotiques et biotiques particulières, qui diffèrent par conséquent de celles du sol non-rhizosphérique : excrétion de protons conduisant à des acidifications micro-locales, absorption d'eau et de minéraux modifiant les flux de masse et les équilibres hydriques et ioniques, modification des propriétés mécaniques du sol et des pressions partielles en CO₂ et O₂ par la croissance et les activités racinaires et microbiennes... La libération de composés organiques ou « **rhizodéposition** » (terme défini par Shamoot *et al.*, 1968) représente :

- un apport annuel au sol de C organique non négligeable, estimé selon les études entre 710 et 1020 kg C ha⁻¹ an⁻¹ sous une culture de blé (Swinnen *et al.*, 1994b)
- un coût énergétique significatif pour la plante puisqu'il est estimé que le flux de rhizodéposition représente de 5 à 15% de l'assimilation nette de carbone (Swinnen *et al.*, 1994 a & b), avec un extrême à 40% (Johansson, 1992 ; Whipps, 1987).

Ces composés organiques libérés par les racines vivantes sont désignés sous le terme générique de « **rhizodépôts** ». Leur quantité et leur composition varient en fonction de

nombreux facteurs comme le stade de développement des plantes, la zone racinaire considérée et les paramètres environnementaux (Curl et Truelove, 1986). Essentiellement composés de glucides simples, d'acides aminés et organiques et de polysaccharides (Grayston *et al.*, 1996), ils ont un **rôle trophique** majeur car ils servent de substrat pour les micro-organismes du sol. De plus, certains rhizodépôts en faible concentration sont des **signaux moléculaires** et participent ainsi à la structuration des communautés microbiennes du sol.

Bien que la rhizosphère ne représente le plus souvent qu'une très faible fraction du volume total du sol (2 à 3% selon Coleman *et al.*, 1978), les micro-organismes étant le moteur du fonctionnement des sols, la stimulation du développement microbien par les rhizodépôts confère des enjeux agro-environnementaux importants aux recherches conduites sur la rhizosphère. Ainsi stimulées, les populations microbiennes du sol influencent l'état sanitaire des plantes (stimulation du développement de bactéries PGPR; Bally *et al.*, 1999), la biodégradation des pesticides dans le sol (Fang *et al.*, 2001b) et la bio-disponibilité en minéraux (Clarholm, 1985).

Ainsi, comprendre et quantifier la rhizodéposition, processus clé du fonctionnement rhizosphérique participe à la compréhension du fonctionnement des sols sous couvert naturel ou cultivé et à la gestion durable de leurs qualités agro-environnementales. La mesure de la rhizodéposition dans **des conditions écologiques et agronomiques réalistes** permettrait de compléter les bilans de C des plantes et des écosystèmes, en vue, par exemple, d'évaluer le rôle de la rhizosphère et des sols dans les changements climatiques en tant que puits de carbone.

Notre travail de thèse s'inscrit dans la thématique de recherche de l'équipe « Rhizosphère » de l'Unité Mixte de Recherche « Agronomie Environnement » INPL (ENSAIA)-INRA Nancy Colmar. **Le programme vise à mieux comprendre, quantifier et modéliser la rhizodéposition** de plantes d'intérêt agronomique en vue de **déterminer leur conséquence sur la disponibilité en N et en S pour la plante**. Ainsi, des travaux récents ont porté sur la quantification de la respiration rhizosphérique (Todorovic, 2000), les interactions entre la rhizodéposition et la disponibilité en azote minéral (Henry *et al.*, 2005) et en soufre (Dedourge *et al.*, 2004) dans la rhizosphère, les relations entre la photosynthèse, l'allocation de C aux racines et la rhizodéposition chez le maïs (Todorovic *et al.*, 2001; Marchand *et al.*, 2005).

Les travaux de l'équipe privilégient une démarche intégrée, mettant en relation le fonctionnement de la plante entière et la rhizodéposition. Ces études ont toujours concerné des plantes annuelles.

A la suite de ces travaux, nous avons opté pour la même démarche consistant à expliciter les transferts de C récent vers la rhizosphère en relation avec le fonctionnement de la plante entière chez une plante fourragère pérenne, le **ray grass anglais** (*Lolium perenne* L.) et ce, pour plusieurs raisons :

- chez une plante pérenne, il est probable que le carbone mis en réserve dans les organes de la plante contribue au pool de carbone libéré par les racines (rhizodépôts). Cet aspect reste encore peu étudié et pourrait contribuer à améliorer la connaissance sur les flux de rhizodéposition qui sont appréhendés le plus souvent sur des plantes annuelles.
- c'est une espèce d'intérêt agronomique représentative des prairies à gestion intensive, soumise à des interventions agronomiques comme la fertilisation et la fauche ou la pâture. Les conséquences de ces interventions sur les flux de C dans le système plante-sol sur des plantes se développant *in situ* restent à préciser.
- Il s'agit d'une plante modèle intéressante pour étudier le rôle de la rhizosphère dans les changements climatiques en tant que puits de carbone. Cette espèce est souvent implantée sur des dispositifs de longue durée installés dans des écosystèmes prairiaux conduits de manière intensive.

Dans la première partie du manuscrit, nous proposons une analyse bibliographique, visant à établir un bilan des connaissances actuelles sur les transferts de C dans le continuum atmosphère-plante-sol, la rhizodéposition et les principaux facteurs modulant ces flux. Ce bilan permettra de dégager les principales hypothèses et d'étayer les objectifs de la thèse. Nous présentons ensuite les dispositifs, méthodes et matériels utilisés dans cette étude. Enfin, les principaux résultats sont présentés puis discutés. Une conclusion générale synthétisant le travail et ses perspectives est proposée en fin de document.

Ce travail a permis jusqu'à présent la rédaction de 2 articles et de 5 communications dans des colloques et workshops internationaux (Annexe 1).

A. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Cycle du carbone et importance des écosystèmes prairiaux

Afin de comprendre l'intérêt d'étudier les transferts de carbone depuis la plante vers le sol, il est nécessaire de situer ce travail dans un contexte plus large présentant de manière générale les principales caractéristiques du cycle du carbone ainsi que les principales modifications observées au cours des dernières années suite au changement global.

La rhizosphère constitue un maillon du cycle du carbone. Son rôle a longtemps été sous-estimé du fait de son petit volume (quelques mm³ de sol entourant les racines) et de la difficulté à la définir. Néanmoins dans les zones où la végétation domine (forêts, prairies, cultures), la rhizosphère peut représenter un volume non négligeable de sol dépendant de la biomasse et de la densité racinaire, par exemple, jusqu'à 100% des premiers centimètres des sols prairiaux.

Les principaux stocks de carbone sont présents dans l'atmosphère, l'océan et les écosystèmes terrestres (Figure 1).

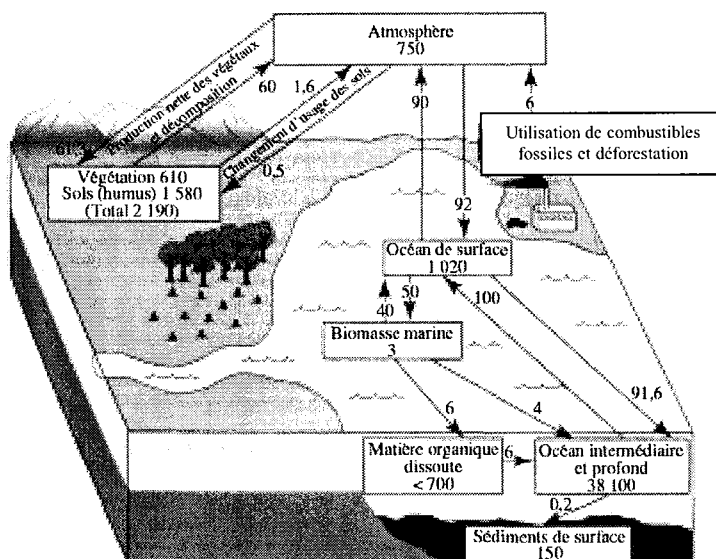


Figure 1 : Flux annuels et stocks de carbone en giga-tonnes (milliards de tonnes de carbone) (Figure tirée de "L'Avenir Climatique", d'après GIEC, 1996). L'atmosphère contient 750 giga tonnes (Gt) de carbone, valeur calculée à partir de la concentration moyenne annuelle au pôle sud. L'océan renferme 39973 Gt de carbone. Les sols renferment 1580 Gt, alors que la végétation qui les recouvre renferme seulement 610 Gt de carbone.

Une des conséquences principales du changement global est un déséquilibre du cycle du carbone. La concentration en CO₂ atmosphérique augmente très rapidement depuis la révolution industrielle (Gammon *et al.*, 1985). Elle est actuellement de 360 vpm, et des estimations annoncent une concentration de 550 vpm d'ici les années 2050. La déforestation et l'utilisation des énergies fossiles sont les principales responsables de cet accroissement. Les émissions anthropiques de dioxyde de carbone libèrent 7.5 Gt de C par an. Parmi ces 7.5 Gt, différents compartiments absorbent ce C et le stockent. On appelle ces compartiments des puits de carbone. Trois Gt et demi sont absorbées par l'atmosphère, 2 Gt C sont retrouvées dans les océans et environ 2 Gt C sont considérées comme « puits manquant » de carbone (Scharpenseel, 1993 ; Amthor, 1995). Le stockage de carbone dans les écosystèmes terrestres (végétation et sol), en réponse à l'élévation des teneurs en CO₂ atmosphérique apparaît comme étant ce puits manquant (Gifford, 1994). Au niveau des sols, en fonction de leur mode d'occupation, les stocks de carbone peuvent varier. Ainsi, en France, pour une épaisseur de sol de 30cm, les stocks les plus élevés (100tC/ha) sont présents dans les sols d'alpage d'altitude, et dans les sols de forêts ou de prairies (70 à 80 tC/ha). En revanche les stocks sont moindres dans les sols cultivés, notamment dans les sols de vigne (Robert et Saugier, 2003).

1. La plante : un pourvoyeur de carbone dans la rhizosphère

Le carbone contenu dans la végétation représente presque autant que celui stocké dans l'atmosphère sous forme de CO₂. La plante constitue un pourvoyeur de carbone pour le sol. On peut distinguer différentes voies d'entrée du carbone dans le sol depuis la plante :

- les parties aériennes de la plante tombent au sol et se décomposent, elles enrichissent la matière organique : la chute de litière (60 à 70% de la matière organique entrant dans le sol, Grayston *et al.*, 1996);
- du carbone organique est libéré dans la rhizosphère par les racines vivantes de la plante : la rhizodéposition ;
- des fragments de racines entrent en sénescence et se décomposent dans le sol : le renouvellement racinaire.

La rhizodéposition et le renouvellement racinaire représentent de 30 à 40% de la matière organique entrant dans le sol (Grayston *et al.*, 1996).

En comparaison avec la rhizodéposition et le renouvellement racinaire, les voies d'entrée de carbone dans le sol depuis la litière sont largement étudiées, ce, pour différents types d'écosystèmes (Kuzyakov et Domanski, 2000). Les définitions de la rhizodéposition sont parfois confuses dans la littérature. En effet, selon les auteurs le renouvellement racinaire est inclus ou non dans la rhizodéposition. Or, le renouvellement racinaire ne fait pas partie de la rhizodéposition car l'échelle de temps à laquelle le carbone est libéré dans le sol est plus longue. De plus, au sens strict, la rhizodéposition concerne uniquement les composés organiques libérés par les racines vivantes. C'est cette définition que nous adoptons dans notre travail qui porte sur les transferts du carbone récent à la rhizosphère.

2. Place des graminées pérennes dans le bilan de carbone des sols

Du fait de leur étendue (25% de la surface émergée du globe), le sol des prairies peut présenter un stock de carbone majeur, contribuant de manière significative à la séquestration du carbone. La majorité des prairies ne sont plus des prairies naturelles mais le résultat de l'activité agricole. Ces prairies semi-naturelles sur sol fertile sont souvent dominées par le ray grass pérenne (*Lolium perenne* L.) et le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.).

Les graminées pérennes constituent un bon modèle d'étude des transferts de carbone vers le sol mais restent néanmoins moins étudiées que les plantes annuelles. Elles libèrent une proportion plus importante du carbone fixé que les plantes annuelles (Grayston *et al.*, 1996). Chez ce type de plante les entrées de carbone dans le sol sont cycliques, correspondant aux périodes de croissance des racines (printemps et été) suivi d'un arrêt de la croissance racinaire et de la décomposition des tissus racinaires en hiver (Whipps, 1990). Les entrées de carbone dans le sol vont dépendre de la part de carbone mis en réserve dans les tissus racinaires, notamment pendant l'hiver (Whipps, 1990). Le système racinaire des plantes annuelles se décompose après récolte alors que celui des plantes pérennes est continuellement renouvelé. De plus, du fait d'une plus longue période de croissance, les graminées pérennes présentent une allocation de carbone au compartiment souterrain plus complexe. Cette allocation dépend de nombreux facteurs (défoliation, température...) engendrant des variations dans la taille du système racinaire et donc des fluctuations de la quantité de carbone libérée par les racines (Delting *et al.*, 1979 ; Warembourg et Paul, 1977). Chez les graminées pérennes, plus encore que chez les plantes annuelles, ce n'est pas seulement la quantité de résidus issus de la plante mais également la distribution du carbone assimilé dans le temps et dans l'espace

(cycles nycthéméraux, saisonniers, variations annuelles) qui influencent les transferts de carbone vers le sol. Très peu de travaux sur la rhizodéposition prennent en compte la distribution du carbone dans la plante; seules quelques études sur la défoliation se sont intéressées à la remobilisation des réserves de la plante et au transfert de carbone remobilisé vers le sol (Johansson, 1993 ; Crawford *et al.*, 2000).

Le ray grass anglais (*Lolium perenne* L.) est une espèce très compétitive lors de forte fréquence de fauche ou de pâturage intensif. Sa production et ses qualités nutritionnelles sont élevées (Holmes, 1980). De plus, le ray grass dispose d'un système racinaire dense, composé de racines adventives générant ainsi un volume de sol rhizosphérique conséquent.

II. Les transferts de carbone dans le continuum atmosphère plante sol

Le dioxyde de carbone est assimilé par la plante au niveau de ses parties aériennes grâce à la photosynthèse. Le dioxyde de carbone fixé par la RubisCO provient de la diffusion du CO₂ atmosphérique au travers des stomates dans un premier temps, puis au travers des cellules de la feuille jusqu'au stroma des chloroplastes. Le cycle de Calvin (cycle des Pentoses Phosphate) engendre la formation de composés carbonés instables, réduit ensuite en phosphoglyceraldéhyde permettant la synthèse de glucides. Dans le chloroplaste, le carbone peut être intégré dans des composés plus ou moins polymérisés (hexose, amidon, saccharose). Dégradés en trioses, ces glucides quittent le chloroplaste pour être utilisés soit localement par les processus de respiration ou être stockés dans la vacuole sous forme de réserves (fructanes, hexoses), soit pour être transportés à plus ou moins longue distance pour la croissance et l'entretien des organes de la plante. Ces composés carbonés peuvent être directement libérés au niveau des racines des plantes par rhizodéposition ou d'abord mis en réserve puis remobilisés et ultérieurement libérés par les racines. Dans le sol, le carbone est utilisé comme source d'énergie pour les micro-organismes. L'activité microbienne est alors stimulée et l'abondance des micro-organismes accrue, plus particulièrement dans la rhizosphère. En retour, la majorité de ces micro-organismes contribuent au fonctionnement de la plante, notamment en augmentant la disponibilité en éléments nutritifs dans le sol. Les transferts de carbone vers le sol peuvent être contrôlés, d'une part par la plante elle-même, d'autre part par l'environnement dans lequel la plante évolue. En effet, il a été montré par exemple que la rhizodéposition était largement variable qualitativement et quantitativement, à la fois au sein d'une même espèce mais également d'une espèce à l'autre (Van der Krift *et al.*, 2001). De

même, par le biais de retro-contrôle, les micro-organismes du sol stimulent les flux de rhizodéposition. Ces flux de carbone peuvent être également modifiés par des facteurs externes (gestion des écosystèmes, climat... ; Van de Geijn et Van Veen, 1993).

1. La répartition des assimilats carbonés dans la plante

1.1. Les relations source-puits

Les transferts de carbone dans la plante et donc la répartition des assimilats dépendent des relations source-puits. Généralement, « source » et « puits » sont des descriptions fonctionnelles des organes de la plante, définissant leur aptitude à fournir ou à utiliser un substrat. Un aspect majeur, intrinsèque au concept de source et de puits est la continuité physique entre les sources et les puits par les connections vasculaires (Figure 2). Les sources de carbone sont définies comme les organes de la plante exportateurs nets de carbone vers d'autres parties de la plante. Les puits de carbone correspondent aux organes importateurs nets de carbone (Farrar, 1996a, Farrar, 1996b).

Les organes sources sont généralement les organes photosynthétiquement actifs, comme les feuilles matures. Les organes puits correspondent aux méristèmes, aux racines, aux jeunes feuilles et autres organes de stockage. En revanche les jeunes feuilles deviennent progressivement sources nettes de carbone lorsqu'elles se développent, et les organes de stockage également source de carbone quand les demandes en carbone de la plante vont excéder la photosynthèse (Farrar, 1996a, Farrar, 1996b). Dans ce cas, il s'agit d'une remobilisation des réserves. Les organes puits utilisent les assimilats pour leur respiration, leur croissance ou leur stockage.

Un puits ou une source peut être caractérisé par :

- son activité, correspondant à la croissance et au fonctionnement des organes puits et des organes sources ;
- sa capacité, correspondant à leurs aptitudes à transférer ou à stocker le carbone assimilé par la plante.

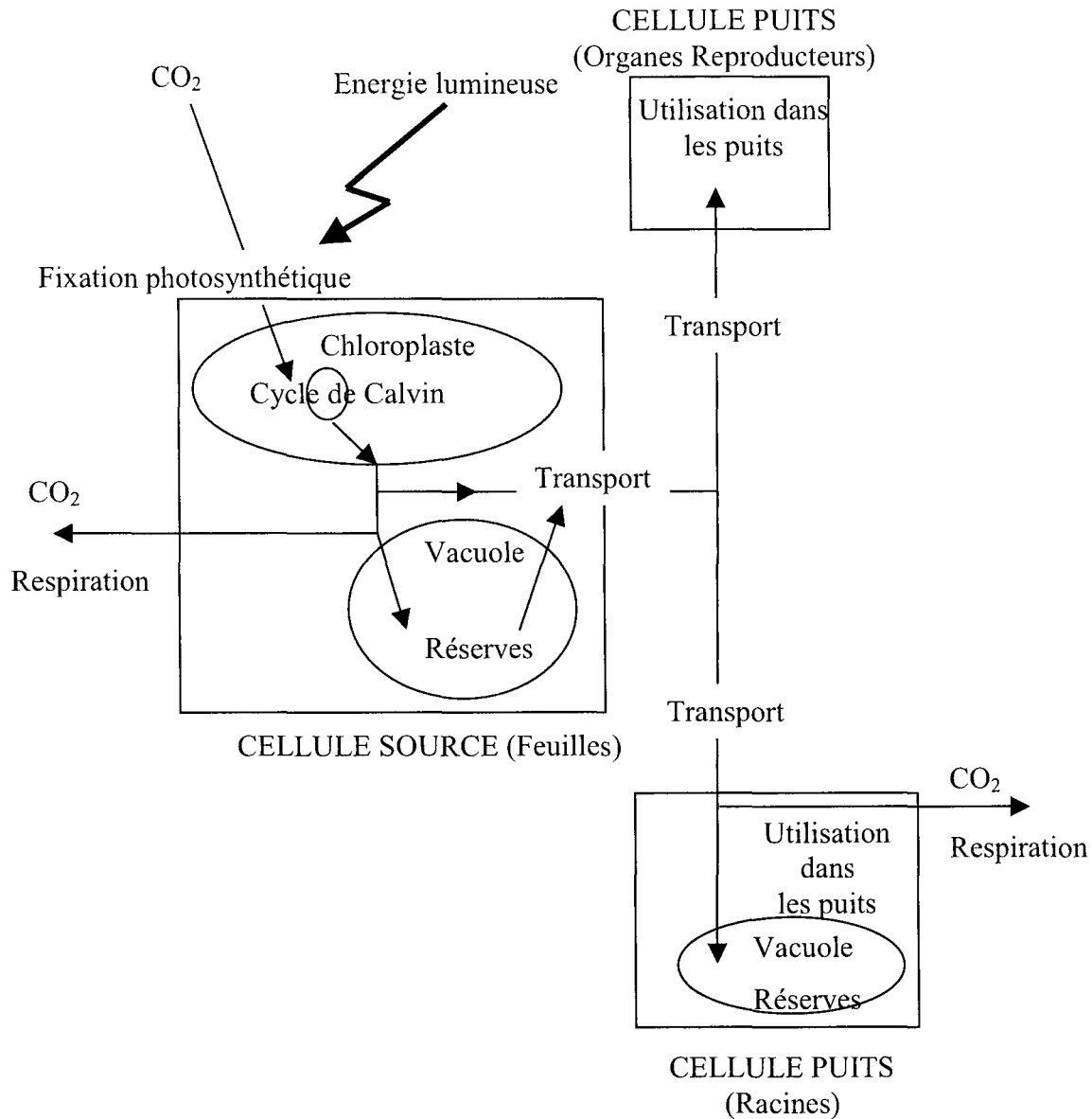


Figure 2 : Représentation schématique de la répartition du carbone dans une plante au stade reproducteur. Concepts de source et de puits. (d'après Tabourel-Tayot, 1997).

1.2. Modification des relations source-puits

Les relations privilégiées entre les puits et les sources au cours du cycle de croissance sont soumises aux fluctuations de l'environnement de la plante. Toutes modifications de l'apport de carbone à la plante entraînent un changement de ces relations. Par exemple une augmentation de la luminosité ou de la pression partielle en CO_2 atmosphérique accroît

l'activité des organes sources, alors que la défoliation diminue l'activité des organes sources (Tableau 1).

Facteurs	Effets	Références bibliographiques
Température	Chez la plupart des végétaux, la vitesse de circulation des assimilats décroît en deçà de 10-15°C et au delà de 40°C.	Bonnemain (1975)
Défoliation	La quantité d'assimilats et les potentialités d'acquisition de C sont réduites, provoquant des ré-allocations vers les méristèmes foliaires et vers les jeunes feuilles en croissance. Des re-mobilisations des réserves carbonées sont également observées	Ryle et Powell (1975), Davidson et Milthorpe (1966).
CO ₂	Une augmentation de la biomasse végétale est habituellement observée, mais les conséquences sur la répartition entre parties aériennes et parties racinaires sont variables. Dans certains cas les réserves augmentent ce qui ne permet plus d'assimilation supplémentaire de C car la totalité des demandes de la plante est déjà satisfaite.	Kimball (1983), Farrar et William, (1991), Fischer <i>et al.</i> (1997).
Azote	L'assimilation augmente en même temps que les réserves augmentent. La croissance racinaire est réduite, au profit des parties aériennes.	Lawlor <i>et al.</i> (1989), Powell et Ryle (1978).

Tableau 1 : Effets de quelques facteurs à impact majeur sur l'assimilation et la répartition des assimilats dans la plante. Ces éléments bibliographiques sont tirés d'articles de synthèses et de résultats expérimentaux.

De plus, les modèles de répartition du carbone chez les plantes pérennes sont très complexes, du fait de la présence de tissus avec des structures d'âge variable. La variation des taux de glucides dans les différents tissus de la plante constitue un mécanisme de contrôle de la répartition des ressources entre les organes sources et les organes puits (Koch, 1996 ; Sheen *et al.*, 1999). Ces mécanismes de variation des taux de glucides fournissent un moyen d'ajuster

la croissance de la plante et l'allocation du carbone dans la plante en réponse à des contraintes et des changements environnementaux (Koch, 1996 ; Farrar et Jones, 2000). Ainsi une diminution des teneurs en glucides engendre une stimulation de l'activité photosynthétique au niveau des organes sources ainsi qu'une remobilisation des réserves présentes au niveau des organes puits, alors qu'une augmentation des taux de glucides stimule leur mise en réserve et leur utilisation dans les organes puits (Andersen, 2003).

L'environnement agit sur l'assimilation et la répartition du carbone dans la plante ce qui modifie le fonctionnement des organes sources et des organes puits. Les organes sources (parties aériennes) contribuent à l'allocation de carbone aux organes puits (racines). Ainsi toutes modifications du fonctionnement des organes sources (au niveau des parties aériennes) affectent les transferts de carbone vers les racines (aussi bien le carbone directement transféré vers le sol que le carbone stocké dans la plante) et vers le sol. Au-delà de la plante, la rhizosphère peut jouer un rôle majeur dans la régulation des relations sources-puits dans la plante.

2. Rhizosphère et rhizodéposition

2.1. La rhizosphère

Son volume est variable selon le développement racinaire : il représente entre 0,1 et 1% du sol global des écosystèmes forestiers et près de 100% des premiers centimètres des sols prairiaux. C'est un milieu complexe et hétérogène qui présente des caractéristiques très particulières. Ainsi, la rhizosphère présente des propriétés structurales (porosité-agrégation) et des caractéristiques physico-chimiques singulières (pH, pO₂, minéraux, potentiel hydrique). Quant à la composante biologique, des études montrent une densité et une activité microbienne à proximité de la racine particulièrement intenses, en comparaison au sol non rhizosphérique (Lynch et Whipps, 1990). Cette microflore se compose majoritairement de bactéries, les champignons, protozoaires et algues unicellulaires étant moins fortement représentés (Subba Rao, 1999).

Ces caractéristiques, propres à la rhizosphère, résultent d'interactions qui ont lieu entre la plante, le sol et les micro-organismes (Grayston *et al.*, 1996). Les processus racinaires impliqués dans ces interactions sont entre autres la rhizodéposition, la respiration de la racine, l'absorption d'eau et de nutriments.

2.2. La rhizodéposition

2.2.1. Composition :

Les composés libérés par rhizodéposition sont très diversifiés, reflétant ainsi les capacités de biosynthèse de la plante. La classification des rhizodépôts établie par Rovira (1969) les regroupe en quatre classes en fonction de leur composition (Tableau 2). Ils sont constitués majoritairement de composés carbonés mais également, en quantité moins importante, de composés azotés (Rovira, 1979). Le carbone est libéré sous forme de glucides, acides organiques, tandis que l'azote est libéré sous forme d'acides aminés et de peptides (Rovira, 1969). Le ratio C/N est un paramètre important intervenant au niveau des bilans d'azote dans le sol. Grayston *et al.*, (1996) considèrent que les composés très labiles, diffusibles comme les exsudats (glucides, acides aminés, acides organiques) ont un ratio C/N de l'ordre de 2,5-13. D'après les données de Jones et Darrah (1993), les acides aminés étant minoritaires, le ratio C/N des exsudats est estimé comme supérieur à 70. Pour les composés plus complexes majoritairement représentés par les mucilages, leur ratio C/N est de l'ordre de 65 (Mary *et al.*, 1993).

Ce type de nomenclature citée ci-dessus, en fonction de la nature biochimique des composés, est à la base de classifications communément adoptées (Neumann et Römheld, 2000 ; Rovira, 1979). Cependant, Killham et Yeomans (2001) ainsi que Meharg (1994) suggèrent de classer les rhizodépôts selon leur aptitude à être dégradés par les micro-organismes. Finalement, le mode de libération des composés par les racines peut être également pris en compte pour classer les différentes catégories de composés libérés (diffusion passive ou transport actif). Il n'existe donc pas de classification universelle des rhizodépôts, chacune trouvant sa pertinence selon si la démarche concerne plutôt le compartiment microbien, la physiologie de la racinaire ou la biochimie des composés libérés.

Types de rhizodépôts	
Les exsudats	Composés hydrosolubles de faible poids moléculaire, libérés passivement par les racines vers la solution du sol selon un gradient de concentration. Représentés principalement par des sucres (glucose, fructose, maltose...) des acides aminés, carboxyliques et phénoliques et en moins grande proportion par des vitamines, des régulateurs de croissance, des enzymes et des nucléotides.
Les sécrétions	Composés de poids moléculaire variable, libérés par transport actif. Ce sont notamment des glucides
Les mucilages	Composés de poids moléculaire élevé. Libérés principalement au niveau des apex voire même des poils absorbants. Représentés par des sucres polymérisés et des protéines.
Le mucigel	Mélange complexe de mucilage, de débris racinaires, bactériens et de particules minérales.

Tableau 2 : les différentes catégories de rhizodépôts (d'après Rovira, 1969) selon leur composition biochimique et leur mode de libération.

2.2.2. Quantification

Chez les céréales, entre 20 et 30% de la fraction de carbone total assimilé sont transférés aux racines alors que chez les espèces prairiales elle atteint 30 à 40% (Kuzyakov et Domanski, 2000). La répartition du carbone dans la plante et dans le sol est similaire entre les graminées annuelles et les graminées pérennes : la moitié de ce carbone sert à la croissance et à l'entretien de la plante, un quart est retrouvé dans la respiration rhizosphérique (microbienne et racinaire), le dernier quart étant incorporé dans la biomasse microbienne et dans la matière organique du sol. Dans le cas d'études menées sur des plantes cultivées *in situ*, le carbone libéré par les racines vivantes correspond à 5 à 10% du carbone net fixé par la plante. Néanmoins, Jones *et al.*, (2004) considèrent comme plus réaliste d'estimer la rhizodéposition comme étant comprise entre 2 et 4 % du carbone net fixé sur la base d'une modélisation de la rhizodéposition tenant compte des principaux facteurs susceptibles de faire varier les flux de rhizodéposition. La quantité de carbone rhizodéposé reste néanmoins difficile à mesurer. En

combinant un traçage isotopique et un modèle de rhizodéposition, Swinnen *et al.* (1994b) montrent que la rhizodéposition carbonée correspond à un apport annuel de C organique compris entre 710 et 1020 kg C ha⁻¹ an⁻¹ sous une culture de blé.

Pour l'azote, les études sont beaucoup moins nombreuses; celles-ci montrent que 18 à 33% de l'azote assimilé par des plants de blé sont libérés dans la rhizosphère pendant la période de croissance des plantes (Janzen, 1990). A l'échelle de la parcelle la rhizodéposition azotée rend compte d'une libération nette comprise entre 8 et 40 kg N ha⁻¹ (Merbach *et al.*, 1999 ; Janzen, 1990), ce qui est loin d'être négligeable pour la gestion de la fertilisation azotée car cet azote est bio-disponible rapidement pour micro-organismes favorisant ainsi leur activité.

La grande variabilité des résultats de quantification de la rhizodéposition carbonée et azotée résulte de différences du point de vue de la méthodologie, et des conditions environnementales (facteurs biotiques et abiotiques) (Grayston *et al.*, 1996).

2.2.3. Localisation

La libération de composés par la racine n'est ni qualitativement, ni quantitativement homogène le long de la racine et varie d'une espèce à l'autre. Dans le cas des arbres et des graminées, les sites majeurs de libération se situent au niveau des apex et des zones d'élongation racinaire (Whipps et Lynch, 1985 ; Curl et Truelove, 1986). Selon la zone de la racine, la nature de la rhizodéposition varie (Rovira *et al.*, 1979 ; Lynch et Whipps, 1990 ; Grayston *et al.*, 1996). Il apparaît que la libération de glucides a lieu tout au long de la racine (Jones et Darrah, 1994), alors que la libération d'acides aminés et d'acides organiques a lieu préférentiellement dans les zones apicales (Hoffland, 1992 ; Jones et Darrah, 1994). De même, les photosynthétats récemment assimilés sont majoritairement alloués vers les jeunes racines (Matthew et Kemball, 1997). Néanmoins, la contribution de ce carbone plus ancien à la rhizodéposition n'est pas encore quantifiée.

2.3. Rôle trophique des rhizodépôts

Les rhizodépôts jouent un rôle trophique majeur mais également un rôle signal (production de métabolites secondaires). Dans notre travail c'est le rôle trophique des rhizodépôts par rapport au cycle du carbone qui nous intéresse puisque ces rhizodépôts sont utilisés en tant que substrats pour le développement de la microflore du sol. Cependant en terme de structuration

des communautés du sol, la part du trophique par rapport à celle du signal reste à étudier. La nature et la quantité de ces substrats produits dépendent directement du fonctionnement de la plante. L'activité des micro-organismes est généralement limitée par la disponibilité en carbone. Ceci est moins vrai dans la rhizosphère grâce à l'apport continu de carbone labile, rapidement disponible et assimilable par la microflore hétérotrophe (Lynch et Whipps, 1990 ; Cheng *et al.*, 1996). En revanche, si dans la rhizosphère, le carbone n'est pas limitant pour les micro-organismes, la disponibilité en azote peut l'être. Dans ce cas, c'est à la fois la croissance des micro-organismes et celle de la plante qui sont limitées. Dans le cas contraire, les micro-organismes rendent disponible l'azote minéral, par minéralisation de l'azote organique, utile à la nutrition des plantes. Le fonctionnement de la plante ainsi que l'activité microbienne sont alors modifiés, affectant ensuite les entrées de carbone dans le sol par rhizodéposition.

2.3.1. Manifestations de l'effet rhizosphère

L'entrée de carbone dans la rhizosphère, via la rhizodéposition, gouverne la taille, l'activité et la composition génétique de la biomasse microbienne (Lynch, 1991). L'augmentation de la densité de micro-organismes à proximité de la racine : « l'effet rhizosphère », se quantifie par le rapport entre les micro-organismes rhizosphériques et les micro-organismes non rhizosphériques. Ce ratio est estimé en moyenne pour les bactéries entre 10 et 20, parfois plus. En revanche, il est moins important pour les actinomycètes et les champignons (Subba Rao, 1999), démontrant que les bactéries sont plus sensibles à la rhizodéposition que ne le sont les champignons et les actinomycètes. Cependant, la densité du pool bactérien rhizosphérique est variable. La présence ou l'absence de plantes (Nguyen et Guckert, 2001 ; Kandeler *et al.*, 2002 ; Lemanceau *et al.*, 1995), l'espèce végétale (Grayston *et al.*, 1998 ; Fang *et al.*, 2001a) ou encore différents cultivars (Dalmastri *et al.*, 1999) sont des facteurs susceptibles de faire varier l'activité respiratoire microbienne et/ou la composition des communautés microbiennes. Certains groupes bactériens sont ubiquistes, retrouvés à la fois dans le sol rhizosphérique et non-rhizosphérique, alors que d'autres sont spécifiques à la rhizosphère (Marilley et Aragno, 1999).

2.3.2. Conséquences de l'effet rhizosphère

L'effet rhizosphère favorise la croissance et la qualité végétale. En effet, les micro-organismes rendent disponibles dans la solution du sol des éléments tels le fer, le calcium et le phosphore initialement présents sous forme organique stable et complexe, forme inaccessible pour la plante. De plus, les bactéries sont un puits d'éléments minéraux : ils stockent dans leur biomasse des atomes de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre etc..., qui deviennent à leur mort une source de nutriments pour les végétaux. Ils sont aussi impliqués dans la dégradation de certaines catégories d'herbicides (Fang *et al.*, 2001b) et dans l'état sanitaire des plantes. Certaines bactéries comme les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), améliorent directement la croissance végétale en synthétisant des phytohormones de croissance (auxines) ou indirectement en limitant la croissance d'agents pathogènes via la production d'antifongiques (Benizri *et al.*, 2001) (Figure 3). Néanmoins du fait d'une intensification des processus dans la rhizosphère, on observe également une stimulation du développement de pathogènes (bactéries, champignons); la présence importante de composés toxiques et également une compétition entre plante et micro-organismes pour un certain nombre de nutriments.

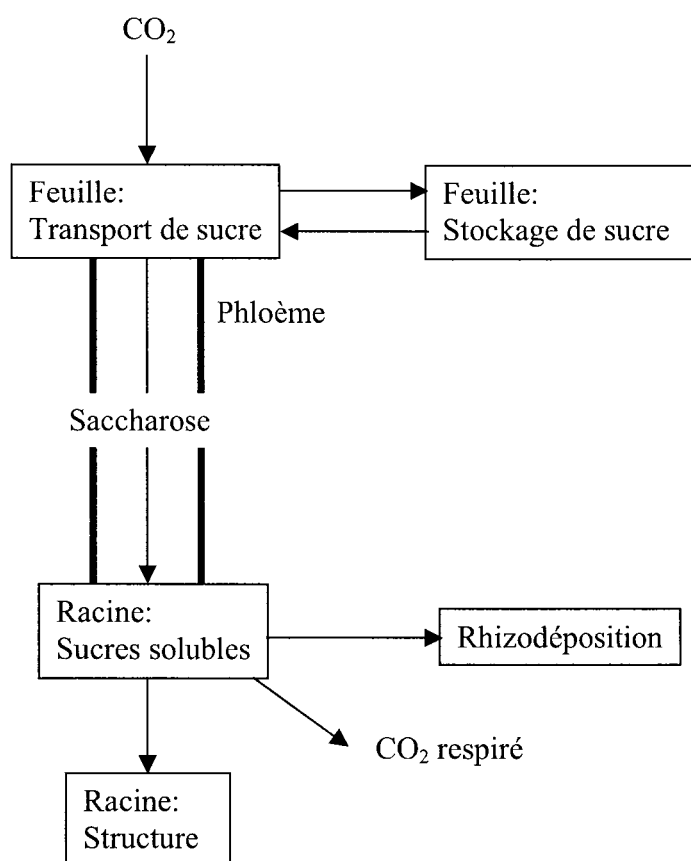


Figure 3: Modèle simplifié présentant le carbone issu de la photosynthèse importé jusqu'aux racines puis transféré dans le sol (d'après Dilkes *et al.*, 2004). Ce schéma vient en complément du schéma précédent (Figure 2) caractérisant la répartition du carbone dans la plante. La rhizodéposition devient un des termes du bilan carboné de la plante entière.

Les flux de rhizodéposition sont plus importants chez les plantes pérennes que chez les plantes annuelles (jusqu'à 40% du C assimilé chez les plantes annuelles et jusqu'à 70% chez les plantes pérennes). L'environnement de la plante conditionne les relations sources-puits de la plante. La rhizodéposition représente une perte d'énergie pour la plante mais un apport trophique pour les micro-organismes telluriques. Par conséquent, en échange de cet apport d'énergie, les micro-organismes peuvent rendre disponibles pour la plante des nutriments nécessaires à sa croissance. Ils peuvent également être impliqués dans la santé de la plante en la protégeant de certains pathogènes. De plus, ces micro-organismes entretiennent la fonction puits de la rhizosphère de part leur activité et leur capacité à stocker le carbone. Le concept des relations sources-puits peut alors être étendu à la rhizosphère, celle-ci étant un puits de C par le biais de la rhizodéposition (Figure 4). Les termes d'activité et de capacité puits ou source de carbone issu de la plante apparaissent donc applicables à la rhizosphère.

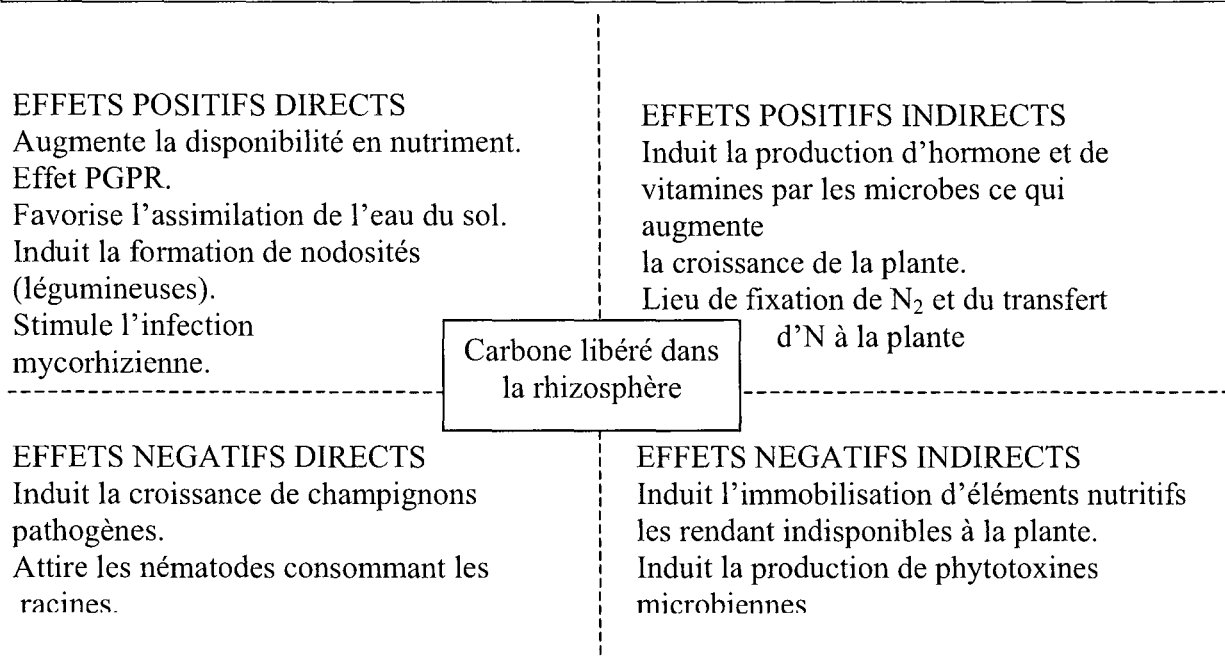


Figure 4: Représentation schématique des effets positifs et négatifs directs et indirects des rhizodépôts sur la croissance de la plante (d'après Jones *et al.*, 2003).

3. Outils d'étude des transferts de carbone dans le continuum atmosphère-plante-sol

La quantification *in situ* de la rhizodéposition est impossible en raison d'un écueil méthodologique majeur. En effet, les rhizodépôts sont rapidement adsorbés sur les

composants du sol comme les argiles (Guckert *et al.*, 1975), ou encore dégradés par les micro-organismes (Griffin *et al.*, 1976 ; Krafczyk *et al.*, 1984 ; Groleau-Renaud, 1998). C'est pourquoi la majorité des études concernant les transferts de carbone de la plante vers le sol et l'analyse de la composition biochimique des rhizodépôts menées jusqu'à ce jour ont souvent été réalisées en conditions hydroponiques stériles (Warembourg et Billes, 1979 ; Krafczyk *et al.*, 1984 ; Kuzyakov et Domanski, 2000 ; Hodge *et al.*, 1996...). Toutefois, dans ces conditions, l'analyse quantitative et qualitative de la rhizodéposition est souvent perturbée par la nature des ions de la solution, l'absence de contrainte mécanique liée au sol (Groleau-Renaud *et al.*, 1998) et l'absence de micro-organismes (Whipps 1990).

3.1. Traçages isotopiques

La majorité des informations disponibles concernant le transfert du carbone assimilé par la plante depuis l'atmosphère jusqu'au sol a été obtenue grâce à l'utilisation de marqueurs isotopiques : ^{14}C , ^{13}C , ^{11}C (synthèse de Kuzyakov, 2001). Cette technique faisant appel au traçage isotopique permet de distinguer le carbone libéré par les racines du carbone initialement présent dans le sol. Elle permet d'établir un bilan net de carbone libéré par les racines dans des conditions réalistes.

Deux approches distinctes peuvent être considérées :

- le marquage des photo-assimilats de la plante en enrichissant le CO_2 atmosphérique avec un isotope stable (^{13}C) ou radioactif (^{14}C , ^{11}C) (Domanski *et al.*, 2001 ; Toal *et al.*, 2000 ; Warembourg et Esterlich, 2001),
- l'analyse des variations de l'abondance naturelle du ^{13}C de la matière organique du sol (Balesdent et Balabane, 1992 ; 1996 ; Rochette et Flanagan, 1997 ; Rochette *et al.*, 1999).

Néanmoins si l'on souhaite déterminer l'origine du carbone au sein d'un compartiment, à savoir s'il provient de la re-mobilisation des réserves ou du carbone récemment assimilé, un double marquage long (Schnyder, 1992 ; Johansson, 1993 ; Gebbing *et al.*, 1999 ; Crawford *et*

al., 2000) peut être envisagé. En effet, les auteurs précédemment cités, procèdent à 2 marquages consécutifs des plantes avec deux isotopes différents du carbone ($^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$).

3.1.1. Marquage court et marquage long des photoassimilats

Dans le cas du marquage court, les plantes assimilent le CO_2 marqué pendant une courte période. Cette technique n'est cependant valable que pour quantifier le transfert d'assimilats récents dans le système plante-sol (Meharg et Killham, 1990 ; Nguyen *et al.*, 1999 ; Swinnen *et al.*, 1994a, b ; Warembourg et Billes, 1979). L'ensemble du carbone n'étant pas marqué uniformément, les mouvements de carbone provenant des réserves et du renouvellement des tissus dont l'origine est antérieure au marquage ne peuvent être étudiés dans ce cas. De même, le marquage court (ponctuel) reflète l'aptitude de la plante à répartir le carbone au moment où le marquage isotopique est réalisé. La distribution du carbone à un stade donné de développement de la plante ne peut pas être extrapolée à la période entière de croissance de la plante. En revanche une série de marquages courts intervenant à différents stades de développement de la plante peut fournir une bonne estimation de la répartition du carbone dans le système plante-sol-micro-organismes pendant la croissance de la plante (Gregory et Atwell 1991 ; Jensen 1993 ; Swinnen *et al.*, 1994a, b ; Kuzyakov *et al.*, 1999, 2000).

Dans le cas d'un marquage long, les plantes assimilent le CO_2 marqué pendant une longue période par exemple depuis le stade plantule jusqu'à la date de récolte de la plante (Helal *et al.*, 1986 ; Zagal, 1994). Cela correspond à la distribution du carbone aussi longtemps que l'atmosphère environnant la plante a été enrichie.

Le carbone 14, isotope radioactif est couramment utilisé dans les études avec des marquages courts ou des marquages longs. Ceci est dû à la facilité de détection d'éléments radioactifs dans un compartiment et aux faibles coûts des analyses suite au marquage. Néanmoins le ^{13}C a l'avantage d'être un isotope stable du carbone, sa manipulation nécessite moins de précautions que celle du ^{14}C , ce qui permet son utilisation au champ. Quant au ^{11}C , sa demi-vie est particulièrement faible (20.4 minutes) ce qui rend son utilisation encore plus difficile face à une demi-vie de 5730 ans pour le ^{14}C (Minchin et Thorpe, 2003).

3.1.2. Abondance naturelle en ^{13}C

Cette technique est basée sur la discrimination isotopique du ^{13}C et du ^{12}C pendant la phase d'assimilation du CO_2 par des plantes ayant un fonctionnement photosynthétique différent. L'enzyme Rubisco chez les plantes à métabolisme C3 engendre un appauvrissement en ^{13}C dans la plante $\delta^{13}\text{C} \approx -27\text{‰}$ (unité delta qui permet ensuite de calculer le ratio $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ de l'échantillon) comparé au $^{12}\text{CO}_2$ de l'atmosphère. En revanche, l'enzyme Phosphoenol Pyruvate Carboxylase chez les plantes à métabolisme C4 entraîne un appauvrissement en ^{13}C dans la plante $\delta^{13}\text{C} \approx -12\text{‰}$. La méthode est donc basée sur la culture d'une plante C3 ($\delta^{13}\text{C} \approx -27\text{‰}$) sur un sol ayant un historique C4 ($\delta^{13}\text{C}$ devant approcher -12‰) ou inversement. Ainsi l'estimation de la rhizodéposition est réalisée en déterminant le rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ dans les différents compartiments du sol (Cheng *et al.*, 1996 ; Rochette et Flanagan 1997 ; Rochette *et al.*, 1999 ; Van Kessel *et al.*, 2000a). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être appliquée au champ. Toutefois, ces mesures fournissent des bilans nets de flux de carbone vers la rhizosphère intégrant toute la période allant du semis jusqu'à l'échantillonnage. Cette technique a néanmoins permis d'évaluer la libération totale de carbone par les racines (rhizodéposition + renouvellement racinaire) d'une culture de maïs à $570\text{-}2555 \text{ kg C ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Balesdent et Balabane, 1996 ; Qian et Doran, 1996).

3.2. Les variables indicatrices de la rhizodéposition

L'estimation de la libération de carbone par les racines peut également se faire de manière indirecte en s'intéressant à différentes variables corrélées avec la rhizodéposition. C'est par exemple le carbone soluble intra-racinaire (Marchand, 2003), le carbone soluble (Haynes et Francis, 1993) du sol adhérent ou encore le compartiment microbien. Pour ce dernier, la biomasse microbienne est plus pertinente que l'étude des communautés microbiennes ou du nombre de bactéries cultivables car ces variables ne permettent de caractériser qu'une faible fraction des micro-organismes du sol. Toutes ces variables ne présentent pas les flux de carbone de la plante vers le sol, mais elles rendent compte de la disponibilité en carbone dans le sol, résultat direct des transferts de carbone de la plante vers le sol. Lors d'expérimentation en plein champ, ces variables peuvent être utilisées comme indicateurs de la rhizodéposition, alors que les techniques de marquages isotopiques sont lourdes à mettre en place. Notre

équipe a récemment utilisé ou développé ces indicateurs comme outil d'estimation de la rhizodéposition *in situ*.

3.2.1. Approche phénotypique d'étude des micro-organismes

Les techniques de culture *in vitro* des micro-organismes après étalement ou encore le test Biolog[®] sont basées sur la physiologie et le métabolisme microbien. L'inconvénient majeur de ces outils est qu'ils ne rendent compte au maximum que de 10% de la population totale, étant donné que la fraction cultivable des micro-organismes est de l'ordre de 1-10% de la microflore totale (Torsvik *et al.*, 1990). En revanche cette fraction cultivable peut être envisagée comme un indicateur de la disponibilité en carbone dans la rhizosphère pour les micro-organismes et s'avère donc utile dans des études comparatives. Le test Biolog[®] est utilisé pour caractériser les communautés microbiennes en fonction de leurs aptitudes cataboliques (Garland et Mills, 1991 ; Zak *et al.*, 1994 ; Garland, 1997). Ce test rend compte de la capacité d'oxydation de différents substrats (95 généralement) par des communautés microbiennes et plus spécifiquement bactériennes. Il permet de mettre en évidence des changements dans la qualité des composés rhizodéposés.

3.2.2. Approche génétique d'étude des micro-organismes

Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques de biologie moléculaire a permis l'émergence de nouvelles méthodes permettant la description des communautés microbiennes sur la base de l'analyse de l'ADN extrait des échantillons à caractériser (Ranjard *et al.*, 2000a). Ces outils peuvent être utilisés pour cerner l'effet de variations de la disponibilité de carbone organique, c'est à dire des variations dans les transferts de carbone de la plante vers le sol, sur les structures de communautés microbiennes du sol. Néanmoins, des modifications de la structure des communautés microbiennes s'expliquent par un changement quantitatif et/ou qualitatif de l'entrée de carbone dans le sol mais sont également influencées par les caractéristiques édaphiques ou micro-climatiques. On peut par exemple citer les travaux de Montealegre *et al.* (2000) utilisant la technique RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). Les résultats obtenus montrent une modification de la structure des communautés bactériennes du sol après une augmentation de la concentration en CO₂

atmosphérique. Les auteurs suggèrent que la rhizodéposition a pu être affectée qualitativement ou quantitativement par le CO₂ mais ne mettent pas directement en évidence les conséquences du CO₂ sur la disponibilité en carbone dans le sol.

Au-delà de la structure génétique des communautés bactériennes, de nouvelles techniques permettent d'appréhender les relations structures/ fonctions des communautés microbiennes *in situ*. Les techniques FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) combinées à des techniques de micro-autoradiographie MAR (Lee *et al.*, 1999) permettent, par exemple, d'identifier et de caractériser *in situ* l'incorporation de substrats carbonés dans des cellules bactériennes présentes au sein d'une population bactérienne donnée (Nielsen *et al.*, 1999 ; Adamczyk *et al.*, 2003). La micro-autoradiographie permet de localiser la distribution des radioéléments dans un micro-organisme après exposition sur un film photographique sensible aux rayonnements radioactifs. Couplé à la technique FISH, permettant de révéler la présence des bactéries par fluorescence, il est possible de quantifier les bactéries ayant assimilé le substrat radioactif par rapport à la communauté bactérienne totale (Lee *et al.*, 1999 ; Ouverney *et al.*, 1999). Avec cet outil, il est possible de tester les conséquences de la variation de la disponibilité d'un substrat carboné donné sur la communauté bactérienne du sol.

3.3. Couplage des techniques isotopiques et des techniques de biologie moléculaire

Le couplage du traçage isotopique avec la biologie moléculaire microbienne devrait permettre prochainement de suivre la répartition d'un isotope du carbone dans tout le système plante-sol-micro-organismes : ce sont les techniques récentes ADN / ARN Stable Isotope Probing (SIP) (Radajewski *et al.*, 2000 ; 2002 ; Morris *et al.*, 2002 ; Lueders *et al.*, 2004). La technologie SIP devrait à terme permettre d'identifier *in situ* les membres actifs de groupes métaboliques de micro-organismes définis, ayant incorporé l'isotope du carbone issu du marquage de la plante (¹³C par exemple) dans l'ADN ou l'ARN de leurs cellules suite à la consommation d'un substrat marqué issu de la rhizodéposition. L'incorporation au niveau de l'ARN permet de caractériser les populations microbiennes actives car ayant transcrit leur ADN. Ainsi une diminution de la disponibilité de carbone au niveau du sol va se traduire par une moindre incorporation des composés marqués, issus de la plante, dans l'ADN ou l'ARN des populations bactériennes présentes. Néanmoins cette technique est en cours de mise au point et n'était pas opérationnelle pour ce travail de thèse.

Ces techniques SIP présentent également l'avantage de pouvoir être couplées aux techniques d'analyse phénotypique des micro-organismes de type PLFA. Ces techniques PLFA (profil d'acides gras phospholipidiques) permettent la comparaison de structures des communautés microbiennes, basée sur la caractérisation de lipides membranaires extraits des microbes présents dans le sol (Pennanen *et al.*, 1998 ; Broughton et Gross, 2000 ; Kozdroj et Van Elsas, 2001). Les différents acides gras des membranes des cellules bactériennes sont caractérisés et peuvent être utilisés comme bio-marqueurs d'un groupe microbien donné. Ces techniques sont notamment employées pour apprécier l'effet structurant sur les communautés microbiennes de divers paramètres : espèces végétales (Priha *et al.*, 1999 ; Germida *et al.*, 1998), élévation du CO₂ atmosphérique (Kandeler *et al.*, 1998) ou encore présence de métaux lourds (Kozdroj et Van Elsas, 2001), tous ces facteurs influençant de manière significative les entrées de carbone dans le sol. Les limites de cette technique résident dans le fait que certains PLFA sont communs à la plante et aux micro-organismes.

En combinant PLFA et SIP, il est possible de distinguer un type de micro-organismes donné ayant incorporé du carbone marqué dans ses membranes. Ainsi, il devient possible de distinguer les micro-organismes impliqués dans les changements biogéochimiques intervenant au niveau du sol (Treonis *et al.*, 2004).

3.4. Utilisation des micro-organismes bio-senseurs

Une méthode récente, qui reste prospective car pas encore au point pour des investigations *in situ*, a pour but de quantifier, localiser et caractériser les rhizodépôts libérés. Cette technique renseigne directement les flux de rhizodéposition. Elle consiste à insérer dans le plasmide ou le chromosome d'une bactérie un ou plusieurs gènes dont l'expression, sous le contrôle d'un promoteur plus ou moins spécifique, permet une discrimination phénotypique de la bactérie modifiée (Daunert *et al.*, 2000 ; Leveau et Lindow, 2002). Il existe ainsi de nombreux promoteurs stimulés par des signaux chimiques ou biologiques. Parmi les plus simples d'utilisation figurent ceux codant pour la luminescence et la fluorescence (Killham et Yeomans, 2001). On peut citer par exemple les micro-organismes bio-senseurs adaptés aux études de la rhizodéposition : *Pseudomonas fluorescens* marqué avec un gène de luminescence *lux*. La luminescence produite par les bactéries transformées est proportionnelle à la disponibilité en composés carbonés simples dans leur environnement (Yeomans *et al.*, 1999). Ces *Pseudomonas* ont été utilisées pour rendre compte de la disponibilité en carbone

dans la rhizosphère en relation avec la fertilisation azotée (Darwent *et al.*, 2003 ; Henry, 2005). Ainsi cet outil permet de mettre en évidence l'effet dépressif ou stimulateur de la disponibilité en carbone sur l'activité des micro-organismes. Néanmoins, une des limites de cette technique réside dans le fait que les glucides dosés peuvent provenir de sources autres que les rhizodépôts, comme par exemple la dégradation des parois bactériennes ou racinaires.

La quantification de la rhizodéposition s'avère délicate. Les techniques utilisant les isotopes du carbone semblent les mieux appropriées, mais difficiles à mettre en place dans des conditions de plein champ. Dans de telles conditions, les indicateurs de la rhizodéposition apparaissent comme plus facilement utilisables. Ils permettent une estimation de la rhizodéposition mais pas sa mesure. En revanche, le développement récent des techniques couplant les isotopes du carbone et la biologie moléculaire sont prometteuses mais ne sont pas encore opérationnelles pour des études *in situ*. Néanmoins, elles présentent l'avantage de pouvoir étudier un système complet regroupant plante, sol et micro-organismes. L'échelle d'analyse des communautés microbiennes est fine et permet de caractériser précisément quelles populations bactériennes sont stimulées lors d'un changement de la disponibilité de composés carbonés issus de la plante au niveau du sol.

III. Facteurs modulant les transferts de carbone dans le système plante-sol-micro-organismes

Des facteurs propres à la plante et de nombreux facteurs environnementaux influencent l'activité source et l'activité puits des plantes (Tableau 1) et sont à l'origine des variations quantitatives et qualitatives des transferts de carbone de la plante vers le sol.

Whipps et Lynch (1985), estiment que tout facteur qui affectant la physiologie de la plante perturbe les processus de rhizodéposition.

Les principaux facteurs biotiques qui modifient la rhizodéposition sont :

- l'espèce,
- la variété,
- le stade de développement de la plante,
- la présence ou non de micro-organismes à proximité des racines vivantes.

Les principaux facteurs abiotiques peuvent être classés en 2 catégories :

- les facteurs abiotiques au niveau des parties aériennes de la plante, c'est à dire la température de l'air, les conditions d'éclairement, la concentration en CO₂ atmosphérique, la défoliation,
- les facteurs abiotiques racinaires, c'est à dire la température du sol, le statut hydrique et nutritionnel du sol, et la texture du sol.

Face à ces modifications des processus de rhizodéposition, la capacité de puits ou la capacité de source du sol peut être amplifiée grâce à la rhizosphère.

Nous allons développer les effets de trois facteurs sur les transferts de carbone dans le système plante, sol, micro-organismes : le CO₂, la défoliation et l'azote (Figure 5). Ces trois facteurs ont été choisis comme **outils d'étude des transferts de carbone** de par leur conséquences contrastées sur les relations source-puits de la plante, mais également de par leurs **intérêts agro-environnementaux** et leurs conséquences avérées ou supposées sur les flux de C vers la rhizosphère.

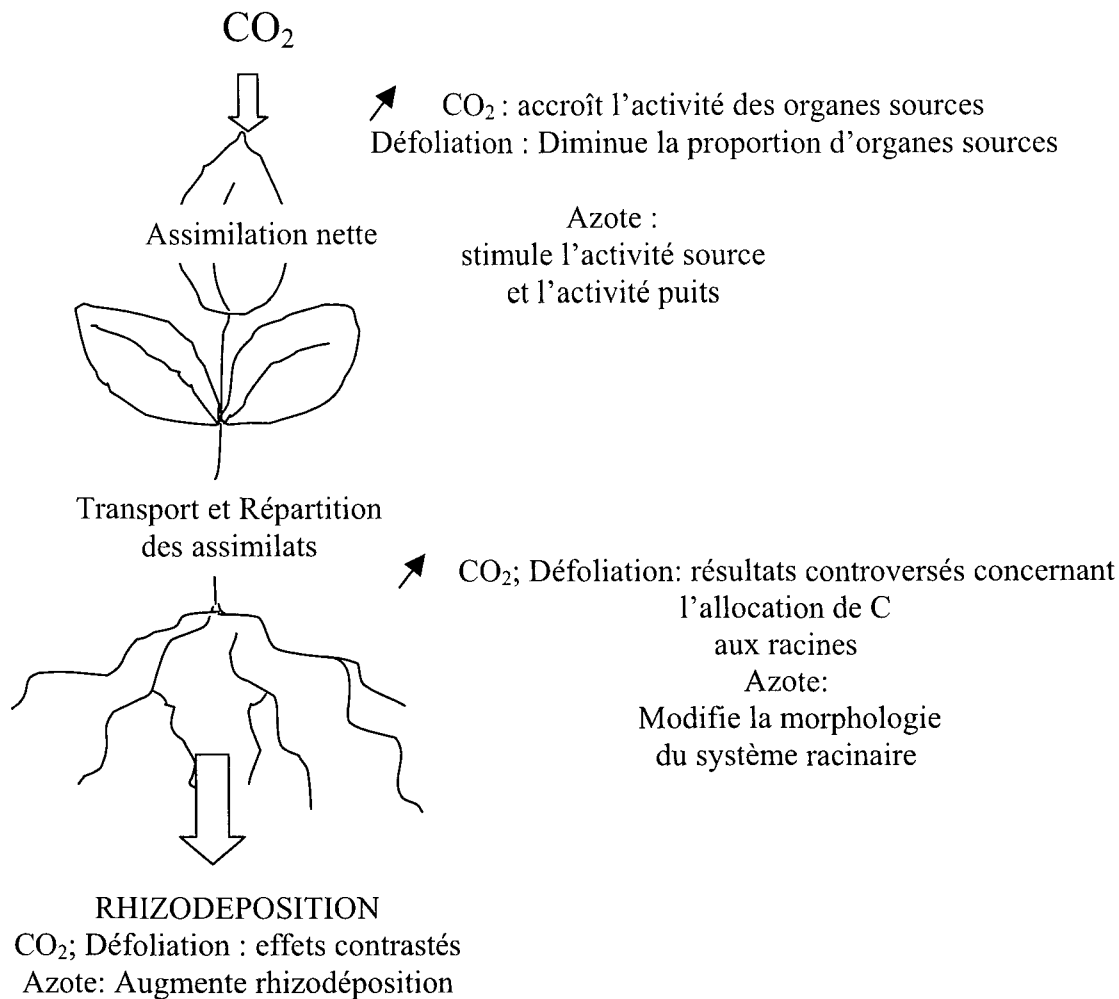


Figure 5: Schéma récapitulatif des effets de l'élévation du CO_2 , de la défoliation et de la fertilisation azotée sur les transferts de C dans la plante.

L'élévation de la concentration atmosphérique en dioxyde de carbone est une des conséquences principales du changement global affectant le cycle du carbone et plus largement la séquestration de carbone par les écosystèmes. Le CO_2 correspond à la seule source de carbone pour les plantes, hormis quelques composés organiques simples pouvant être assimilés directement par les racines. En augmentant la concentration en CO_2 dans l'environnement de la plante, l'apport de carbone pour cette dernière est accru, ce qui va modifier les relations source-puits et donc affecter les transferts de carbone dans la plante et vers le sol notamment *via* la rhizodéposition. Nous ne développerons pas dans notre travail la capacité de séquestration des sols; nous étudierons les flux à court terme de carbone vers le

sol et les processus rhizosphériques pouvant intervenir sur la capacité de séquestration des sols.

La défoliation constitue un bon outil de variation des relations source-puits en réduisant de manière significative l'entrée de carbone dans la plante, du fait d'une réduction drastique de la taille des organes photosynthétiquement actifs, exportateurs de carbone (organe source). De plus, dans le contexte actuel d'étude des conséquences du changement global sur le cycle du carbone, il est important de comprendre comment la défoliation, principal facteur de gestion agronomique des prairies affecte la rhizodéposition, pouvant ainsi influencer la séquestration de carbone dans le sol de ce type d'écosystème.

L'azote affecte également de manière significative les relations sources-puits dans la plante. Il a été largement démontré que l'azote stimulait la production de biomasse des parties aériennes des plantes et réduisait le ratio de biomasse racinaire sur la biomasse de parties aériennes. Les transferts de carbone vers le sol s'en trouvent changés. Dans notre travail l'azote n'est pas étudié comme un facteur à part entière, il est couplé avec les effets de l'augmentation de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère et avec la défoliation. Comme nous l'avons signalé précédemment, la disponibilité en azote dans le sol est à l'origine de compétition entre les plantes et les micro-organismes. Ainsi, le fonctionnement du compartiment microbien est modifié, affectant la disponibilité en N pour la plante et agissant sur la rhizodéposition par l'entremise de boucles de rétro-actions (densité d'apex entretien du gradient de diffusion passive des exsudats...).

1. Le dioxyde de carbone

1.1. Activité photosynthétique, production de biomasse et CO₂

Parmi les premiers effets observés de l'augmentation de la concentration en CO₂ de l'atmosphère, on note une stimulation de l'activité photosynthétique des plantes en C3 (Mott, 1990). Néanmoins, des études récentes laissent penser que des expositions à plus long terme ne stimulent plus l'activité photosynthétique (Drakes *et al.*, 1997 ; Rogers *et al.*, 1998), montrant les limites des études à court terme. En effet, une augmentation des concentrations en glucide des feuilles est couramment observée sous atmosphère enrichie en CO₂ (Fischer *et*

al., 1997). La capacité puits des feuilles est alors accrue. En conséquence, les sources doivent réduire leur activité et une diminution de l'activité photosynthétique est alors observée, correspondant à une acclimatation des plantes aux concentrations élevées en CO₂. Chez *Lolium perenne*, des études (Rogers *et al.*, 1998 ; Isopp *et al.*, 2000) ont montré que l'assimilation de CO₂ par les feuilles était augmentée de 30 à 40% sous CO₂ élevé pendant les 5 premières années suivant la mise en place d'un dispositif d'enrichissement à l'air libre des concentrations en CO₂ (FACE :Free Air Carbon dioxide Enrichment) installé en Suisse. En revanche, après 10 années, une diminution de la capacité photosynthétique est observée (Ainsworth *et al.*, 2003a). Ces résultats dépendent du niveau de fertilisation et sont nettement moins marqués à des niveaux élevés d'azote. Au champ, une acclimatation de l'activité photosynthétique pourrait avoir une importance écologique majeure. Les entrées de carbone dans le sol via la plante seraient réduites ce qui, à terme, limiterait la création de puits de carbone au niveau des sols prairiaux.

Une stimulation de la production de biomasse des plantes (Kimball, 1983 ; Kimball *et al.*, 2002 ; Long *et al.*, 1992) est généralement observée sous CO₂ élevé. Sur le dispositif FACE Suisse, les plants de *Lolium perenne* soumis au CO₂ présentaient une stimulation de 10% de leur production, lors de la mise en place du dispositif (Hebeisen *et al.*, 1997). En revanche, Daepf *et al.*, (2000) montrent après 6 années d'enrichissement en CO₂ une stimulation de production de biomasse de 25% sous niveau élevé de fertilisation. Cette augmentation de production est souvent accompagnée d'une diminution de la concentration en azote dans la plante (Luo *et al.*, 1994 ; Cotrufo *et al.*, 1998). On observe une augmentation de l'allocation de carbone aux racines (ratio Parties racinaires/Parties aériennes augmenté) ainsi qu'une augmentation de l'assimilation des éléments nutritifs par la plante (Cure et Acock, 1986 ; Jongen *et al.*, 1995 ; Gorissen 1996 ; Gorissen *et al.*, 1995 ; Van Ginkel *et al.*, 1996 ; Ross *et al.*, 1995 ; Cheng 1999a,b ; Rattray *et al.*, 1995 ; Hebeisen *et al.*, 1997). Toutefois, l'augmentation de l'activité photosynthétique et l'augmentation de la production primaire ne sont pas proportionnelles. Une grande part du carbone supplémentaire assimilé par photosynthèse sous CO₂ élevé n'est pas retrouvé dans la biomasse des plantes et, par conséquent, est libéré par la plante. Ce « puits manquant » pourrait se situer au niveau de la respiration des parties aériennes ou de leur sénescence (formation de litières), du renouvellement racinaire ou encore de la rhizodéposition.

1.2. Sorties de carbone de la plante

Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe plusieurs voies par lesquelles le carbone assimilé est libéré par la plante : la respiration, la sénescence des parties aériennes (litière), le renouvellement racinaire ou la rhizodéposition. Les effets du CO₂ sur la sénescence des parties aériennes et la décomposition des litières sont peu étudiés. Les quelques résultats obtenus montrent une augmentation de la production de masse de litière proportionnelle à l'augmentation de la production de biomasse des parties aériennes. En réponse, la biomasse microbienne est stimulée, mais pas son activité (Sowerby *et al.*, 2000). D'autres études ne montrent aucun effet du CO₂ sur l'apport de carbone au sol par les litières issues de plantes cultivées sous CO₂ élevé (Higgins *et al.*, 2002).

1.2.1. La respiration

C'est pour sa croissance et sa maintenance que la plante respire le plus (Amthor, 1997). Sous atmosphère enrichie en CO₂, la respiration de *Lolium perenne* par unité de masse est diminuée (Schapendonk *et al.*, 1997). Ceci résulte de la stimulation de la croissance des plantes ainsi que du contenu en protéines des tissus végétaux. En revanche, à l'échelle de l'écosystème, la respiration est augmentée du fait d'une augmentation de la production de biomasse (Ryle *et al.*, 1992 ; Schapendonk *et al.*, 1997 ; Casella et Soussana, 1997 ; Aeschlimann, 2003).

1.2.2. La rhizodéposition

Les conséquences à long terme des teneurs élevées en CO₂ sur la rhizodéposition sont encore peu connues. En effet, la majorité des expérimentations a été menée en conditions contrôlées et avec de courtes durées d'enrichissement en CO₂ de l'atmosphère du système sol-plante. Dans la majorité des cas, ces expérimentations montrent que sous CO₂ élevé, la rhizodéposition carbonée est stimulée (Norby *et al.*, 1987 ; Van Veen *et al.*, 1991 ; Billes *et al.*, 1993 ; Cardon, 1996). De même, de nombreuses études montrent que la respiration rhizosphérique est significativement augmentée sous CO₂ élevé (Lekkerkerk *et al.*, 1990 ; Van Ginkel *et al.*, 1997, Paterson *et al.*, 1999 ; Hungate *et al.*, 1997).

En revanche, de telles observations ne sont pas vérifiées à plus long terme. Quelques résultats obtenus en conditions naturelles indiquent que l'augmentation potentielle des transferts de

carbone au niveau des sols serait moins importante que ne le prévoient les premières études simulant les effets court terme de l'élévation des teneurs en CO₂ atmosphérique (Arnone et Körner, 1995). La rhizodéposition est que très rarement étudiée dans des conditions de plein champ après de longue période d'enrichissement en CO₂. Dans une étude récente à laquelle notre laboratoire a participé sur le dispositif FACE Néo Zélandais, la rhizodéposition est augmentée après 5 années d'enrichissement de l'atmosphère en CO₂ (Allard *et al.*, 2005). Sur le dispositif FACE Suisse présentant un historique de 9 années d'enrichissement en CO₂ du sol d'une prairie fertilisée, il apparaît qu'après 6 et 8 années d'enrichissement, les teneurs en carbone total du sol ne sont pas significativement modifiées (Van Kessel *et al.*, 2000a, b ; Horwath *et al.*, 2000 ; Van Groenigen *et al.*, 2002). Ces données sont en contradiction avec les données de production de biomasse des plantes issues du même dispositif. En effet, une augmentation de production de matière sèche des plants de ray grass est observée (Hebeisen *et al.*, 1997 ; Suter *et al.*, 2002). Cette augmentation résulte de la stimulation de l'activité photosynthétique des plantes. Ainsi la part de carbone entrant dans la plante est accrue, provoquant une stimulation de l'activité source et donc un transfert de carbone plus important vers les racines et vers le sol. Horwath *et al.* (2000) suggèrent, sans le démontrer, que la plus grande quantité de carbone entrant dans le sol via la rhizodéposition est plus rapidement minéralisée par les micro-organismes expliquant ainsi cette stabilité des concentrations en carbone total du sol. Les résultats obtenus par Hungate *et al.* (1996) ; Niklaus *et al.* (2000) ; Gill *et al.* (2002) ; Ross *et al.* (2004) sur d'autres dispositifs présentent également des concentrations en carbone des sols comparables entre CO₂ élevé et CO₂ ambiant, quel que soit le niveau de fertilisation. Néanmoins d'autres études montrent qu'après plusieurs années d'exposition à des teneurs élevées en CO₂ une quantité plus importante de carbone est présente dans le sol de prairies (Williams *et al.*, 2000 ; Leavitt *et al.*, 1994 ; Pendall *et al.*, 2001). Des différences dans la minéralogie des sols, la production de biomasse, l'espèce, le mode de gestion du dispositif étudiée peuvent être à l'origine de ces résultats contrastés (Hassink, 1997).

Il apparaît clairement que les conclusions concernant la rhizodéposition après de longues durées d'enrichissement de l'atmosphère en CO₂ sont spéculatives. En conditions naturelles, aucun résultat ne présente les conséquences directes du CO₂ élevé sur la rhizodéposition après une longue période d'enrichissement du sol en CO₂. De plus, les mécanismes régissant les transferts de carbone vers le sol (sites d'exsudation, taille des racines) et le processus

rhizosphériques associés (taille et activité du compartiment microbien) restent encore à préciser.

1.3. Les communautés microbiennes

Les racines étant la principale source de carbone supplémentaire entrant dans le sol, on peut supposer que les premiers effets du CO₂ sur les populations microbiennes auront lieu dans la rhizosphère. Les micro-organismes de la rhizosphère seront plus facilement affectés par les changements intervenant à ce niveau (Sadowsky et Schortemeyer, 1997) en comparaison avec les micro-organismes vivant plus éloignés des racines.

Les résultats des études examinant les réponses des micro-organismes au CO₂ sont controversées (O'Neill, 1994). De nombreuses études rapportent une augmentation de la biomasse microbienne sous CO₂ élevé (Berntson et Bazzas, 1997 ; Hungate *et al.*, 1996). Cependant, dans d'autres cas, il n'apparaît pas de stimulation évidente de la croissance des communautés microbienne par le CO₂. Schortemeyer *et al.* (1996) observent que la taille des populations microbiennes dans la rhizosphère du ray grass ou du trèfle blanc restent inchangées sous CO₂ élevé. Dans une autre étude, Shortemeyer *et al.* (2000) rapportent que l'activité, la biomasse microbienne et le nombre de bactéries cultivables ne sont pas augmentés dans une prairie naturelle de Floride soumise à des teneurs élevées en CO₂. Dans une étude conduite sur une prairie naturelle du Jura Suisse, Niklaus (1998) montre que la biomasse et l'activité microbienne ne sont pas influencées par le CO₂ élevé après 3 années d'enrichissement.

Peu d'études sont disponibles sur la composition des communautés microbiennes en réponse à l'augmentation du CO₂ atmosphérique. Des effets sont prévisibles du fait de modifications dans la disponibilité en substrats pour les micro-organismes. Certains travaux signalent un changement dans la composition des communautés microbiennes sous CO₂ élevé (Schortemeyer *et al.*, 1997 ; Marilley et Aragno, 1999 ; Montealegre *et al.*, 2000 ; 2002). Cependant d'autres études ne présentent aucune altération de la composition des communautés microbienne sous CO₂ élevé (Zak *et al.*, 2000).

Si l'activité et la composition des communautés microbiennes est modifiée sous atmosphère enrichie en CO₂, on peut s'attendre ainsi à des conséquences sur le temps de résidence des

composés organiques dans le sol et ainsi sur le stockage de carbone dans le sol des écosystèmes prairiaux (Montealegre *et al.*, 2002). Des changements de la composition des communautés microbiennes peuvent être également causés par des différences dans la nature des composés libérés par les plantes dans le sol.

Les conséquences à long terme de l'élévation de la concentration en CO₂ de l'atmosphère montrées sur la plante n'ont pas été clairement évaluées sur la rhizodéposition. Quelques dispositifs de terrain en conditions agronomiques réalistes (dispositifs FACE) permettent de prévoir les conséquences à plus long terme de l'élévation des concentrations en CO₂ atmosphérique. Chez le ray grass, il apparaît, sur ce dispositif FACE, une acclimatation de l'activité photosynthétique des plantes sous CO₂ élevé, dépendante de la disponibilité en N minéral dans le sol. De plus, la concentration en carbone total des sols n'est pas stimulée sous CO₂ élevé malgré un accroissement de la biomasse végétale. La majorité des travaux font l'hypothèse d'un apport supplémentaire de carbone au sol sous atmosphère enrichie en CO₂. Il reste à préciser si la rhizodéposition peut contribuer à cet apport supplémentaire. Les processus rhizosphériques associés (activité des communautés microbiennes) pourrait expliquer un turnover plus rapide du carbone supplémentaire présent dans le sol. Cette hypothèse reste à démontrer.

2. La défoliation

2.1. La défoliation affecte la répartition du carbone dans la plante

Durant les quelques jours suivant la défoliation (jusqu'à 5 jours), la biomasse, l'élongation, la respiration racinaire et l'absorption des nutriments par la racine sont réduites (Davidson et Milthorpe, 1966 ; Richards, 1993 ; Mawdsley et Bardgett, 1997 ; Mackie-Dawson, 1999). Cependant certains auteurs n'observent pas de réduction de l'élongation de la racine comme Paterson et Sim (1999) chez *Lolium perenne*.

Pour assurer la reconstruction de ses parties aériennes et donc assurer sa pérennité, deux sources principales de carbone interviennent chez une plante défoliée. Il s'agit des photo-

assimilats produits après la défoliation (post-défoliation), mais également des réserves accumulées durant la période pré-défoliation (Johansson, 1993). L'adaptation à la défoliation de nombreuses espèces végétales réside dans leur capacité à mobiliser ces composés carbonés et azotés non structuraux stockés dans leurs tissus et à orienter préférentiellement les flux d'assimilats vers les tissus en construction. Certaines études montrent que la contribution des réserves carbonées employées pour la reconstruction des parties aériennes dépasse celles des assimilats récents durant les premiers jours suivant la défoliation (de Visser *et al.* 1997, Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a). Après cette courte période, les assimilats récents deviennent quantitativement les plus importants : ils continuent d'être préférentiellement alloués aux méristèmes foliaires jusqu'à ce que la demande de ces derniers soit satisfaite et que les feuilles émergentes soient photosynthétiquement actives (Welker *et al.*, 1985; Briske et Richards, 1995). Les flux de carbone vers les racines pré-existantes sont ensuite rétablis (Richards, 1993). Ce sont plus particulièrement les réserves présentes à la base des feuilles qui vont contribuer à la reconstruction de la plante chez les graminées (Morvan-Bertrand *et al.* 1999a). En effet, certaines études signalent que les réserves des racines ne contribuent pas de manière significative à la reconstruction de la plante (Oosterheld et McNaughton, 1988). L'accroissement de l'activité photosynthétique des nouvelles feuilles (Delting *et al.*, 1979; Richards et Caldwell, 1985) ainsi que l'augmentation de l'assimilation de nutriments (Wallace et Macko, 1993) contribuent plus à la repousse que les réserves présentes au niveau des racines.

2.2. La défoliation affecte les entrées de carbone dans le sol

En modifiant l'orientation des flux de carbone au sein de la plante, la défoliation affecte les transferts de carbone vers le sol. En effet de nombreuses études montrent que la fauche et le pâturage affectent significativement les entrées de carbone organique dans le sol. Cependant, trois points de vue s'opposent : des augmentations, des diminutions ou encore aucun effet observés suite à la défoliation.

2.2.1. Augmentation de la rhizodéposition suite à la défoliation

Des études en conditions contrôlées suggèrent que l'allocation de carbone aux racines des plantes est augmentée après défoliation. Logiquement, une augmentation de la libération de

carbone dans la rhizosphère est à prévoir. A l'aide d'un marquage court au ^{14}C , Paterson et Sim (1999 ; 2000) montrent que le ray grass anglais (*Lolium perenne*) et la fétuque rouge (*Festuca rubra*) soumis à quatre défoliations successives, présentent une augmentation de la libération de ^{14}C par leurs racines, quel que soit le niveau de la fertilisation azotée. Ce phénomène est immédiat et transitoire; il se produit immédiatement après chaque coupe pour décliner 3 à 5 jours plus tard et revenir au niveau du témoin non défolié. Avec la même technique, Holland *et al.*, (1996) étudient les effets à court terme de la défoliation des parties aériennes de plantules de maïs (*Zea mays*) par des sauterelles. Vingt-six heures après la défoliation, une augmentation de l'allocation des composés carbonés nouvellement formés vers les racines est observée (+35% en défoliation sévère). De plus, la respiration rhizosphérique (racinaire et microbienne) et l'exsudation de composés solubles augmentent, d'autant plus que la surface défoliée est importante (25 et 50%). Dans le même temps, les flux de carbone vers les parties aériennes diminuent (-10% en défoliation sévère). Ceci peu illustrer la stratégie d'allocation des ressources chez les plantes défoliées qui stockent leurs réserves dans des organes moins accessibles pour les herbivores (Dyer *et al.*, 1991).

D'autres études montrant des effets positifs sur le compartiment microbien après une défoliation, suggèrent que la défoliation augmente les flux d'exsudation racinaire. En effet, Mawdsley et Bardgett (1997), par des études en microcosmes, montrent que la défoliation du trèfle blanc (*Trifolium repens*) provoque l'augmentation de la biomasse microbienne et de son activité dès le deuxième jour après la défoliation.

2.2.2. Aucun effet de la défoliation sur la rhizodéposition

Todorovic *et al.* (1999) à l'aide d'un marquage court au ^{14}C n'observent aucun effet à court terme de la défoliation du trèfle blanc (*Trifolium repens*) sur la libération par les racines de composés carbonés récemment assimilés. L'étude de la respiration rhizosphérique (racines et micro-organismes), réalisée 24h après la défoliation, indique qu'elle n'est pas significativement différente de celle du témoin non défolié quelle que soit l'intensité de la coupe (27 ou 51% de la surface foliaire). Cela suggère qu'aucune modification de l'exsudation ne se produit 24h après la défoliation. La fraction du carbone nouvellement assimilé allouée vers les racines et le sol reste inchangée quelle que soit l'intensité de la coupe, alors que celle dirigée vers les parties aériennes est augmentée au dépend des stolons chez la plante

sévèrement défoliée. Ceci s'explique par la présence de réserves importantes dans les stolons et les racines de trèfle blanc.

2.2.3. Diminution de la rhizodéposition

En étudiant l'activité des bactéries présentes dans le sol rhizosphérique de plantules de maïs (âgées de 2 semaines) une semaine après leur défoliation, Nguyen et Henry (2002) montrent que la défoliation réduit l'activité des micro-organismes présents, ce qui suggère une diminution de la rhizodéposition après la défoliation. De même, Crawford *et al.*, (1997) en conditions naturelles et Johansson (1993) en conditions contrôlées montrent une diminution immédiate de la respiration rhizosphérique après la défoliation respectivement chez *Medicago truncatula* et chez *Festuca ovina*. Pour *M. truncatula*, après 8 jours, elle redevient comparable à celle du témoin non défolié, alors que pour *F. ovina* la diminution se maintient 7 jours pour ensuite augmenter progressivement.

Quant à Mikola *et al.*, (2002), ils observent immédiatement après la défoliation de *Phleum pratense* une réduction de la libération par les racines de composés carbonés nouvellement assimilés. En revanche, la défoliation n'affecte plus ce processus une semaine après.

Les conséquences de la défoliation sur la physiologie de la plante sont clairement établis (Richards, 1993). Immédiatement après la défoliation, l'activité photosynthétique des plantes défoliées est stimulée afin de faciliter leur reconstruction. Les réserves de la plante sont également re-mobilisées afin d'aider à cette reconstruction, ce jusqu'à ce que l'activité photosynthétique redevienne suffisante et puisse assurer la croissance et le développement de la plante. Néanmoins, les résultats contradictoires concernant l'effet de la défoliation sur la libération de carbone par les racines, peuvent être expliqués par de nombreux facteurs. En effet, les conditions expérimentales (surtout microcosmes et hydroponie) ne sont pas réalistes, ni comparables d'une étude à l'autre. Les études portent sur des espèces différentes, chacune étant plus ou moins adaptées à la coupe. Les intensités et les fréquences de défoliation sont également variables d'un essai à l'autre. Aucune étude visant à déterminer l'impact de la défoliation sur les flux de C récent à la rhizosphère n'a été réalisée à ce jour en conditions de plein champ.

3. L'azote

L'azote est un des déterminants les plus importants de la croissance des plantes. Le taux de croissance relatif est étroitement corrélé à la teneur en azote des plantes (Ingestad, 1977). Pour la plupart des espèces végétales, l'azote minéral du sol (nitrate et ammonium) est la seule source d'azote (Marschner, 1995). La disponibilité en azote minéral du sol influence donc grandement le métabolisme des plantes, depuis la régulation de l'expression des gènes jusqu'à la production de biomasse (Marschner, 1995 ; Stitt, 1999).

3.1. Répartition des assimilats et production de biomasse

De fortes concentrations en azote au niveau du sol engendrent généralement une augmentation du taux net de photosynthèse (Mohammad, 1997 ; Cecchin, 1998). Ainsi, la taille (Wullschlegel et Oosterhuis 1990) et l'activité des sources (Lawlor *et al.*, 1989) sont stimulées. Il s'en suit une augmentation de la production de biomasse végétale. Néanmoins, le ratio racine/parties aériennes est diminué. L'exploration du sol par le système racinaire est moins importante du fait que ces derniers ont à disposition dans leur environnement proche les nutriments nécessaires à la croissance de la plante. La concentration en azote dans la plante est accrue, entraînant un taux d'acides aminés et de protéines plus important. Chez les graminées, la fertilisation azotée stimule le tallage et augmente la surface foliaire. Parallèlement à l'accroissement de la taille et de l'activité source, la quantité et la taille des puits sont stimulées par la fertilisation azotée (Hageman et Below, 1990).

3.2. Disponibilité en azote et rhizodéposition

En modifiant les relations sources-puits, la fertilisation azotée affecte les transferts de carbone de la plante vers le sol (synthèse de Nguyen, 2003). Du fait d'une stimulation de la croissance de la plante il semblerait légitime de s'attendre à une augmentation de la rhizodéposition sous l'effet d'un apport d'azote en relation avec l'augmentation de la taille de la plante (Henry, 2005). Néanmoins, les études de Hodge *et al.* (1996) montrent une diminution de la rhizodéposition azotée totale en présence d'une plus grande disponibilité en azote. A partir du même dispositif, Paterson et Sim (1999 ; 2000) mettent en évidence aucune différence significative dans les quantités brutes de carbone libérées par les racines entre deux

traitements azotés contrastés. Toutefois, dans tous les cas, une plus grande disponibilité en azote réduit la proportion de carbone libéré proportionnellement à la biomasse totale des plantes. En effet, malgré une stimulation de la production de biomasse et de la photosynthèse, la fertilisation diminue l'allocation de carbone récemment assimilé aux racines (-14% et -35% respectivement après un marquage continu et un marquage court au ^{14}C ; synthèse de Nguyen, 2003). Cependant, en considérant uniquement le bilan carboné des compartiments souterrains, les pourcentages de ^{14}C alloués à la respiration rhizosphérique et aux résidus du sol augmentent de 25% et 82% respectivement lorsque le sol est fertilisé en azote. Ceci peut être expliqué par le fait que les micro-organismes de la rhizosphère sont en compétition avec la plante pour l'azote minéral (Kaye and Hart, 1997). Un apport d'azote stimule la croissance microbienne et, par conséquent, augmente le flux d'exsudation passive.

3.3. Interactions carbone-azote

La présence de carbone organique facilement assimilable par les micro-organismes dans la rhizosphère fournit l'énergie nécessaire à l'activité et à la croissance des micro-organismes hétérotrophes (Hodge *et al.*, 2000). Ces derniers étant les acteurs majeurs de la transformation de l'azote (immobilisation/ minéralisation) dans le sol, la dynamique de l'azote dans les sols est donc intimement liée à celle du carbone (Chen *et al.*, 2003 ; Hodge *et al.*, 2000, Kudeyarov, 1999 ; Mary *et al.*, 1996). En effet, il est admis que la rhizodéposition stimule le cycle interne de l'azote qui comprend notamment la phase de minéralisation de l'azote organique (Hart *et al.*, 1994). De nombreuses études montrent, par exemple, une stimulation de la nitrification dans la rhizosphère de plants d'orge (Klemedtsson *et al.*, 1987). Ces travaux signalent également une minéralisation plus importante de l'azote provenant de la matière organique dans les sols plantés que dans les sols nus (Van der Krift *et al.*, 2001). Cette minéralisation plus importante peut profiter à la plante en améliorant sa nutrition minérale. Ainsi la relation entre rhizodéposition et nutrition minérale pourrait permettre à la plante de compenser la perte d'énergie que constitue la rhizodéposition (Hale et Moore, 1979). Néanmoins, l'azote minéralisé peut être immobilisé dans la biomasse microbienne (Clarholm, 1985 ; Norton et Firestone, 1996). Ce n'est alors qu'à la mort des micro-organismes que l'azote devient disponible pour la plante (Griffiths et Robinson, 1992).

Les rhizodépôts agissent également sur le statut azoté du sol en modifiant son ratio C/N, plus particulièrement dans la rhizosphère. Ce rapport influence grandement le comportement des

micro-organismes hétérotrophes. Comme nous l'avons signalé ci dessus, le carbone constitue un des principaux facteurs limitant le fonctionnement et le développement des micro-organismes, alors que pour la plante le facteur limitant est l'azote (Kaye et Hart, 1997). Par conséquent, si le ratio C/N du sol est faible, le développement et le fonctionnement des micro-organismes sont limités par le carbone. Ces derniers utilisent alors l'azote organique du sol comme source d'énergie, le minéralisent et le rendent disponible pour la plante. En revanche, si le C/N du sol est élevé, l'azote devient limitant pour les micro-organismes. Ces derniers entrent alors en compétition avec la plante pour l'azote (Jones et Darrah, 1992). Par conséquent le ratio C/N des rhizodépôts joue un rôle clé dans la dynamique de l'azote dans le sol (Grayston *et al.*, 1996). Ainsi tout facteur agissant sur la physiologie de la plante et modifiant ce ratio a des conséquences importantes sur la dynamique de l'azote dans le sol, d'où l'intérêt d'étudier la dynamique des transferts de carbone vers la rhizosphère en fonction de la disponibilité de l'azote dans les sols.

L'azote est un élément majeur pour la croissance de la plante et le fonctionnement du sol. La compétition entre micro-organismes et plantes dépend de la disponibilité en carbone et en azote dans le sol. La qualité des exsudats racinaires, en terme de ratio C/N, conditionne l'activité microbienne, cette dernière stimulant la rhizodéposition spécifique (par apex). C'est pourquoi lorsqu'une contrainte appliquée aux parties aériennes des plantes influence les transferts de carbone vers le sol, il est important de déterminer si la réponse à la contrainte dépend de la disponibilité en azote dans le sol. Il a été montré par exemple que cette disponibilité était le moteur de la réponse du ray grass aux concentrations élevées en CO₂ de l'atmosphère (Daepf *et al.*, 2000). Pour la défoliation, peu de données sont disponibles concernant ses conséquences sur la disponibilité en carbone dans le sol en fonction du niveau d'azote du sol.

B. OBJECTIFS DE LA THESE

La rhizosphère est une zone particulière du sol car elle constitue **une interface** par laquelle transitent des composés organiques libérés par les racines. Cet efflux, qui contribue aux transferts de C d'origine végétale vers le sol, est étroitement dépendant du fonctionnement de la plante. En effet, l'analyse bibliographique tend à montrer que les facteurs influençant les relations source-puits dans la plante affectent les transferts de C non seulement dans la plante mais également vers la rhizosphère.

Le **couplage entre l'écophysiologie de la plante et la rhizodéposition** est encore peu connu notamment dans des conditions *in situ* avec une approche intégrée, examinant le transfert de C récent dans le continuum atmosphère-plante-sol-micro-organismes. Or, ces compartiments interagissent, impliquant des mécanismes de rétro-actions complexes qui modulent le fonctionnement de la plante et donc, en conséquence, la libération de C par les racines.

Ainsi, une meilleure connaissance de cette libération de C (quantité, dynamique, facteurs de variations) dans des **conditions écologiques réalistes** contribue à mieux comprendre des processus majeurs du fonctionnement des sols tels que la dynamique des matières organiques, le recyclage des éléments minéraux et la structuration du sol.

Les graminées pérennes accumulent des réserves. Ces réserves sont remobilisées notamment lors de la repousse printanière. Par conséquent, le carbone circulant dans la plante provient non seulement des assimilats récents issus de la photosynthèse mais également de la remobilisation de ces réserves. Les mécanismes de mobilisation-remobilisation du carbone dans la plante et la part du carbone issu des réserves par rapport à celle du carbone récemment assimilé pour la repousse d'un organe par exemple sont maintenant bien connus, néanmoins aucun résultat ne s'intéresse à la contribution de ces deux sources de C à la rhizodéposition. C'est pourquoi, dans une première étape, nous chercherons à **définir la contribution du carbone récemment assimilé par la plante à la rhizodéposition**. En effet, toutes les études conduites jusqu'à présent ont fait l'hypothèse que la rhizodéposition est alimentée par les photo-assimilats récents transférés directement aux racines. Or, les organes végétaux pourraient contribuer significativement à cet efflux par la remobilisation des composés de réserve. Ce volet a été abordé dans le premier chapitre des résultats.

Outre le C circulant dans la plante c'est également le C transféré vers le sol qui est dépendant de l'environnement dans lequel évolue la plante. Ainsi, dans une seconde étape, **notre**

objectif est d'évaluer comment des contraintes subies par les parties aériennes de la plante modulent les flux de C récent vers la rhizosphère. Ces contraintes ont été choisies en raison de leurs conséquences connues sur les relations source-puits dans la plante et de leurs intérêts agronomiques et environnementaux : concentration en dioxyde de carbone, défoliation, disponibilité en azote dans le sol. Il reste en effet à déterminer *in situ* si ces contraintes modifient significativement les efflux de C récent vers le sol.

La figure 6 présente les compartiments clés de notre étude ainsi que nos objectifs.

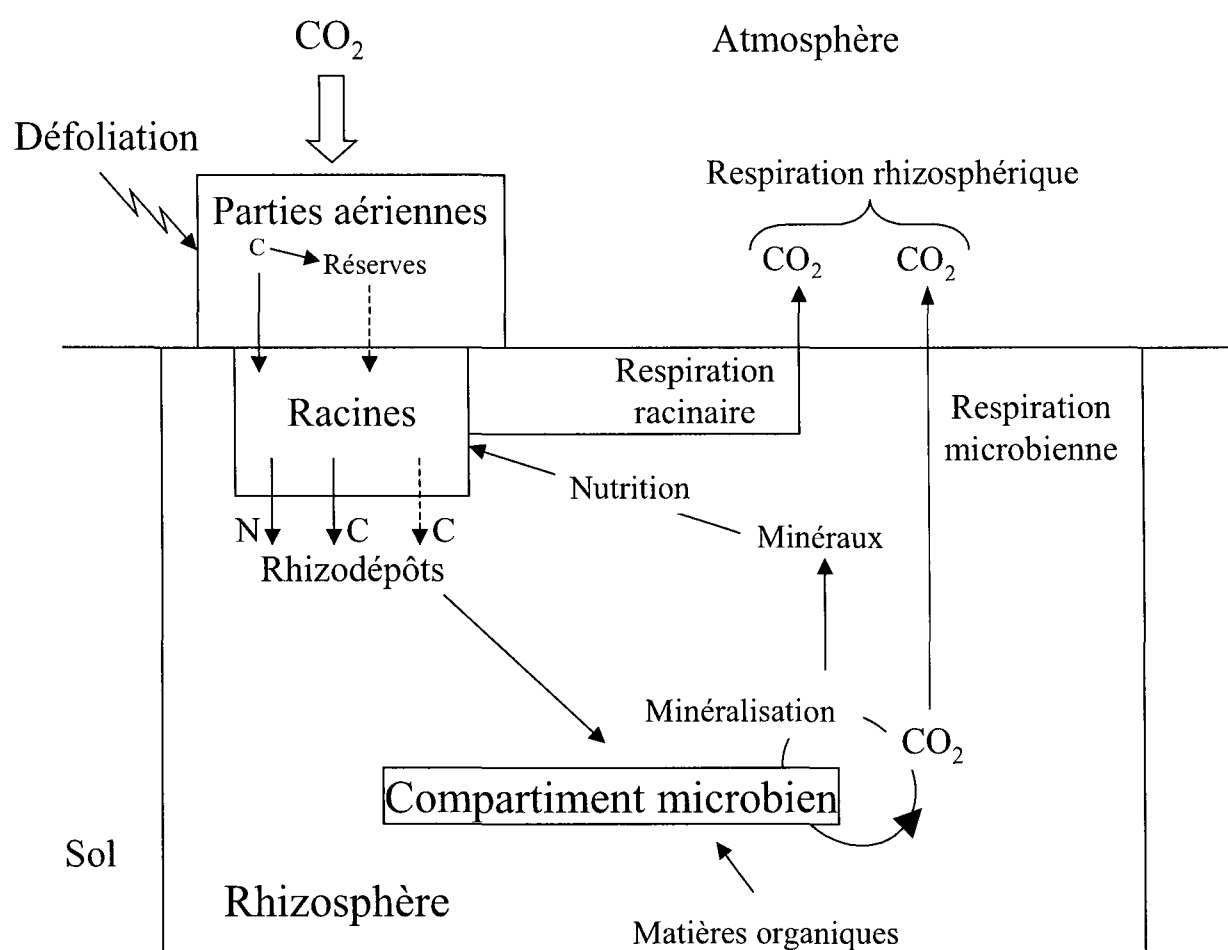


Figure 6 : Schéma conceptuel présentant les différents compartiments de notre étude. Les transferts du carbone récemment assimilé dans la plante et vers la rhizosphère sont étudiés. Nous caractériserons dans un premier temps la contribution du C récemment assimilé et du C des réserves à la rhizodéposition. Nous évaluerons ensuite les conséquences de l'élévation des concentrations en CO₂ atmosphérique sur la libération des photoassimilats récents dans la rhizosphère, ainsi que leur devenir dans le sol, mais également sur la rhizodéposition azotée. Enfin, nous étudierons les conséquences de la défoliation sur la disponibilité de C récent dans la rhizosphère et sur l'activité du compartiment microbien dépendant de cette disponibilité de C dans la rhizosphère.

C. MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre nous présenterons le matériel végétal utilisé ainsi que la majorité des techniques d'analyses utilisées pendant ma thèse. Seules quelques points spécifiques à chaque expérimentation seront introduits au début des chapitres concernés.

I. Matériel végétal

La plante utilisée pour chacune des trois expérimentations est une graminée pérenne : le ray grass anglais (*Lolium perenne* L.). Cette plante est le modèle d'étude le plus courant des écosystèmes prairiaux tempérés. Elle est en effet largement distribuée tout autour du globe, de l'Amérique du Nord, l'Europe en passant par l'Australie. C'est une plante ayant un intérêt économique important du fait d'une croissance rapide, d'une bonne capacité d'adaptation à différents types de sol et en raison d'un bon rendement et d'une bonne qualité fourragère. De plus, du fait de son système racinaire majoritairement composé de racines adventives, il est également utilisé pour limiter l'érosion des sols (Hannaway *et al.*, 1999).

II. Marquage des parties aériennes des plantes au $^{14}\text{CO}_2$ ou au $^{13}\text{CO}_2$

Pour les expérimentations décrites dans les chapitres D et E, des marquages des parties aériennes au $^{14}\text{CO}_2$ ou au $^{13}\text{CO}_2$ sont effectués. Dans le chapitre D il s'agit de deux marquages longs successifs (10j), le premier étant un marquage au $^{14}\text{CO}_2$, le second étant un marquage au $^{13}\text{CO}_2$. Dans le chapitre E, il s'agit d'un marquage court au $^{14}\text{CO}_2$ (1 à 2h). Néanmoins, dans tous les cas, les modalités de marquage restent les mêmes.

2.1. Séparation hermétique du compartiment souterrain

Avant le second marquage long ($^{13}\text{CO}_2$) effectué lors de l'expérimentation décrite dans le chapitre D, ainsi qu'avant le marquage court ($^{14}\text{CO}_2$) effectué dans l'expérimentation décrite dans le chapitre E, les parties aériennes des plantes sont isolées hermétiquement des racines. Deux couvercles sont fixés à chaque extrémité des pots de culture. L'étanchéité totale du dispositif est assurée par l'ajout de silicone liquide (RTV 585, Rhône Poulenc, France) coulé

dans un tube en plastique entourant le collet des plantes. L'absence de fuite est contrôlée lorsque le silicone a durci : le compartiment souterrain est immergé dans l'eau et balayé par un flux d'air.

Durant le marquage et la chasse, le compartiment souterrain est continuellement balayé par un flux d'air sans CO₂ en utilisant deux orifices du couvercle supérieur des pots de culture. Ces deux orifices sont connectés à des tuyaux reliés à une extrémité à une cartouche de chaux sodée, qui fixe le CO₂ de l'air en amont du pot, l'aval étant relié à une pompe péristaltique permettant le bullage de l'air dans 200ml de NaOH 1M (Warembourg et Billes, 1979 ; Todorovic *et al.*, 1999 ; photographie 1).

Les plants sont placés dans l'enceinte de marquage (photographie 2). Cette enceinte de marquage d'un volume totale de 1600 litres (en raison de volumes morts sous le plateau soutenant les plantes), est composée d'une chambre en altuglas (1m X 1m X 0,70m). L'intérieur de la chambre est régulé en lumière, en température et en hygrométrie. Ces données seront précisées lors du descriptif de chaque expérimentation. La chambre en altuglas est disposée dans une rigole contenant de l'eau à pH 5. L'eau assure un joint d'étanchéité qui isole l'atmosphère de l'enceinte. L'acidité de l'eau empêche la formation de carbonates qui pourraient piéger ainsi le CO₂ de l'enceinte de marquage.

Afin de mesurer l'évolution de l'activité spécifique de l'atmosphère de la chambre lors du marquage au ¹⁴CO₂, un analyseur de radioactivité β- en flux continu (A500TR, Packard instrument, Co. Inc, CT, USA) est couplé à un analyseur de gaz infrarouge (IRGA, ADC 225 MK3, Hoddesdon, UK) et un système informatique (Figure 7). L'ensemble du système permet de réguler très finement à la fois l'activité ¹⁴C et la concentration en CO₂ de la chambre de marquage.

En revanche pour le marquage ¹³CO₂, l'activité ¹³C ne peut être contrôlée pendant le marquage. Ce n'est qu'*a posteriori* que l'abondance isotopique en ¹³C (atom% ¹³C) de l'atmosphère de l'enceinte est contrôlée après analyse de la teneur en ¹³C de solution de soude 1M (100ml) ayant piégé une partie de l'air de la chambre (Annexe 2).

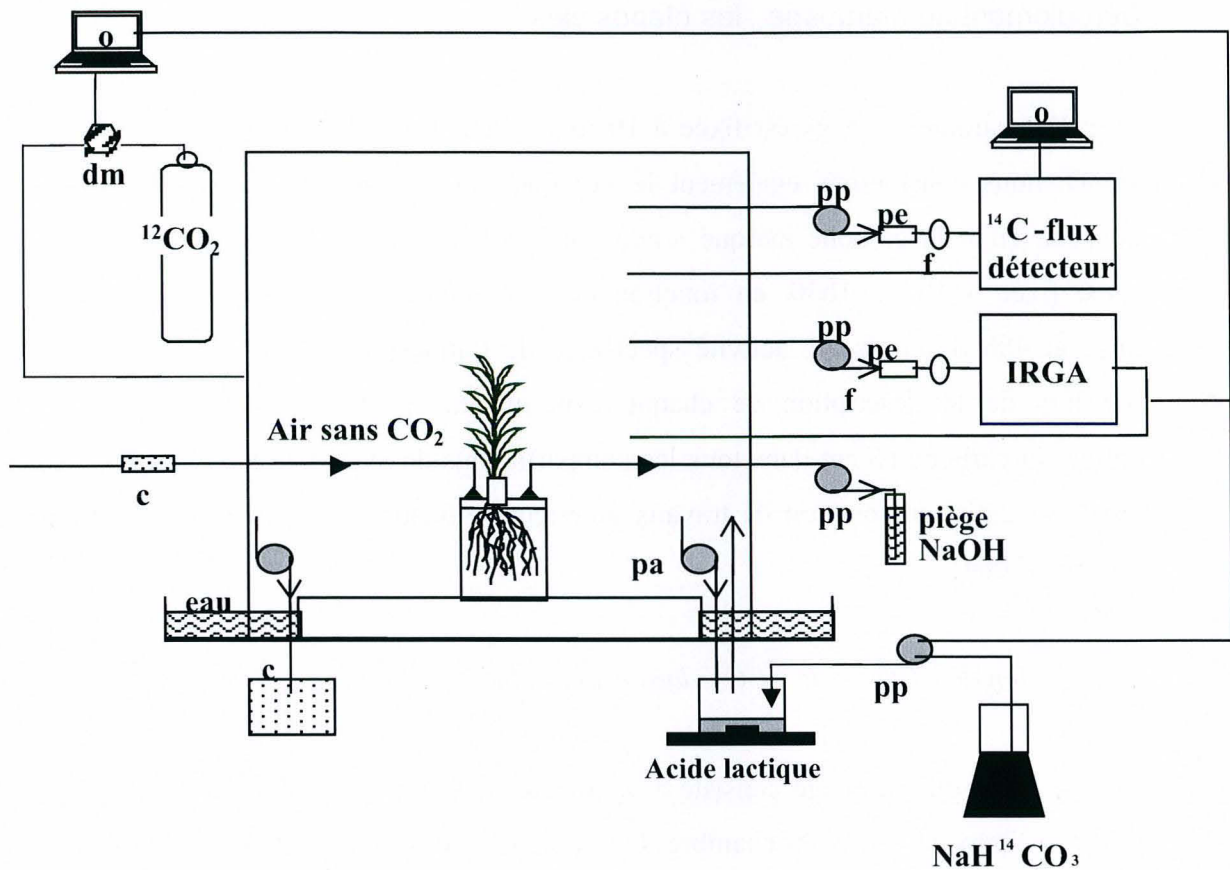
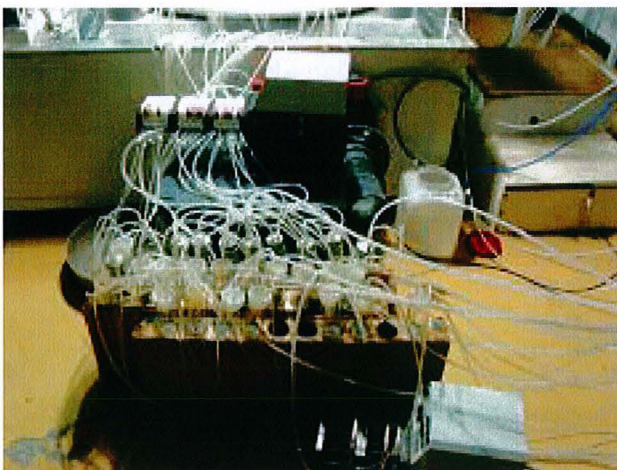


Figure 7: Dispositif de marquage des parties aériennes des plantes au $^{14}\text{CO}_2$, $^{13}\text{CO}_2$. c : chaux sodée, dm : débitmètre massique, f : filtre de $0,2\mu\text{m}$, o : ordinateur, pp : pompe péristaltique ; pa : pompe aquarium ; pe : piège à eau.



Photographie 1 : Pièges à soude contenant 200ml de NaOH 1M permettant de mesurer la respiration rhizosphérique. Il y a un piège à soude par pot.



Photographie 2 : Enceinte de marquage contenant les plantes. Ici ce sont les 24 plantes utilisées pour l'expérimentation décrite dans le chapitre E.

2.2. Déroulement du marquage : les étapes clés

La durée des marquages longs est fixée à 10 jours. Pour l'expérimentation décrite dans le chapitre D, nous considérons également le fait que l'on souhaite caractériser le carbone marqué « ancien » du carbone marqué « nouveau ». En revanche, la durée des marquages courts est fixée à 1h ou 1h30, en fonction de l'assimilation des plantes juste avant le marquage et 48h de chasse. L'activité spécifique de l'atmosphère en ^{14}C ou en ^{13}C sera précisée lors de la description de chaque expérimentation. Ces 48 heures permettent l'allocation du carbone récent dans tous les compartiments du système plante-sol. Ce temps de chasse est choisi en fonction de travaux antérieurs effectués au laboratoire (Todorovic, 2000 ; Henry, 2004).

2.2.1. Production de $^{14}\text{CO}_2$ et de $^{13}\text{CO}_2$ dans l'atmosphère

La première étape du marquage consiste à augmenter le plus rapidement possible l'activité spécifique de l'atmosphère de la chambre de marquage à la valeur souhaitée. Pour se faire, une quantité *ad hoc* de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ou de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ est ajoutée dans un réacteur contenant de l'acide lactique 1M en excès (Figure 7).

Le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ ou de $^{13}\text{CO}_2$ est obtenu en ajoutant une solution de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ou de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ dans un flacon (réacteur) contenant de l'acide lactique 1M. Le mélange est agité par un barreau aimanté tout au long du marquage.

Le réacteur est ensuite continuellement balayé par de l'air prélevé dans la chambre à l'aide d'une pompe aquarium. L'air enrichi en $^{14}\text{CO}_2$ ou en $^{13}\text{CO}_2$ est redirigé vers l'enceinte où il barbote dans de l'eau acidifiée, ce qui permet de contrôler en permanence la circulation d'air entre le réacteur et l'enceinte durant le marquage.

2.2.2. Maintien de l'activité spécifique dans la chambre

Les plantes assimilent le $^{14}\text{CO}_2$ ou le $^{13}\text{CO}_2$ présent dans la chambre de marquage par photosynthèse. Pour maintenir la concentration en CO_2 et l'activité spécifique constantes pendant toute la durée du marquage, une pompe péristaltique reliée au système informatique et au dispositif de contrôle gérant l'ensemble des régulations de l'enceinte, permet de délivrer

le $^{14}\text{CO}_2$ ou le $^{13}\text{CO}_2$ en fonction des besoins des plantes. En dehors de la période de marquage, la concentration en CO_2 est maintenue constante à l'aide de régulateurs de débit massique reliés au dispositif de contrôle (Figures 7, 8 & 9).

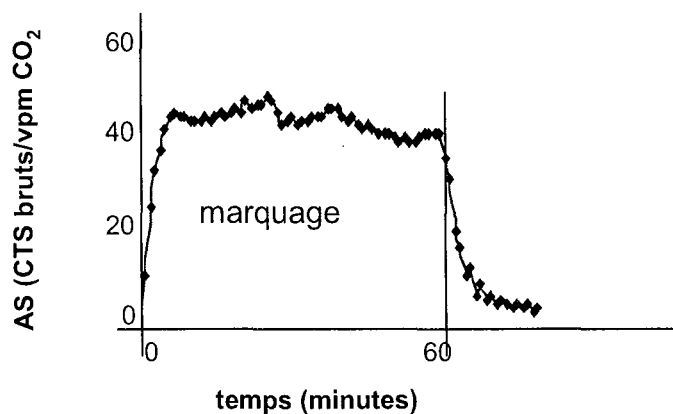


Figure 8 : Activité spécifique de la chambre pendant le marquage (exemple d'un marquage court de 1h). A la fin du marquage, l'activité spécifique dans la chambre de marquage décroît rapidement grâce au fonctionnement d'une pompe forçant l'air de l'enceinte à traverser un piège à chaux sodée piégeant le $^{14}\text{CO}_2$ encore présent dans l'enceinte de marquage.

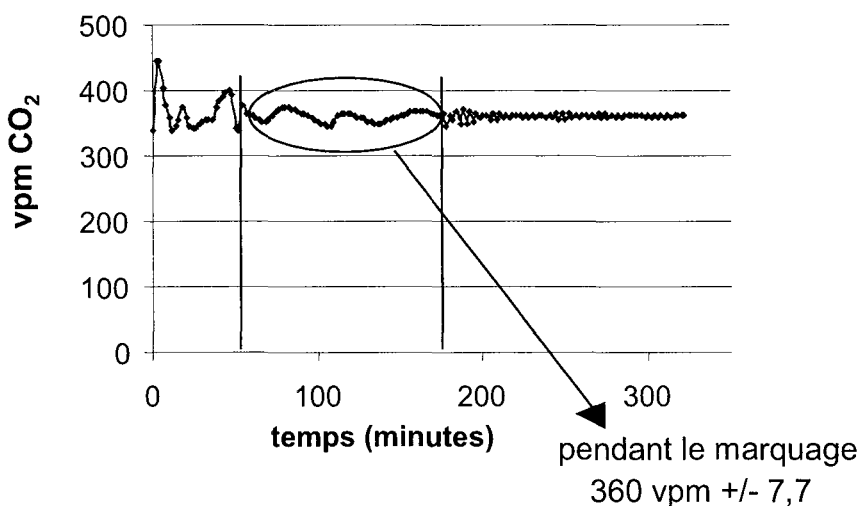


Figure 9 : Evolution de la concentration en CO_2 dans l'enceinte de marquage, avant, pendant le marquage et après le marquage. Grâce au système informatique, la concentration en CO_2 dans l'enceinte de marquage reste constante tout au long de l'expérience.

2.2.3. Fin du marquage

A la fin de chaque marquage, une pompe force l'air de l'enceinte à passer à travers un piège à CO₂ de chaux sodée de grande capacité. Ce piège permet d'éliminer le ¹⁴CO₂ présent dans l'enceinte à la fin du marquage. Parallèlement, pour les marquages courts au ¹⁴CO₂, grâce au dispositif de régulation, une bouteille injecte du ¹²CO₂ pour maintenir la concentration en CO₂ constante dans la chambre durant la période de chasse. Ainsi l'activité spécifique du ¹⁴C diminue sans variation de la concentration en CO₂ dans la chambre de marquage. Il est important de contrôler de manière précise la quantité de ¹⁴CO₂ offerte aux plantes pendant le marquage. Cela permet d'éviter un stress provoqué par des fluctuations de la photosynthèse qui aurait alors des conséquences sur les flux de carbone dans la plante et vers le sol. Après récolte, il est possible d'établir un bilan de ¹⁴C consommé en fonction de ce que les plantes ont assimilé et de ce que l'on retrouve dans les différents compartiments analysés.

III. Marquage des parties aériennes des plantes au ¹⁵NH₃

Pour l'expérimentation décrite dans le chapitre E, un marquage des parties aériennes au ¹⁵N a été réalisé (Figure 10). Ce marquage consiste à faire assimiler aux feuilles du ¹⁵NH₃ (Janzen et Bruinsma, 1989 ; Janzen, 1989). Après avoir placé les plantes dans la chambre de marquage et contrôlé la concentration en CO₂ de l'atmosphère, le ¹⁵NH₃ gazeux est vaporisé dans l'atmosphère de la chambre de marquage pendant 15 minutes. Ce dernier est obtenu en ajoutant un excès de NaOH 1M à une solution de sulfate d'ammonium à 10% (excès isotopique de 10 atom%) d'azote 15 (¹⁵(NH₄)₂SO₄) à l'aide d'une seringue, dans un réacteur étanche. La quantité de ¹⁵(NH₄)₂SO₄ initialement présente dans le réacteur est définie de manière à obtenir une concentration finale de 200μL.L⁻¹ de NH₃ dans la chambre de marquage. Une pompe aquarium permet d'injecter le ¹⁵NH₃ dans la chambre de marquage. La concentration en NH₃ de 200μL.L⁻¹ a été choisi du fait qu'elle n'a aucune conséquence toxique sur la plante et qu'elle permet d'obtenir un enrichissement isotopique suffisant du végétal (Janzen et Bruinsma, 1989 ; Merbach *et al.*, 2000). A la fin du marquage court au ¹⁴CO₂, le ¹⁵NH₃ restant dans la chambre est piégé dans de l'acide chlorhydrique 1M. Durant cette période de marquage, la concentration en CO₂ dans l'enceinte est maintenue constante grâce au dispositif de régulation, par injection de ¹²CO₂ issu d'une bouteille située à

l'extérieur de la chambre de marquage. Immédiatement après le marquage ^{15}N a lieu le marquage au carbone 14.

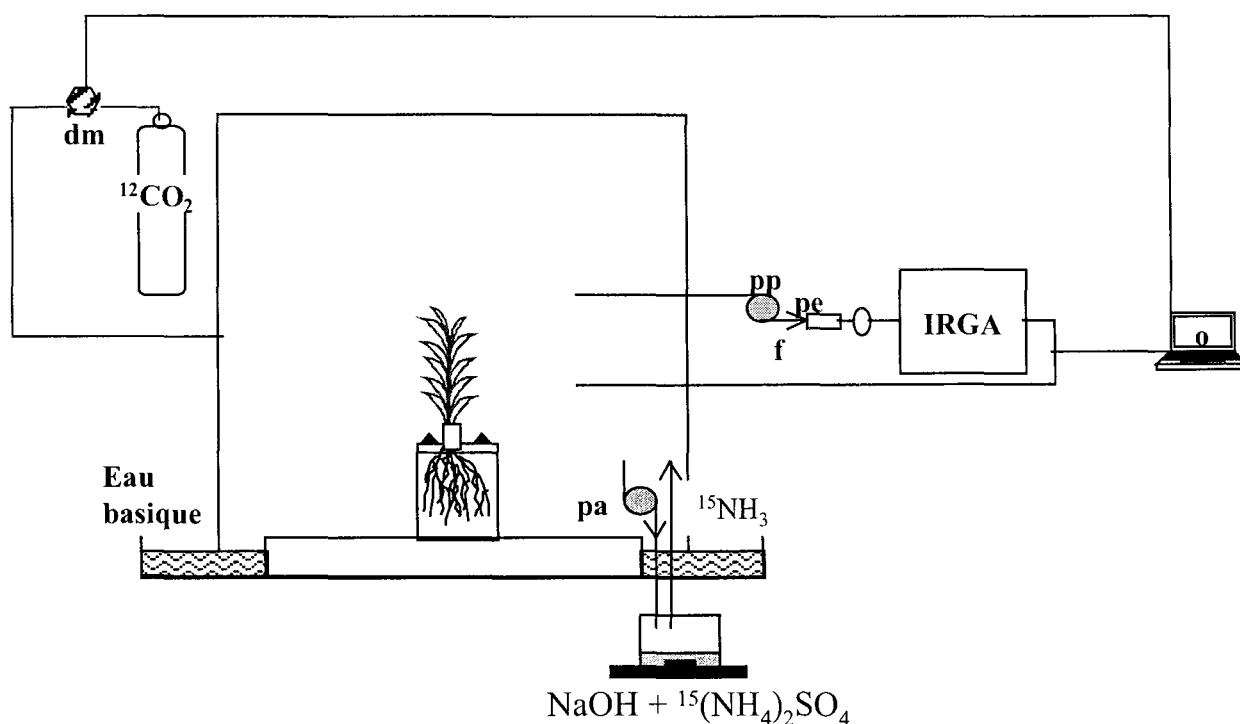


Figure 10 : Dispositif de marquage des plantes au $^{15}\text{NH}_3$. Les plantes assimilent le ^{15}N par leurs parties aériennes. dm : débitmètre massique, o : ordinateur, pp : pompe péristaltique ; pa : pompe aquarium ; pe : piège à eau. L'eau basique permet d'éviter le piégeage du $^{15}\text{NH}_3$ pendant le marquage.

IV. Récolte

Pour chacune des trois expérimentations, des cylindres de PVC sont utilisés comme pot de culture. Après chaque phase de culture, les plantes sont récoltées selon le même protocole quelle que soit l'expérimentation (Figure 11).

La plante est coupée au niveau du collet. Les feuilles sont séparées du reste de la talle.

Lors de la récolte, le cylindre de PVC est vidé de son sol. Ce sol est séparé en sol adhérent (SA) et en sol non adhérent (SNA) suivant un protocole standard décrit par Todorovic (2000). Après avoir soigneusement secoué 10 fois le système racinaire, de manière à éliminer le sol faiblement adhérent aux racines, le système racinaire est délicatement brossé afin de récupérer le sol adhérent. Un tri méticuleux est effectué pour éliminer le maximum de fragments de racines dans chaque fraction de sol. Les racines sont ensuite lavées avec une solution

isotonique de CaCl_2 à 0,5M, éliminant le sol adhérent tout en évitant un choc osmotique qui fragiliserait les structures du système racinaire et provoquerait un efflux de carbone des tissus racinaires. Le sol adhérent et non adhérent récolté est ensuite homogénéisé et tamisé à 2mm. Les échantillons de feuilles et de racines sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -30°C . Les échantillons de sol sont stockés à 4°C . Une aliquote de sol adhérent et de sol non adhérent frais est rapidement prélevée afin d'analyser le carbone de la biomasse microbienne. Le reste de sol ainsi que les échantillons végétaux sont ensuite lyophilisés, pesés afin de déterminer la masse sèche et broyés jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine afin de permettre les analyses de carbone, azote, ^{14}C , ^{13}C ou encore ^{15}N .

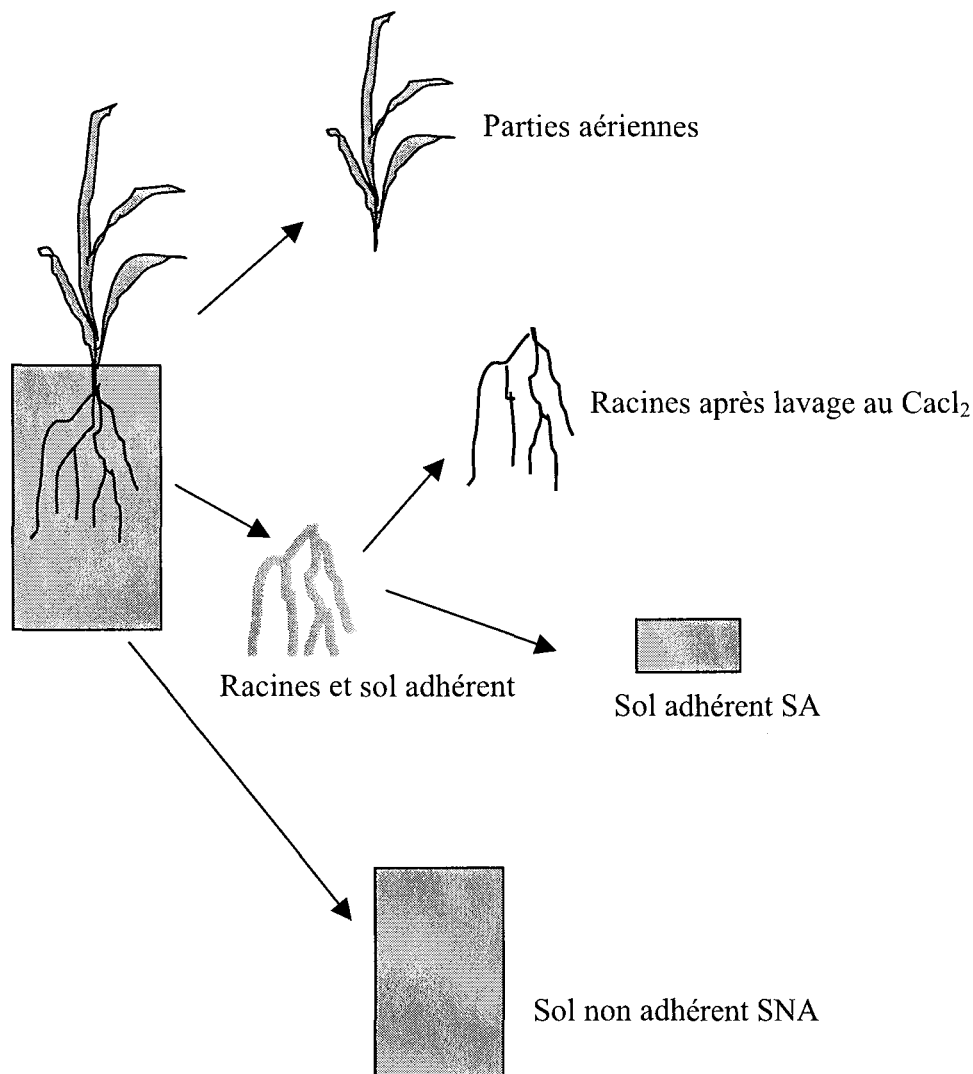


Figure 11 : Protocole de récolte des plantes après la période de culture.

V. Analyses

5.1 Analyses du C de la biomasse microbienne : technique d'extraction fumigation

5.1.1. Principe

Le carbone de la biomasse microbienne des sols adhérents et des sols non adhérents est analysé par la technique de fumigation extraction.

Cette technique repose sur la mesure du carbone organique microbien par différence entre le carbone soluble contenu dans un échantillon fumigé par du chloroforme et celui du même échantillon non fumigé (Vance *et al.*, 1987). En effet, les vapeurs de chloroforme, en détruisant les membranes des microorganismes présents dans l'échantillon de sol étudié, provoquent la libération de leur contenu cytoplasmique dans la fraction soluble du sol. La différence de teneurs en carbone soluble des échantillons exposés au chloroforme et des échantillons non exposés correspond au carbone de la biomasse microbienne. Un facteur de correction (Kec) caractéristique de la nature du sol est ensuite appliqué pour déterminer le carbone total de la biomasse microbienne.

Formule : $C_{BM} = (C \text{ échantillon exposé au Chloroforme} - C \text{ échantillon non exposé}) / K_{ec}$

Lors de l'ensemble de nos expérimentations, au vu du statut argileux des différents sols utilisés, un facteur $K_{ec} = 0,45$ est utilisé (Beck *et al.*, 1997). (Figure 12).

5.1.2. Pré-extraction

Cette étape permet d'éliminer tous les débris organiques (racines) et cailloux restants dans l'échantillon de sol susceptibles de tronquer le résultat de l'analyse du carbone total de la biomasse microbienne. Deux fois 10 g de sol frais (échantillon fumigé et échantillon non fumigé) pesés dans un pilulier en verre sont mélangés avec 40 ml de K_2SO_4 0,05M puis agités 45 minutes à 40 tours min^{-1} . La suspension est filtrée afin d'éliminer toutes impuretés, grâce à un tamis de 500 μm . La solution contenant le sol éliminé de tous débris est recueillie dans un

flacon. La suspension de sol est ensuite filtrée sur papier Whatman n°42 afin de ne récupérer que le sol. C'est sur ce sol contenu dans le filtre que les étapes suivantes sont réalisées.

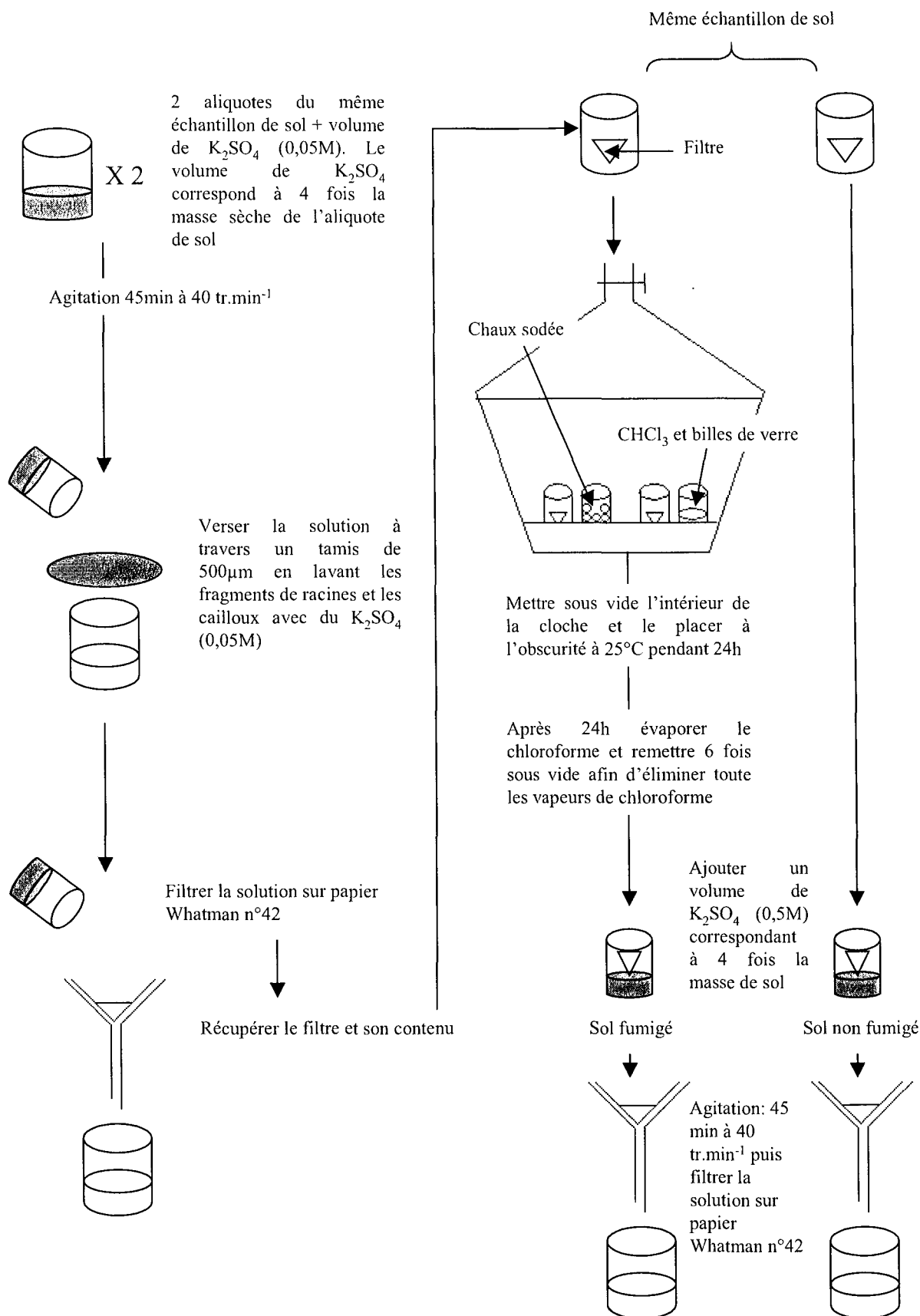
5.1.3. Fumigation des échantillons

Les filtres avec le sol destiné à être fumigé sont placés dans des piluliers en verre disposés ensuite dans un incubateur contenant un peu d'eau dans sa partie inférieure afin de limiter le dessèchement du sol au cours de la fumigation. Quelques gouttes de chloroforme sont ajoutées à chaque échantillon fumigé. Un flacon contenant des billes de verre et 50 ml de chloroforme sans éthanol ainsi qu'un flacon de chaux sodée permettant de piéger le CO₂ éventuellement libéré sont placés dans l'incubateur. Ce dernier est ensuite hermétiquement fermé grâce à de la graisse silicone. Le vide est ensuite fait dans l'incubateur jusqu'à ce que le chloroforme soit porté à ébullition (-0,7 bar). L'incubateur est alors placé 24 h à 25°C à l'obscurité.

Après incubation, l'incubateur est ouvert, le flacon de chloroforme retiré, puis afin d'éliminer les vapeurs de chloroforme restantes, le vide est à nouveau effectué. Cette opération est répétée six fois.

5.1.4. Extraction des échantillons fumigés et des échantillons non fumigés

Tout comme pour les échantillons de sols fumigés, les filtres contenant le sol non fumigé sont placés dans un pilulier en verre. Ces échantillons fumigés et non fumigés d'un même sol sont extraits avec 40ml de K₂SO₄ à 0,5M. Le K₂SO₄ permet de solubiliser le carbone. Les échantillons sont agités grâce à un agitateur rotatif pendant 45 minutes à 40 tours min⁻¹. Le mélange est ensuite filtré sur papier Whatman n°42.

Figure 12 : Représentation schématique de la pré extraction, fumigation extraction (Vance *et al.*, 1987).

5.2. Analyse du carbone total

5.2.1. Poudres des échantillons végétaux et de sol

Le C total est dosée par chromatographie en phase gazeuse par un auto analyseur carbone / azote (Flash EA 1112, Thermo Finnigan). Une aliquote de poudre végétale (≈ 5 mg) ou de sol (≈ 10 mg) est pesée exactement dans une nacelle en étain. La nacelle subit une combustion à 1030°C sous un flux d'oxygène et d'hélium (débits de 220 ml min^{-1} et 120 ml min^{-1} respectivement). Les différents éléments résultant de la combustion seront séparés par chromatographie sur colonne en phase gazeuse et détectés par catharométrie. La concentration en carbone de l'échantillon est calculée à partir d'une calibration de l'appareil réalisée au préalable avec un étalon d'atropine. Cette molécule présente un rapport C/N voisin de celui du matériel végétal analysé.

5.2.2. Solutions

Le carbone organique et l'azote organique des solutions de K_2SO_4 issu des analyses du carbone de la biomasse microbienne ainsi que le carbone respiré par les compartiments souterrains piégés dans les pièges à soude sont quantifiés au COTmètre (Shimadzu TOC-VCSH). Le principe de fonctionnement de l'appareil consiste en une combustion de l'échantillon à 680°C effectuée en présence d'un catalyseur qui optimise la réaction d'oxydation de la matière organique en CO_2 . La combustion à cette température offre l'avantage de pouvoir analyser des échantillons ayant des matrices complexes, comme les solutions chargées de sels. Un détecteur à infrarouge est employé pour mesurer le CO_2 produit par l'oxydation de l'échantillon. Combiné avec un catalyseur de combustion à grande capacité, ce détecteur permet une limite de détection de l'ordre de 10ppb de carbone total. L'azote organique est mesuré en chimiluminescence par l'analyseur azote TNM-1 (Shimadzu, Japan) couplé en ligne au COTmètre.

5.3. Analyse des concentrations en glucides totaux dans les tissus végétaux

L'analyse des concentrations en glucides totaux dans les tissus racinaires est effectuée selon le protocole établi par Dubois *et al.* (1956). Cette méthode permet l'analyse des glucides simples, oligosaccharides, polysaccharides et de leurs dérivés. Environ 40mg de poudre de racine sont ajoutés à 2ml d'éthanol à 80%. Cette étape correspond à l'extraction à l'éthanol de la fraction de carbone soluble, principalement constituée de glucides. Le mélange est porté à 80° dans un bain-marie pendant 15min et ensuite centrifugé 10 min à 10 000 rpm. L'opération de centrifugation est répétée 2 fois afin de récupérer un maximum de glucides dans la poudre de tissus racinaires. Le surnageant est récupéré et l'éthanol est évaporé pendant une nuit au « Speed Vac ». Après évaporation, de l'éthanol, les glucides totaux sont récupérés par dissolution dans l'eau distillée. Deux ml de la solution eau distillée + glucide sont prélevés et mélangés à 1ml de phénol à 5% et 5ml d'acide sulfurique concentré. Une réaction colorimétrique survient alors, la coloration étant proportionnelle à la concentration en glucides totaux dans la solution. Le tout est agité et mis à reposer 20min à 25- 30°C. Après 20min, l'absorption du mélange est mesurée par spectrophotométrie à 490 nm. Parallèlement une gamme étalon est établie avec des solutions dont la concentration en glucides est connue. Au final la concentration en glucides est exprimée en moles de glucides par kilogrammes de racines en équivalent hexose.

5.4. Analyse du ^{14}C

5.4.1. Echantillons végétaux

La radioactivité des organes végétaux est dosée par comptage en scintillation. Le flux de gaz dégagé par la combustion des échantillons pour l'analyse C/N passe à travers un détecteur β -en flux continu (A500TR, Packard instrument, Co. Inc, CT, USA) relié en série à la sortie de l'auto analyseur C/N (Benoit *et al.*, 1994). L'activité en ^{14}C est ainsi mesurée.

5.4.2. Echantillons de sol

Du fait de la faible activité ^{14}C des échantillons de sol, l'analyse n'est pas possible avec le détecteur β en flux continu (A500TR, Packard instrument, Co. Inc, CT, USA). Des aliquotes de sol de 150 mg sont préparés dans des nacelles en cellulose contenant 100 mg de poudre de cellulose favorisant ainsi la combustion de l'échantillon. La combustion des nacelles s'effectue dans un auto oxidiser (Model 307, Packard, USA). Après combustion de l'échantillon, le gaz dégagé est piégé dans 5 ml de Carbo Sorb (Packard, USA) mélangé à 5ml de liquide scintillant Permafluor (Packard, USA). La radioactivité est ensuite comptée pendant 10 minutes grâce à un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2100 Tr, Packard, USA).

5.4.3. Echantillons liquides

L'activité ^{14}C des solutions de soude 1M utilisées pour piéger le $^{14}\text{CO}_2$ issu de la respiration rhizosphérique ainsi que des solutions de K_2SO_4 issues de l'extraction fumigation est mesurée pendant 10 min sur un aliquote de 1ml de solution mélangée à 10 ml de liquide scintillant : Ultima Gold (Packard, USA) pour le NaOH et Ultima Flo (Packard, USA) pour le K_2SO_4 . Dans l'Ultima Gold les solutions de K_2SO_4 ont tendance à rapidement décanter, faussant ainsi les mesures d'émissions de rayonnement β . Il a par conséquent fallu tester d'autres liquides scintillants permettant de conserver le mélange liquide scintillant- K_2SO_4 homogène pendant le comptage. L'Ultima Flo s'est révélé être le mieux adapté (annexe 3).

5.4.4. Expression des résultats

Lors de chaque marquage, la quantité de carbone 14 consommée par les plantes est déterminée, ce qui nous renseigne sur l'assimilation de ces plantes pendant le marquage. La quantité totale de radioactivité retrouvée dans le système plante sol micro organismes correspond à la somme du carbone 14 retrouvée dans chacun des compartiments analysés. Ainsi, la différence entre la quantité de carbone 14 assimilé pendant le marquage et la quantité de carbone 14 retrouvée dans le système plante sol micro organismes après récolte est calculée. Elle permet de connaître la part de carbone perdue par respiration des parties aériennes de toutes les plantes présentes dans l'enceinte de marquage, pendant la période de chasse de 48 heures ayant suivi le marquage.

Après récolte, la proportion de radioactivité retrouvée dans chaque compartiment composant le système plante sol micro organismes est exprimée par la proportion d'activité totale retrouvée : % RTR. Il rend compte de la distribution relative du carbone 14 dans chaque compartiment, en fonction de sa taille et de son activité métabolique. Il traduit la force de puits d'un compartiment donné (Cralle et Heichel, 1985; Robin *et al.*, 1987).

$$\%RTR = \frac{\text{activité } ^{14}\text{C (Bq) d'un compartiment donné}}{\text{activité } ^{14}\text{C (Bq) du système plante-sol complet}} \times 100$$

L'activité ^{14}C du système plante-sol complet correspond à la somme des activités en Bq retrouvées dans les feuilles, les tiges, les racines, le volume de sol adhérent et de sol non adhérent du pot, la respiration rhizosphérique et finalement dans la biomasse microbienne du sol adhérent et du sol non adhérent.

5.5. Analyse du carbone 13 et de l'azote 15

Le statut radioactif ^{14}C des échantillons doublement marqués ^{14}C - ^{13}C ou ^{14}C - ^{15}N n'a pas permis leur analyse en spectrométrie de masse dans un laboratoire à proximité acceptant les échantillons marqués. C'est pourquoi les échantillons ont été envoyés au laboratoire isotopes de l'Université de Davis en Californie aux USA qui accepte des échantillons radioactifs. La spectrométrie de masse permet de mesurer la concentration en C et N total ainsi que l'excès et l'abondance isotopique de carbone de masse 13 et d'azote de masse 15 pour chaque échantillon.

Le carbone 13 piégé dans les solutions de NaOH 1M utilisées pour les mesures de la respiration rhizosphérique et de l'abondance isotopique *a posteriori* de l'atmosphère du marquage au ^{13}C sont déterminées par ajout d'un excès de SrCl au NaOH. Le précipité formé (SrCO_3) est ensuite récolté après filtration et séchage.

De la même manière, les abondances isotopiques en ^{13}C (atom%) et en ^{15}N (atom%) des échantillons de plantes et de sol sont déterminées.

Environ 10 mg de poudre végétale et 60 mg de poudre de sol sont pesés exactement dans des nacelles en étain. Pour les échantillons de soude, 2mg de précipité de SrCO_3 sont placés dans les nacelles en étain.

L'abondance A est le rapport en pourcentage de l'isotope donné à l'ensemble des isotopes du même élément (Avicé, 1997).

L'abondance A_N est directement donnée par le spectromètre de masse. Elle correspond pour l'azote à :

$$A_N = \frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N}} \times 100$$

Pour le carbone 13, le spectromètre de masse fournit des valeurs en unités delta (δ) qui permettent de calculer le ratio $R = {}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C}$ de l'échantillon :

$$R = \left(\frac{\delta^{13}\text{C} \text{ échantillon}}{1000} + 1 \right) \times 0,0112372$$

Avec $R_{\text{PDB}} = {}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C} = 0,0112372$, valeur internationale de l'abondance ${}^{13}\text{C}$ de la bélemnite de Pee Dee (PDB) correspondant à 0 δ (0‰).

Dès lors, l'abondance (A_C) en ${}^{13}\text{C}$ de l'échantillon est calculé de la façon suivante :

$$A\% = \left(\frac{R \text{ échantillon}}{R \text{ échantillon} + 1} \right) \times 100$$

L'excès isotopique E est la différence entre l'abondance isotopique d'un échantillon et celle d'une référence. Des échantillons non marqués en carbone 13 et en azote 15 de chaque composé sont analysés afin de déterminer l'abondance naturelle. Ils sont analysés en spectrométrie de masse afin de déterminer l'abondance naturelle en ${}^{13}\text{C}$ et en ${}^{15}\text{N}$ ($A\%_{\text{AN}}$). Par conséquent,

$$E_C(\%) = A_C(\%) - A\%_{\text{AN}}$$

$$E_N(\%) = A_N(\%) - A\%_{\text{AN}}$$

Pour le carbone 13, nos dosages, réalisés sur des échantillons non marqués ayant subi le même traitement que les échantillons marqués, montrent que $A\%_{\text{AN}} = 1,106923$ dans les échantillons végétaux, $A\%_{\text{AN}} = 1,084038$ dans les échantillons de sol et $A\%_{\text{AN}} = 1,084016$

dans les échantillons de SrCO_3 issus des pièges à soude. Pour l'azote 15, $A\%_{\text{AN}} = 0,3663$ dans les échantillons végétaux (Avice, 1997) et $A\%_{\text{AN}} = 0,3708$ dans les échantillons de sol (Hogh-Jensen et Schjoerring, 2001).

D. CONTRIBUTION DU CARBONE NOUVELLEMENT ASSIMILÉ À LA RHIZODEPOSITION

Les graminées pérennes accumulent des réserves (fructanes notamment) à la base des talles et dans les racines (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999 a, b). Ces réserves sont remobilisées lors de la repousse printanière, après chaque coupe et contribuent également lors de la nuit à l'alimentation en C des puits. Par conséquent, le carbone circulant dans la plante provient non seulement des assimilats récents issus de la photosynthèse mais également de la remobilisation de ces réserves. Les mécanismes de mobilisation-remobilisation du carbone dans la plante et la part du carbone issu des réserves par rapport à celle du carbone récemment assimilé pour la repousse d'un organe par exemple sont maintenant bien connus, en raison de nombreux travaux d'écophysiologie de la plante entière sur ce thème (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999 a, b ; Johansson, 1993).

En revanche, on ignore encore largement quelle est la contribution du carbone issu de la remobilisation des réserves dans les transferts de carbone à la rhizosphère. Les études visant à quantifier la rhizodéposition s'intéressent au C récent et ignorent le C des réserves ou font l'hypothèse qu'il ne contribue pas significativement à l'efflux de C à la rhizosphère. Le carbone récemment assimilé par la plante constitue une part importante, mais certainement pas exclusive du carbone rhizodéposé (Meharg et Kilham, 1988). En déterminant les variations nycthémerales de la respiration rhizosphérique, Todorovic (2000) suggère que le C remobilisé à partir de l'amidon des feuilles contribue significativement à la rhizodéposition du maïs. Les études menées jusqu'à présent sur la rhizodéposition dans l'équipe « rhizosphère » se sont intéressées au carbone récent (par marquages courts au ^{14}C) ou au carbone sans distinction de son origine (C récent et/ou remobilisé). Il est souvent fait l'hypothèse que les flux de rhizodéposition sont composés majoritairement de C récemment assimilé par les feuilles, transporté aux racines et libéré de manière passive dans le sol. L'allocation des photoassimilats récents se fait majoritairement vers les jeunes axes racinaires (Matthew et Kemball, 1997). Ainsi on peut supposer que le carbone libéré au niveau des axes racinaires plus anciens correspond à du carbone plus anciennement assimilé par la plante. D'autre part il a été montré que la nature biochimique des exsudats était différente en fonction de leur origine le long du système racinaire (Jaeger *et al.*, 1999). La nature biochimique des rhizodépôts étant un facteur de structuration des micro-organismes rhizosphériques, le

fonctionnement de la rhizosphère s'en trouve ainsi influencé ce qui a pour conséquence possible une rétro-action sur la croissance et le développement de la plante. Pour cette raison, il est important de connaître la contribution à la rhizodéposition du carbone "ancien" et du carbone "récent".

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance de la contribution des assimilats récents à la rhizodéposition du ray grass cultivé sur du sol.

Pour cela, deux approches expérimentales ont été envisagées. La première repose sur l'utilisation de 2 sources de CO₂ ayant des abondances en ¹³C différentes ($\delta^{13}\text{C} = +200\text{‰}$ et $\delta^{13}\text{C} = -45\text{‰}$) permettant de réaliser un double marquage long des plantes et suffisamment discriminant pour pouvoir quantifier la contribution de la plante au carbone présent dans la rhizosphère. Il est impératif de choisir un sol présentant un historique de culture de plante de type C4, c'est à dire avec un $\delta^{13}\text{C}$ de sa matière organique avoisinant -12‰. Après les 2 marquages, en fonction de la signature isotopique d'un compartiment donné, on peut quantifier le carbone présent dans un compartiment donné préférentiellement composé de carbone issu du premier marquage ou de carbone issu du second marquage. Or, dans notre cas (ray grass cultivé sur sol), la signature isotopique du sol influence fortement celle des compartiments analysés et notamment au niveau de la rhizosphère (le C issu de la plante vient se « diluer » dans une masse importante de C de la matière organique du sol). Les calculs que nous avons effectués montrent que la discrimination n'est pas suffisante pour quantifier le processus dans le pas de temps imparti pour l'étude de la rhizodéposition (annexe 4). La deuxième approche consiste à enrichir les plantes en deux isotopes différents du carbone, par exemple ¹⁴C puis ¹³C successivement, pour marquer de manière différente le carbone ancien et le C récent (Schnyder, 1992 ; Deléens *et al.*, 1994 ; Gebbing *et al.*, 1999). Nous avons opté pour cette approche. Les contraintes étaient de pouvoir réaliser deux marquages longs consécutifs et de pouvoir analyser au spectromètre de masse l'abondance isotopique en ¹³C d'échantillons radioactifs (marqués au ¹⁴C). Ceci a été possible en envoyant les échantillons à analyser au laboratoire Isotopes de l'Université de Davis en Californie (USA).

Ainsi, un premier marquage long des plantes au ¹⁴CO₂ permet de tracer le carbone ancien, puis un second marquage long au ¹³CO₂ permet de tracer le carbone plus récemment assimilé par la plante. Ainsi, dès le début du second marquage long, on peut: i) déterminer l'origine du carbone libéré par les racines (¹⁴C ou ¹³C), ii) établir une cinétique de libération du carbone dans le sol iii) quantifier la contribution des 2 isotopes au flux de respiration rhizosphérique.

I. Matériel et méthodes

1.1. Conditions de culture

1.1.1. Le sol

Le sol a été collecté sur un dispositif expérimental de terrain installé au domaine du Lycée agricole du Rheu en Bretagne (35) sur lequel l'équipe avait une expérimentation en cours (Action "Porcherie Verte"). Ce sol, composé de 18% d'argile, 23% de limon fin, 42% de limon grossier, 10% de sable fin et 7% de sable grossier, permet de collecter facilement les racines et de séparer le sol adhérent du reste du sol. Le pH de ce sol est de 6,4.

1.1.2. Les plantes

Des graines de ray grass (*Lolium perenne*) c.v. Canasta sont mises à germer sur papier filtre humide dans des boîtes de Pétri. Quatre jours plus tard, les plantules sont repiquées dans des tubes en PVC de 10 cm de hauteur et 6 cm de diamètre, rempli de sol à une densité de 1,3 kg.L⁻¹ (soit 308 g de sol sec). Quarante huit tubes sont mis en culture. Afin d'assurer la reprise d'au moins une plantule, 3 plantules sont repiquées par pot. Une fois la reprise d'au moins une plantule assurée, les deux autres sont éliminées.

1.2. Dispositif expérimental

1.2.1. Dispositifs de culture

Chaque dispositif est constitué de 2 compartiments. Un premier compartiment dit "compartiment racines" est le tube en PVC dans lequel les plantes ont été mises à germer. Un couvercle en PVC (percé en son milieu pour permettre le passage de la plante) est soudé à la partie supérieure. Ainsi, l'atmosphère du compartiment "racines" peut être isolée hermétiquement de l'atmosphère des parties aériennes afin de balayer ce compartiment par un flux d'air pour les mesures de la respiration rhizosphérique lors des marquages. Un second compartiment en PVC dit "compartiment rhizosphère" (5cm de hauteur, 6cm de diamètre, rempli exactement de 154 g de sol sec, à même densité que le précédent) est emboîté dans la

partie inférieure du compartiment racine à l'aide d'un collier (Figure 13). Une toile en nylon (Nytrel TI 45, Sefar Fyltis, France) d'une maille de $1\mu\text{m}$, permet de maintenir les échanges gazeux, et de solution de sol tout en empêchant les racines et les hyphes mycéliens des mycorhizes d'explorer le compartiment 'rhizosphère'. Les deux compartiments sont ensuite scellés avec du mastic souple (Térostât, ruban de Normandie) (Figure 13). Le système racinaire de la plante repiquée dans le compartiment "racines" forme un tapis racinaire au contact de la toile et influence, de part la libération de composés organiques et de modifications physico-chimiques et biologiques, une zone de sol dans la partie supérieure du compartiment rhizosphère. Cette zone en contact, au travers de la toile de nylon, avec les racines de la plante sera définie arbitrairement comme du sol rhizosphérique sur une épaisseur de 5mm.

A la récolte, tout le sol du compartiment racine sera considéré comme du sol adhérent aux racines du fait de la colonisation importante de ce compartiment par le système racinaire.

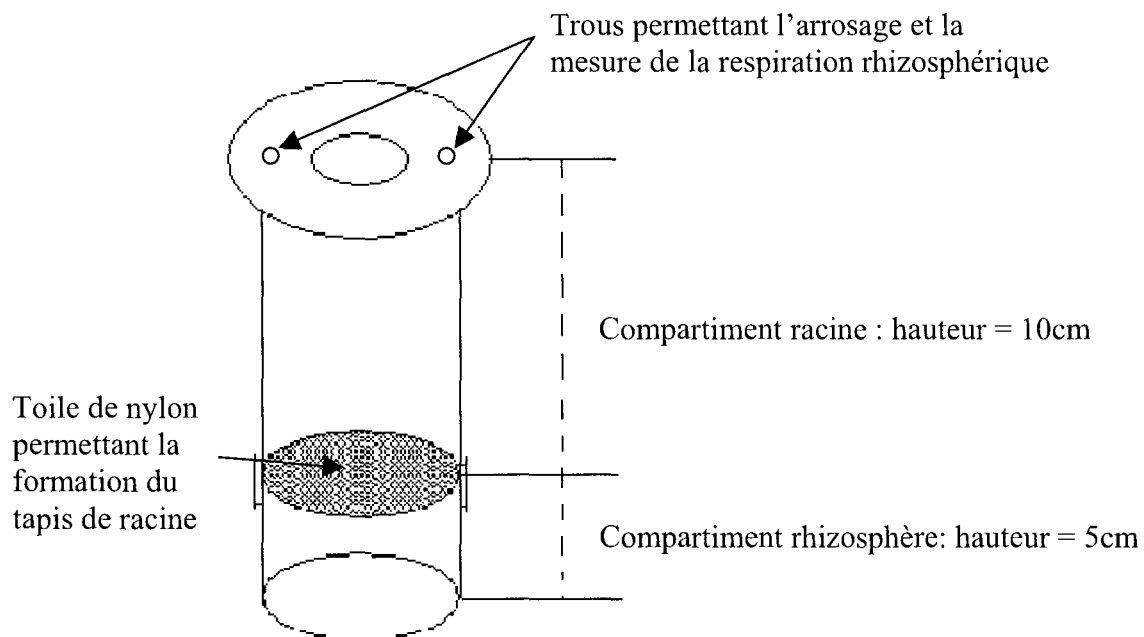


Figure 13 : Schéma d'un dispositif de culture, constitué de deux compartiments en PVC s'emboîtant l'un dans l'autre grâce à un collier en PVC de plus gros diamètre. Ces 2 compartiments sont séparés par une toile de nylon de maille $1\mu\text{m}$ n'autorisant pas les racines à pénétrer dans le compartiment inférieur mais permettant la diffusion des composés organiques libérés par les racines. La partie supérieure est définie comme étant le compartiment « racine », la partie inférieure comme le compartiment « rhizosphère ».

1.2.2. Culture des plantes

Après avoir été repiquées, les plantes sont cultivées pendant 28 jours en phytotron (Photographie 3). Les conditions environnementales de culture sont les suivantes : 14h de photopériode, 22°C et une intensité lumineuse de $360\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$. Deux jours après le repiquage, l'humidité de chaque compartiment est ajustée à 60% de la capacité au champ avec une solution nutritive N, P, K de Hoagland (équivalent à 270 kg N.ha^{-1} , 95 kg P.ha^{-1} et 172 kg K.ha^{-1} sous forme de Na_2HPO_4 , KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Les plantes sont ensuite arrosées régulièrement avec de l'eau distillée de manière à maintenir l'humidité du sol constante (60% de la capacité au champ (Annexe 5).

Après 28 jours de culture en phytotron, la formation d'un tapis de racines sur la toile de nylon du compartiment « racines » est vérifiée (Photographie 4). Quatorze plantes, présentant le même niveau de développement, sont alors sélectionnées et transférées dans la chambre de marquage. Les conditions climatiques dans la chambre de marquage sont fixées et régulées de manière identique à celles dans le phytotron de croissance. La pression partielle en CO_2 dans la chambre est régulée à 36Pa pCO_2 par un analyseur infra-rouge (ADC 225 MKIII) couplé à un régulateur de débit massique.

1.3. Marquage long des parties aériennes au ^{14}C et au ^{13}C et récolte

Les modalités de marquage sont décrites dans le chapitre 'Matériels et Méthodes'. La figure 14 décrit les différentes étapes de l'expérimentation.

Deux marquages longs consécutifs (le premier au ^{14}C , le second au ^{13}C), chacun d'une durée de 10 jours, sont effectués. Après avoir mesuré l'assimilation nette de CO_2 des plantes lors de leur mise en place dans l'enceinte de marquage, l'activité spécifique ^{14}C de l'atmosphère est ajustée à 4 KBq mg C^{-1} . Pour le ^{13}C , l'excès isotopique en ^{13}C est fixé à 5% (5 atom % ^{13}C en excès).

L'ensemble des paramètres de marquage est régulé pendant la photopériode. Pour permettre l'arrosage des plantes à 60% de la capacité au champ, l'enceinte est ouverte tous les deux jours en fin de nuit après la purge du $^{14}\text{CO}_2$ ou du $^{13}\text{CO}_2$ présent dans l'enceinte sur un piège à chaux sodée. Une fois l'arrosage effectué, l'enceinte est refermée et le marquage est de nouveau mis en place selon le protocole décrit en 'Matériels et Méthodes'. Lors des 4 premiers

jours de marquages au ^{13}C , la chambre est purgée à la fin de chaque nuit afin d'éviter une ré-assimilation par les feuilles du ^{14}C susceptible d'avoir été respiré par les plantes.

Après les 10 jours de marquage au ^{14}C , 7 plantes sont récoltées afin de déterminer la répartition du ^{14}C . Les 5 premiers mm de sol au contact des racines de chaque compartiment 'rhizosphère' sont séparés du reste du sol.

Pour chaque plante restante, le compartiment "rhizosphère" est remplacé par un compartiment "rhizosphère" issu d'un dispositif similaire avec une plante cultivée en phytotron et conduite de la même manière que celle dans l'enceinte de marquage.

La substitution, à des intervalles de temps réguliers (3, 6, 8 et 10 jours après le début du marquage au ^{13}C), des compartiments « rhizosphère » et des pièges à soude (NaOH 1M) permet d'estimer la proportion $^{14}\text{C} / ^{13}\text{C}$ libéré par le tapis racinaire retrouvée dans les 5 premiers mm de sol du compartiment « rhizosphère », ainsi que les quantités d'isotopes et la proportion $^{14}\text{C} / ^{13}\text{C}$ retrouvée dans la respiration rhizosphérique. Ainsi, une cinétique d'allocation de C marqué à la rhizosphère ainsi qu'une cinétique de la respiration rhizosphérique peuvent être établies.

A la fin du second marquage, les 7 plantes sont récoltées.

Le carbone de la biomasse microbienne du compartiment racine et du compartiment rhizosphère est mesuré. Dans le compartiment rhizosphère les 5 premiers mm de sol sont échantillonnés séparément du reste du compartiment, permettant de détecter un éventuel « effet rhizosphère » induit par le tapis racinaire au travers la toile de nylon.

1.4. Expression des résultats

Afin de quantifier les isotopes ^{13}C et ^{14}C provenant du premier marquage et du second marquage, des unités comparables et quantitatives pour le ^{14}C et pour le ^{13}C doivent être utilisées. Les activités en ^{14}C exprimées en KBq et les excès isotopiques en ^{13}C exprimées en atom % sont converties en mg de ^{14}C et de ^{13}C (Johansson, 1993 ; Crawford *et al.*, 2000).

Ainsi pour le ^{14}C , les quantités de ^{14}C dans chaque compartiment sont calculées en faisant le rapport entre l'activité en ^{14}C en KBq et l'activité spécifique (AS) de l'atmosphère pendant le marquage (fixée à 4KBq mg C^{-1}).

$$^{14}\text{C (mg)} = \frac{^{14}\text{C (KBq)}}{\text{AS atmosphère (KBq.mgC}^{-1}\text{)}}$$

L'abondance naturelle en ^{13}C du sol et des plantes est mesurée sur une série de plante non marquées cultivées en phytotron dans les mêmes conditions que les plantes marquées. Ainsi, les excès isotopiques ^{13}C peuvent être calculés.

Les quantités en ^{13}C dans chaque compartiment sont calculées en faisant le rapport entre la quantité de ^{13}C dans un compartiment et l'excès isotopique de l'atmosphère pendant le marquage (5 atom % en excès).

$$^{13}\text{C} \text{ (mg)} = \frac{(\text{Atom \% } ^{13}\text{C} \text{ en excès d'un compartiment donné}) \times (\text{masse totale de C du compartiment (mg)})}{\text{Atom \% } ^{13}\text{C} \text{ en excès de l'atmosphère}}$$

Les données de répartition du carbone 13 dans le système plante-sol sont exprimées en % de la masse totale de carbone 13 retrouvée dans le système.

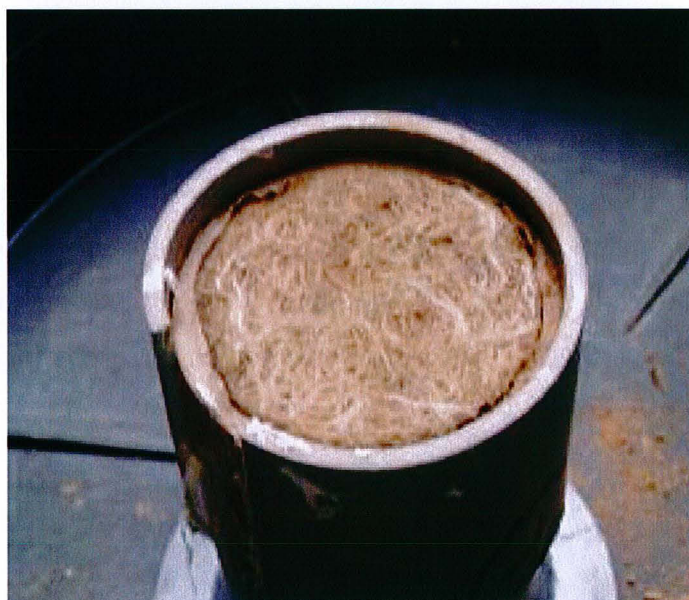
$$\%T \text{ } ^{13}\text{C} \text{ retrouvé} = \frac{\text{Masse de } ^{13}\text{C} \text{ dans un compartiment donné en mg}}{\text{Masse totale de } ^{13}\text{C} \text{ dans le système en mg}} \times 100$$

1.5. Analyses statistiques

Les données sont analysées suivant un modèle en randomisation totale, avec six répétitions. Des analyses de variances sont effectuées grâce au logiciel JMP IN[®], SAS institute. Les différences sont considérées comme significatives à 5%. Sur les figures, les barres verticales correspondent à 2 intervalles de confiances de la moyenne.



Photographie 3 : Plantes cultivées pendant 28 jours en phytotron et placées dans l'enceinte de marquage.



Photographie 4 : Le pot a été retourné et la toile de nylon découpée afin d'observer le tapis de racine formé sur la toile de nylon à l'interface entre le compartiment racine et le compartiment rhizosphère.

II. Résultats

2.1. Production de biomasse

Entre la fin du premier marquage (^{14}C) et la fin du second marquage (^{13}C), la production de biomasse totale des plantes augmente de 244% ($P < 0,001$, Figure 15, Tableau 3). La répartition de biomasse entre les parties aériennes et les racines (ratio PR/PA) reste la même entre les deux dates de récolte ($P = 0,167$).

Statistiques	valeur de F	Proba
Parties aériennes	109	<0,001
Racines	26	<0,001
Totale	99	<0,001
PR/PA	2,41	>0,05

Tableau 3: Analyses statistiques de la production de biomasse (parties aériennes, racines et totale) et du ratio de biomasse PR/PA des plantes récoltées à la fin du premier (^{14}C) et à la fin du second marquage (^{13}C). Seuil de significativité 5% ; $n=7$.

2.2. Répartition du carbone dans la plante et dans le sol

2.2.1. Répartition du carbone à la fin de chaque marquage : ^{14}C lors du premier marquage et ^{13}C lors du second marquage

La répartition du carbone dans les plantes reste la même aussi bien après le premier marquage qu'après le second marquage ($P=0,339$ et $P=0,505$ respectivement pour les parties aériennes et les racines). De même, globalement, l'allocation de carbone au sol (sol du compartiment racine + sol du compartiment rhizosphère + respiration rhizosphérique) est comparable entre les deux dates de récoltes ($P=0,354$) ; (Figure 16, Tableau 4).

Statistiques	valeur de F	Proba
Parties aériennes	1,00	0,339
Racines	0,47	0,505
Sol	0,94	0,354

Tableau 4: Analyses statistiques de la répartition du ^{14}C à la fin du premier marquage et du ^{13}C à la fin du second marquage dans les parties aériennes, les racines de la plante et le sol (sol adhérent des compartiments racines et rhizosphères, le sol non adhérent du compartiment rhizosphère et la respiration rhizosphérique) Seuil de significativité 5% ; $n=7$.

2.2.2. Répartition du carbone 13 et du carbone 14 à la fin du second marquage

A la fin du second marquage (^{13}C), une proportion plus importante de carbone 13 que de carbone 14 est retrouvée dans les parties aériennes ($P=0,004$). En revanche, proportionnellement moins de carbone 13 que de carbone 14 est alloué aux racines ($P=0,009$) et au sol ($P=0,004$) (Figure 16 et Tableau 5).

Statistiques	valeur de F	Proba
Parties aériennes	14,00	0,004
Racines	10,25	0,009
Sol	13,16	0,004

Tableau 5: Analyses statistiques de la répartition du ^{14}C et du ^{13}C à la fin du second marquage dans les parties aériennes, les racines de la plante et le sol (sol adhérent des compartiments racines et rhizosphères, le sol non adhérent du compartiment rhizosphère et la respiration rhizosphérique) Seuil de significativité 5% ; $n=7$.

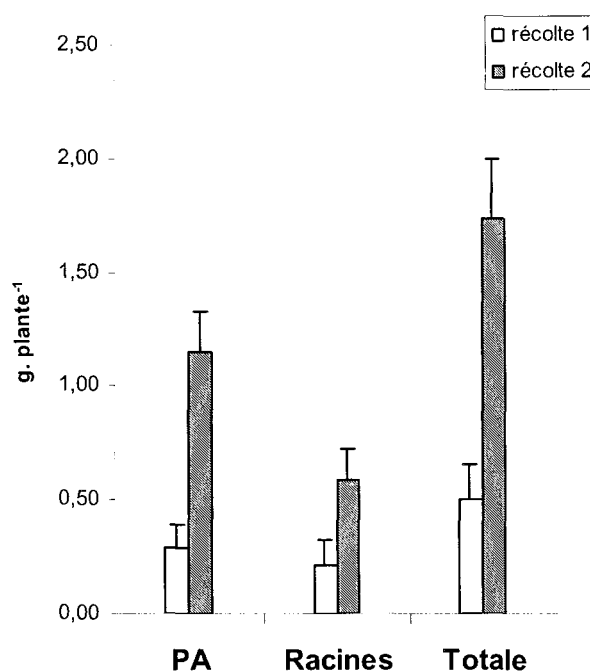


Figure 15: Production de biomasse (Parties aériennes PA, racines, biomasse totale exprimées en $\text{g} \cdot \text{plante}^{-1}$) des plantes récoltées à la fin du premier (récolte 1, ^{14}C) et à la fin du second marquage (récolte 2, ^{13}C).

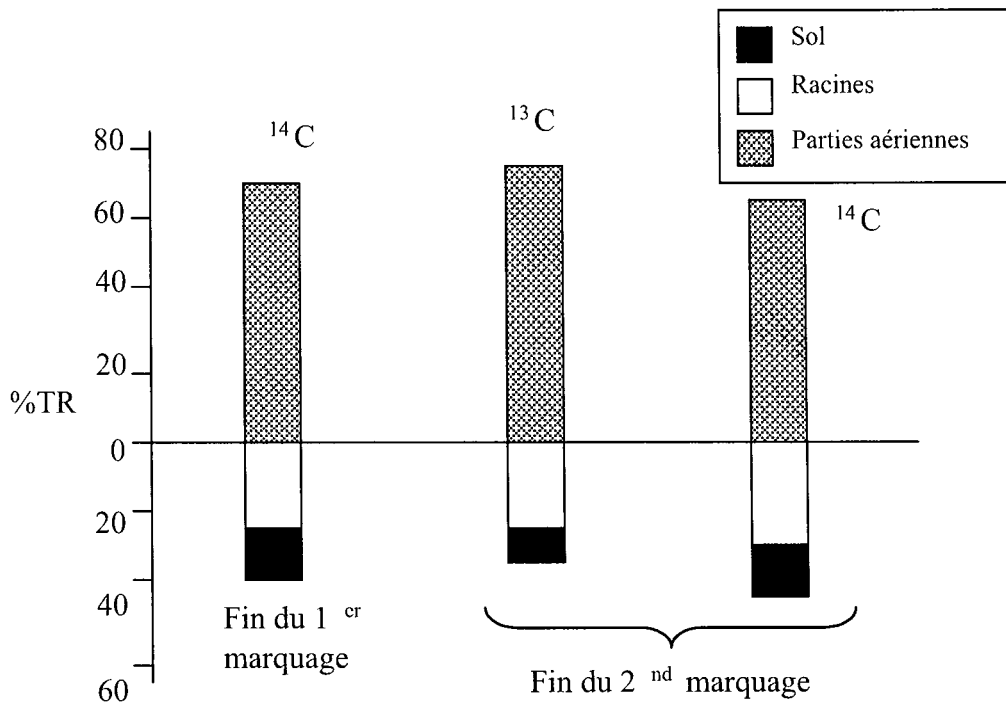


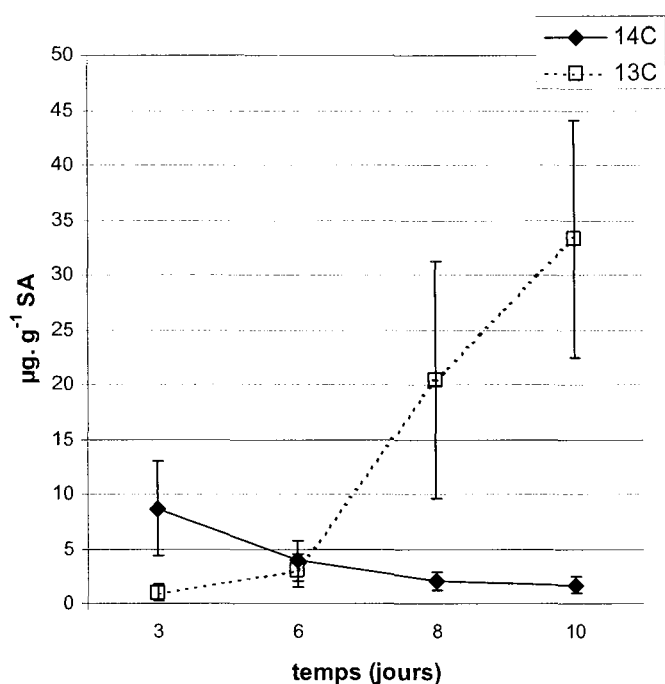
Figure 16 : Répartition du ^{14}C à la fin du premier marquage ainsi que du ^{13}C et du ^{14}C à la fin du second marquage dans la plante et le sol. Les résultats sont exprimés en % total retrouvé.

2.3. Contribution des deux sources de carbone à la rhizodéposition

Le prélèvement régulier des compartiments "rhizosphère" pendant le second marquage permet d'établir une cinétique de libération du carbone dans le sol adhérent. Jusqu'au prélèvement effectué 6 jours après le début du marquage ^{13}C , plus de composés organiques- ^{14}C que ^{13}C sont libérés dans le sol ($P < 0,001$). Trois jours après le début du marquage au ^{13}C , le carbone marqué présent dans le compartiment rhizosphère est composé de 9 % de ^{13}C et de 91 % de ^{14}C . A 6 jours, on retrouve 40 % de ^{13}C et 60 % de ^{14}C . Au delà du 6^{ème} jour de marquage, la quantité de ^{13}C libérée par les racines devient plus importante que la quantité de ^{14}C ($P = 0,003$ à 8 jours). Lors du dernier prélèvement, soit 10 jours après le début du marquage ^{13}C , 94 % du carbone marqué présent dans le sol adhérent du pot inférieur est du carbone 13, les 6 % restants étant du carbone 14 ($P < 0,001$) (Figure 17 et Tableau 6).

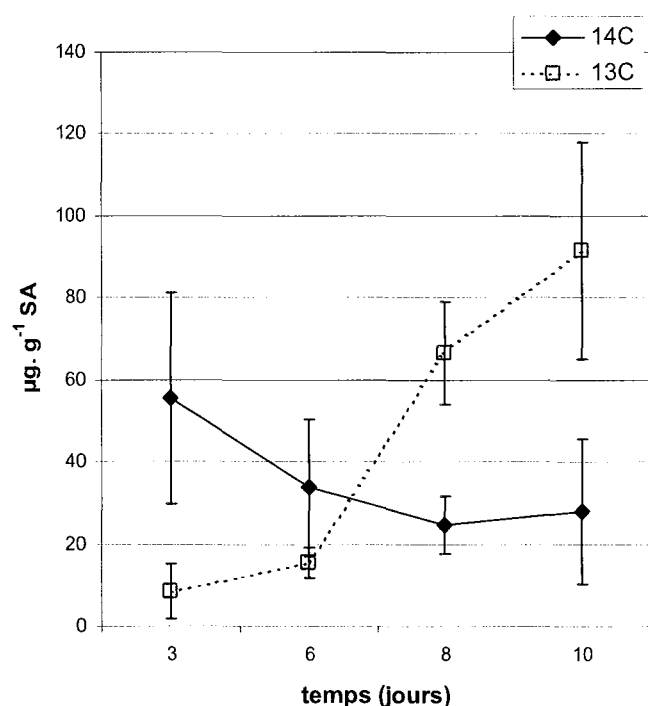
Le remplacement régulier des pièges à soude au cours du second marquage (au ^{13}C) permet de quantifier la part de ^{14}C et ^{13}C retrouvé dans la respiration rhizosphérique, la respiration rhizosphérique incluse une fraction du C rhizodéposé (Figure 18 et Tableau 7). Jusqu'au 6^{ème} jour après le début du marquage ^{13}C , les quantités de ^{14}C retrouvées dans la respiration rhizosphérique dépassent celles du ^{13}C ($P < 0,001$ à 3 jours et $P = 0,035$ à 6 jours). Trois jours

après le début du marquage au ^{13}C , la respiration rhizosphérique est composée pour 86% de ^{14}C et 13% de ^{13}C . A six jours, les proportions passent à 60 % de ^{14}C et 40% de ^{13}C . En revanche, 8 jours après le début du marquage, plus de ^{13}C que de ^{14}C est retrouvé dans la respiration rhizosphérique ($P=0,011$). A la fin du marquage, soit 10 jours après le début du marquage, la respiration rhizosphérique est composée à 81% par du ^{13}C et à 19 % par du ^{14}C .



Statistiques	Valeur de F	Proba
3 Jours	54	<0,001
6 Jours	3,23	0,102
8 Jours	14	0,003
10 Jours	41	<0,001

Figure 17 et Tableau 6: La figure représente la cinétique de libération du ^{14}C et du ^{13}C dans le sol adhérent du compartiment rhizosphère (exprimé en μg de C marqué par g de sol adhérent) à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les barres verticales représentent les intervalles de confiance. Le tableau présente les valeurs statistiques issues de la comparaison des masses de ^{14}C et de ^{13}C libérées par les racines à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les différences sont significatives à 5 %. $n=7$.



Statistiques	Valeur de F	Proba
3 Jours	28	<0,001
6 Jours	6,2	0,031
8 Jours	40	<0,001
10 Jours	7,5	0,02

Figure 18 et Tableau 7: La figure représente la cinétique de l'allocation du ^{14}C et du ^{13}C à la respiration rhizosphérique (exprimé en μg de C marqué par g de sol adhérent) à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les barres verticales représentent les intervalles de confiance. Le tableau présente les valeurs statistiques issues de la comparaison des masses de ^{14}C et de ^{13}C allouées à la respiration rhizosphérique à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les différences sont significatives à 5 %, $n=7$.

2.4. Biomasse microbienne

La biomasse microbienne des 5 premiers mm de sol du compartiment rhizosphère n'est pas significativement différente des 45 mm de sol suivant pendant les 3 premiers jours du marquage au carbone 13. Dès le 6^{ème} jour, un effet rhizosphère significatif est mis en évidence ($P=0,011$; $P<0,001$ et $P<0,001$ respectivement après 6, 8 et 10 jours). La biomasse microbienne est plus importante dans les 5 premiers mm de sol du compartiment rhizosphère que dans les 45 mm suivants (Tableau 8). La biomasse microbienne du sol du compartiment racine n'est pas significativement différente de celle des 5 premiers mm de sol des compartiments rhizosphère prélevés 6, 8 et 10 jours après le début du marquage au ^{13}C ($P>0,5$; $142 \text{ mg C. kg}^{-1}$). Lors des 3 premiers jours de marquage, la biomasse microbienne est significativement plus importante dans le compartiment racine que dans le compartiment rhizosphère.

Jour de prélèvement du compartiment rhizosphère	C microbien du compartiment rhizosphère (mg C. kg^{-1})		Effet rhizosphère	
	SA	SNA	Valeur de F	Proba
0	44,5 (9,26)	50,6 (18,6)	0,35	0,568
3	86,8 (22,6)	74,9 (23,1)	0,25	0,627
6	96,8 (19,7)	64,4 (12,9)	9,03	0,011
8	175 (43,1)	95,6 (14,8)	17,1	<0,001
10	160 (19,3)	83,1 (15,4)	30,5	<0,001

Tableau 8 : Carbone microbien du sol adhérent (SA, 5 premiers mm de sol) et du sol non adhérent (SNA, 45mm de sol suivant) dans le compartiment rhizosphère 0, 3, 6, 8, 10 jours après le début du marquage au ^{13}C . La différence significative de biomasse entre SA et SNA correspond à l'effet rhizosphère. Il est significatif au seuil de 5% ($n=7$).

III. Discussion

La plupart des études visant à quantifier les flux de carbone vers la rhizosphère s'intéressent à la répartition du carbone récemment assimilé par la plante sans que l'on connaisse la contribution du carbone remobilisé à partir des pools de réserve. C'est pourquoi, nous avons établi un protocole expérimental visant à évaluer si la rhizosphère pouvait être alimentée significativement à partir de C plus anciennement fixé par la plante. Au-delà de ce questionnement scientifique, cette expérimentation avait pour objectif d'évaluer la faisabilité d'un double marquage sur plusieurs photopériodes consécutives, ce qui n'avait pas encore été réalisé dans le laboratoire.

3.1. Répartition du carbone dans la plante

Aussi bien après 38 jours qu'après 48 jours de croissance et malgré une augmentation de biomasse de 244%, l'allocation de carbone aux différents organes de la plante est identique. La répartition de biomasse est également similaire entre les deux récoltes puisque le ratio PR / PA n'est pas différent. Ainsi les parties aériennes et les racines ont un taux de croissance équivalent au cours du temps, malgré l'accroissement significatif de la biomasse de la plante. Ce schéma d'allocation est identique à celui obtenu dans d'autres expérimentations décrivant la répartition du carbone récemment assimilé dans la plante (Rattray *et al.*, 1995 ; Swinnen *et al.*, 1994a ; Johansson, 1992 ; Crawford *et al.*, 2000 ; Butler *et al.*, 2004). Cette stabilité de la répartition du carbone dans la plante était une condition nécessaire pour étudier les flux vers la rhizosphère. En effet, sur ces jeunes plantes au stade végétatif de croissance, une modification de l'allocation de carbone aux racines entre les 2 échantillonnages aurait pu signifier une limitation de la croissance du système racinaire par le dispositif de culture. En conséquence, la rhizodéposition aurait pu être affectée. Notre dispositif expérimental n'entraîne pas de limitation de la croissance de la plante et notamment du système racinaire. Les plantes étant au stade végétatif de croissance, il n'y a donc pas de réorientations majeures de C dans la plante comme cela peut être par exemple le cas lors de l'épiaison.

La répartition du carbone ^{14}C (admis comme étant du carbone plus anciennement assimilé) et du ^{13}C (admis comme étant du carbone plus récemment assimilé) dans les plantes lors de la récolte finale, c'est à dire à la fin du marquage au ^{13}C , montre que plus de carbone récent que de carbone ancien est retrouvé dans les parties aériennes et dans les racines. Les parties

aériennes et les racines des plantes présentent l'excès isotopique en ^{13}C le plus élevé de l'ensemble des compartiments analysés (Tableau 9). L'excès isotopique de la respiration rhizosphérique est proche de celui de la plante, alors que celui du sol des compartiments racine et rhizosphère (cumul des 4 compartiments prélevés au cours du marquage) est beaucoup plus faible. Ainsi, le carbone retrouvé dans la respiration rhizosphérique vient très probablement majoritairement de la respiration racinaire. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés très récemment par Thornton *et al.* (2004), sur des ray grass cultivés en hydroponie successivement dans deux atmosphères distinctes ayant des signatures isotopiques ^{13}C contrastées. Après le changement de la signature isotopique de l'atmosphère, la signature isotopique des parties aériennes des plantes évolue de manière linéaire vers celle de la nouvelle atmosphère.

Tableau 9 : Excès isotopique dans les différents compartiments de notre dispositif de culture (Parties aériennes des plantes, racines, sol adhérent (SA) du compartiment racine, sol rhizosphérique (SR) du compartiment rhizosphère) après 10 jours de marquage au carbone 13 avec un excès isotopique de 5 atom %.

	Excès isotopique (atom%)
Parties aériennes	1,330642
Racine	1,193525
SA Compartiment racine	0,017685
SR Compartiment rhizosphère	0,026447
Respiration rhizosphérique	1,311435

3.2. Contribution du carbone récemment assimilé à la rhizodéposition

Comme pour la répartition de la biomasse, la répartition du carbone récemment assimilé (en % du total retrouvé) dans la plante et le sol est restée la même pendant toute l'expérimentation. Seule la répartition entre compartiment racine et compartiment rhizosphère diffère. A la fin du premier marquage, le tapis racinaire n'étant pas encore complètement développé sur la toile, le C récent (^{14}C) est majoritairement retrouvé dans le compartiment « racine ». Ensuite, en raison du développement des racines sur la toile nylon qui sépare les 2 compartiments, le carbone récent (^{13}C) est majoritairement alloué au compartiment rhizosphère à la fin du second marquage.

Nos résultats permettent de mettre en évidence l'évolution de la quantité de carbone ancien (^{14}C) et de carbone récent (^{13}C) présente dans le compartiment rhizosphère et retrouvé dans la respiration rhizosphérique. En raison des précautions prises lors des arrosages, le carbone marqué retrouvé dans le compartiment rhizosphère ne peut pas être issu du lessivage de composés carbonés libérés dans le compartiment « racines ». En effet, l'arrosage a été effectué par capillarité depuis la base des pots de cultures lors de chaque échantillonnage des compartiments rhizosphère. Le C retrouvé dans le compartiment « rhizosphère » provient donc bien du tapis racinaire.

Contrairement à ce que nous attendions, plus de carbone anciennement assimilé (^{14}C) que de C récemment assimilé (^{13}C) est retrouvé dans le compartiment rhizosphère et la respiration rhizosphérique au début du second marquage. Ce n'est que 6 jours après le début du marquage au ^{13}C que la part de ^{13}C libérée par la plante dans le compartiment rhizosphère et dans la respiration rhizosphérique augmente et va constituer la majeure partie du carbone libéré par la plante et du C respiré. La quantité de carbone ancien libérée diminue ensuite et fini par se stabiliser. Cette fraction de carbone ancien correspond probablement pour partie à du carbone issu de la minéralisation de racines fines et de débris racinaires à proximité de la toile. La libération de carbone dans le sol par cette voie ayant lieu à une échelle de temps plus longue que celle de la rhizodéposition, on retrouve cette fraction de carbone ancien dans le pool de carbone libéré par la plante et dans la respiration rhizosphérique pendant plus longtemps que la fraction correspondant au carbone rhizodéposé. On ne peut cependant pas exclure une re-circulation dans la plante de carbone issu de composés plus anciens.

D'autre part, la quantité de C total libérée par le tapis racinaire dans le compartiment rhizosphère est largement accrue entre la fin du premier marquage et la fin du second marquage. Cet accroissement de la rhizodéposition est du à la fois à une augmentation de la biomasse racinaire pendant le second marquage, mais également à une contrainte subie par le système racinaire causée par la toile de nylon. En effet il est reconnu qu'une contrainte mécanique appliquée au niveau du système racinaire stimule la rhizodéposition (Groleau-Renaud, 1998).

Dans la même étude que celle citée plus haut, Thornton *et al.* (2004) montrent qu'après avoir changé la signature isotopique de l'atmosphère dans laquelle évoluaient les plantes, la signature isotopique du carbone libéré par les racines tend vers celle de la nouvelle atmosphère. Cette expérimentation réalisée en hydroponie stérile met en évidence des différences d'allocation du carbone nouvellement assimilé tout au long de la racine. Tout

comme Matthew et Kemball (1997), ils constatent que c'est au niveau des apex racinaires qu'une part importante du carbone récemment assimilé est retrouvée. Cette étude permettant de définir finement les sites d'exsudation est néanmoins menée en hydroponie stérile. Or il a largement été montré que les micro-organismes du sol influençaient significativement la rhizodéposition. Ainsi, les résultats de Thornton peuvent être biaisés par les conditions de culture des plantes. En revanche, notre étude est menée en conditions *in situ*, ce qui permet l'obtention de résultats réalistes. De plus la caractérisation du carbone libéré dans la rhizosphère se fait dans la zone de sol proche des apex racinaires, puisque le tapis racinaire peut être considéré comme étant formé de racines actives. Nos résultats sont par conséquent, cohérents avec ceux de Thornton *et al.* (2004).

Bien que du C de la plante soit alloué au compartiment rhizosphère dès le début du second marquage (^{13}C), ce n'est qu'à partir du 6^{ème} jour après le début de ce marquage qu'un effet rhizosphère significatif (biomasse microbienne stimulée sous l'action de la rhizodéposition) est observé dans les 5 premiers mm de sol. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : la plus probable est que le tapis racinaire n'était pas suffisamment développé pour pouvoir influencer le développement microbien, qui en retour peut stimuler la rhizodéposition. Une autre explication est le délai nécessaire pour que la biomasse microbienne se développe et que le développement soit suffisant pour être perceptible avec la technique de quantification de la biomasse microbienne qui n'est pas très sensible.

La littérature montre que le fonctionnement de la plante contribue à transférer une fraction importante du carbone assimilé directement vers les racines. En effet, d'une part le carbone nouvellement assimilé est majoritairement transporté sous forme soluble (saccharose), facilement allouée vers les racines et par conséquent rapidement exsudée (Mühling *et al.*, 1993), alors que le carbone ancien est incorporé dans les composés de structure insolubles ou stocké sous forme de macromolécules (fructane) pour lesquels il est difficile de traverser les membranes biologiques et par conséquent d'être rapidement transporté aux racines. D'autre part, les assimilats récents sont préférentiellement transférés vers les sites de division cellulaire et d'extension ayant une force de puits importante (Farrar *et al.*, 1995). Ces sites ne sont pas morphologiquement matures, la diffusion y est alors facilitée (Bret-Harte et Silk, 1994). De plus, les micro-organismes de la rhizosphère exercent également une force de puits importante, attirant le carbone de la plante. Le carbone constitue une source d'énergie pour les micro-organismes. Sa disponibilité va stimuler leur croissance et leur activité. Les micro-

organismes en retour stimulent la rhizodéposition et dans ce cas, c'est le carbone le plus rapidement disponible qui est prioritairement transféré à la rhizosphère et par conséquent rapidement disponible pour les micro-organismes.

Cette expérimentation a permis de valider la faisabilité de marquage long avec le matériel de marquage disponible au laboratoire. De plus, l'utilisation d'un isotope stable du carbone, le carbone 13, plus facile à manipuler que le carbone 14, est entièrement envisageable dans des études à venir concernant l'étude des transferts de carbone dans la plante et vers la rhizosphère. Le seul inconvénient réside dans le fait qu'il est impossible de contrôler l'activité spécifique de l'atmosphère de marquage pendant le marquage. Ce n'est qu'*a posteriori* que l'on peut vérifier si cette activité spécifique était conforme à ce qui avait été fixé comme étant adapté à l'expérimentation.

Notre travail ne permet pas de conclure quant à la contribution du C ancien et du C nouveau à la rhizodéposition. Le carbone 14 retrouvé dans le compartiment rhizosphère 3 jours après le début du marquage au carbone 13 peut-il véritablement être considéré comme du carbone ancien ? De même, après 8 jours de marquage au carbone 13, la part de carbone 13 retrouvée dans le compartiment rhizosphère peut provenir aussi bien du carbone 13 assimilé au début du marquage, soit 8 jours plus tôt, que du carbone 13 assimilé dans les heures précédant le prélèvement du compartiment rhizosphère. L'absence d'effet rhizosphère dans le compartiment rhizosphère durant les 6 premiers jours du marquage au ^{13}C est-elle due au faible développement du tapis racinaire ? Aurait-il été souhaitable de commencer les marquages isotopiques avec un tapis racinaire plus dense ? Dans ce cas de figure, une limitation du développement des racines et donc de la plante, affectant la libération de carbone par les racines se serait produite. De plus, dans ces conditions, une partie du C libéré pourrait provenir de la sénescence et de la minéralisation de racines anciennes dans le tapis racinaire. Ce flux de C non quantifiable est alors attribuable à la détritosphère et non plus à la rhizosphère. Il est ainsi primordial d'approfondir l'ensemble de ces points en améliorant ou modifiant notre dispositif d'étude.

Une première proposition consisterait à travailler dans des conditions de culture en hydroponie, en conservant la technique de double marquage (^{14}C , ^{13}C). Il serait alors plus facile de prélever les exsudats racinaires directement au niveau du système racinaire à des intervalles de temps réguliers afin de déterminer l'évolution de la proportion $^{14}\text{C} / ^{13}\text{C}$ des rhizodépôts.

Si on souhaite conserver des conditions de culture *in situ*, une seconde proposition consiste à réaliser un double marquage ^{14}C / ^{13}C sur des pots de culture. Après le début du second marquage, des prélèvements successifs permettront d'analyser l'évolution de la quantité de ^{14}C et de ^{13}C retrouvée dans le sol adhérent aux racines.

Les modalités de marquage peuvent être également modifiées et simplifiées. Le marquage long des plantes au ^{14}C est conservé afin de tracer le C des réserves de la plante. Immédiatement après la fin de ce marquage long, un marquage court au ^{13}C est alors réalisé sur une partie des plantes issues du premier marquage. D'autres marquages courts consécutifs sur des plantes restantes permettraient de caractériser l'évolution de la proportion C anciennement / C nouvellement libéré par les racines.

Un suivi de la dynamique des réserves et de leur activité ^{14}C ou abondance ^{13}C permettra de déterminer la contribution des réserves au pool de C libéré par les racines.

IV. Conclusion

Le C ancien contribue significativement à la rhizodéposition. Néanmoins la proportion de C ancien par rapport au C nouveau libéré par les racines n'est pas déterminée. Il est difficile de dire si le ^{13}C libéré par les racines est toujours du C nouveau 6 jours après le début du marquage au ^{13}C . En revanche, notre travail montre qu'un effet rhizosphère apparaît dans le compartiment rhizosphère et que la libération de ^{13}C par les racines augmente très fortement à partir du 6^{ème} jour après le début du marquage au ^{13}C . Le ^{14}C restant correspond à du C issu soit du renouvellement racinaire soit de la remobilisation du C des réserves. L'absence d'effet rhizosphère est probablement due au fait que le tapis racinaire n'était pas suffisamment développé au début du marquage ^{13}C pour pouvoir influencer le compartiment rhizosphère et permettre une libération suffisante de ^{13}C dans ce compartiment. Cette étude doit être approfondie afin de mieux caractériser la contribution du C ancien et du C récent à la rhizodéposition.



Photographies 5 et 6 : Vue d'un anneau enrichi du dispositif FACE Suisse. On peut distinguer la présence de buse permettant la diffusion du CO_2 au-dessus de la parcelle ainsi que la présence de capteurs de la concentration en CO_2 , de la vitesse du vent et de la température.



E. CONSEQUENCES DE L'ELEVATION DE LA CONCENTRATION EN CO₂ ATMOSPHERIQUE SUR LA REPARTITION DES PHOTO-ASSIMILATS RECENTS ET LA RHIZODEPOSITION CHEZ *LOLIUM PERENNE*

L'enrichissement de la concentration en CO₂ de l'atmosphère accroît la disponibilité en carbone pour la plante car il en résulte le plus souvent une stimulation de l'activité assimilatrice des feuilles sources (Rogers *et al.*, 1998). Si le concept des relations sources-puits est étendu à la rhizosphère, les entrées de carbone dans le sol notamment par le biais de la rhizodéposition sont à leur tour modifiées. Beaucoup d'études ont montré les conséquences de l'élévation du CO₂ sur les transferts de carbone dans le système plante-sol-micro-organismes en conditions contrôlées. Néanmoins en conditions naturelles ou semi-naturelles, peu de données sont disponibles concernant l'étude des transferts de carbone récemment assimilé par la plante, vers le sol en ayant intégré plante, sol et micro-organismes. De même, d'un point de vue plus environnemental, la contribution de la rhizosphère à la dynamique de la matière organique dans le sol après une longue période d'exposition de ce sol à une atmosphère enrichie en CO₂ est ni comprise, ni quantifiée.

Le dispositif FACE (Free Air Carbon dioxide Enrichment) de l'ETH de Zürich (Suisse) est un écosystème prairial à gestion agronomique intensive, sous régime de fauche (Hebeisen *et al.*, 1997), ayant un historique d'enrichissement en CO₂ de 9 années consécutives (Photographies 5 et 6). Ce site unique a servi de support à notre étude car nous souhaitons étudier les conséquences de l'élévation des concentrations en CO₂ de l'atmosphère sur la répartition des photoassimilats récents dans la plante, la rhizodéposition et le devenir de ces photo-assimilats dans le sol avec un réalisme agronomique et écologique.

Ce type de dispositif a été développé au début des années 90 pour mieux comprendre, en conditions de plein champ, les réponses des plantes et des couverts végétaux à l'augmentation atmosphérique en CO₂ (photosynthèse, production et répartition de biomasse...). A partir des premiers résultats, on s'est rendu compte que les déterminismes des réponses des plantes se situaient au niveau des interactions entre la plante, le sol, les micro-organismes et la faune du sol. Il est apparu notamment qu'une partie du surplus de C assimilé en réponse à l'augmentation de CO₂ n'était pas retrouvé dans la biomasse végétale. Il a été notamment fait l'hypothèse qu'une fraction du carbone assimilé était transporté vers le sol et qu'il était

nécessaire de déterminer quel flux de C était à l'origine de ce défaut de bilan. Dans le même temps, les travaux ne montraient aucun accroissement des concentrations en carbone dans le sol lorsque l'atmosphère est enrichie en CO₂. Ainsi des attentes sont apparues visant à quantifier les transferts de composés organiques de la plante au sol, et à déterminer les conséquences du fonctionnement rhizosphérique sur le devenir de ces composés dans le sol. Jusqu'à présent, les effets de l'élévation du CO₂ sur la rhizodéposition en conditions de plein champ ne sont que suppositions; aucune étude n'a formellement caractérisé les conséquences d'un enrichissement en CO₂ sur la rhizodéposition.

Dans ce contexte, nos objectifs sont d'évaluer :

- i. les conséquences de l'élévation des concentrations en CO₂ atmosphérique sur la rhizodéposition chez de jeunes plantes de ray grass. Les plantes ayant poussé sur le dispositif FACE ont été ramenées au laboratoire en vue de suivre les transferts de C et de N des parties aériennes vers les racines et la rhizosphère par traçage isotopique au ¹⁴C et ¹⁵N ;
- ii. l'influence, sous CO₂ élevé, de la fertilisation azotée sur la rhizodéposition;
- iii. la vitesse de minéralisation du carbone récent et du carbone total présent dans la rhizosphère ;
- iv. la concentration en carbone total du sol après 9 années d'enrichissement en CO₂.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans *Soil Biology and Biochemistry*.

Bazot S., Ulff L., Blum H., Nguyen C., Robin C. (2005). Effects of elevated CO₂ concentration on rhizodeposition of *Lolium perenne* grown on soil exposed to 9 years of CO₂ enrichment. *Soil Biology and Biochemistry*, sous presse.

I. Matériels et méthodes

1.1. Dispositif expérimental

Le dispositif FACE Suisse était situé à la station expérimentale de l'ETH de Zurich à Eschikon (Photographies 5 et 6). Le premier enrichissement en CO₂ de l'atmosphère date du 31 Mai 1993 et il a été mis fin aux enrichissements à l'automne 2003.

Lors de notre expérimentation en 2002, le dispositif présentait un historique de 9 années d'enrichissement en CO₂. Le sol, désigné comme un sol argilo-limoneux, est composé à 28% d'argile, 33% de limon et 36% de sable. Les valeurs de pH du sol sont comprises entre 6,5 et 7,6 (Hebeisen *et al.*, 1997). Ce dispositif est composé de trois blocs, formés chacun de deux anneaux : un anneau soumis à l'atmosphère ambiante en CO₂ (à environ 36Pa pCO₂) et un anneau enrichi (à environ 60Pa pCO₂). La source de dioxyde de carbone utilisée pour l'enrichissement de l'air est d'origine pétrochimique. L'enrichissement a lieu quotidiennement pendant la photopériode, de mars à octobre. L'émission de CO₂ est régulée en fonction de la vitesse et de l'orientation du vent.

Chaque anneau comporte, entre autres, des monocultures de ray grass (parcelles de 2,8 X 1,9 m) *Lolium perenne* cv Bastion. Chacune de ces parcelles est divisée en 2 parties, l'une soumise à un apport annuel d'azote de 14 g. m⁻² a⁻¹, l'autre à un apport élevé (56 g m⁻² a⁻¹), sous forme de NH₄NO₃. La quantité d'engrais est apportée annuellement dans les proportions suivantes : 30%, 20%, 20%, 15%, 15% depuis la première fauche (début juin) jusqu'à la cinquième et dernière fauche (début octobre).

1.2. Mise en place de l'essai

Notre intention au départ était d'utiliser des plantes en place dans le couvert végétal des anneaux FACE, ayant été soumis à l'augmentation du CO₂ atmosphérique pendant 9 années. Une discussion avec les gestionnaires du dispositif et une visite préalable de terrain nous ont orientés vers un repiquage de plantules de ray grass *Lolium perenne* cv Bastion sur le dispositif FACE. Les raisons sont les suivantes :

- une difficulté d'individualiser des plantes dans le couvert végétal en place
- une hétérogénéité de la densité du couvert et de la taille des plantes.

Des graines sont mises à germer au préalable en serre, permettant d'obtenir des plantes au même stade de croissance lors du repiquage. Ces jeunes plantes présenteront une croissance active, produisant de nombreuses tiges. Ainsi, les flux de carbone dans ces plantes seront conséquents, du fait d'un métabolisme important. Les plantules sont transplantées sur le dispositif, racines nues, 35 jours après le semis. Le repiquage a lieu dans des monolithes de sol non perturbé, individualisés en enfonçant dans le sol des cylindres en PVC (diamètre : 8cm ; hauteur : 20cm). Les plantules sont repiquées le 19 avril pour l'échantillonnage du printemps et le 10 juillet pour l'échantillonnage d'automne dans les anneaux ambiants et les anneaux enrichis en CO₂. Le sol des anneaux FACE est hétérogène (structure, présence de cailloux...), souvent peu profond; l'horizon minéral (H2) est présent parfois dès 20 cm de profondeur. Par conséquent, la majorité des racines de ray grass évoluent dans les 20 premiers cm de sol. En raison de la présence de zones sans plantes en sortie d'hiver, il a été possible d'enfoncer les cylindres de PVC entre les plantes en place. Ainsi, le sol soumis à l'enrichissement pendant 9 ans n'a pas été perturbé par la mise en place de l'essai. Les jeunes plantes sont soumises pendant leur développement à la compétition pour la lumière comme les autres plantes déjà présentes sur la parcelle.

Les effets de l'enrichissement en CO₂ sont analysés en début et en fin de la saison de croissance. Les deux dates de prélèvements correspondent à des conditions climatiques contrastées et à un fonctionnement des plantes influencé par les défoliations et les fertilisations au cours de la saison de croissance. Quarante huit plantes sont récoltées au printemps (14 Juin, après 56 jours d'exposition au CO₂) et 48 plantes sont récoltées à l'automne (27 Septembre, après 79 jours d'exposition au CO₂). Les plantes récoltées au printemps ont été soumises à une seule défoliation suivie d'un apport d'azote (30% d'apport annuel), alors que les plantes prélevées à l'automne ont été soumises à 3 défoliations et à 4 apports d'azote (85% de l'apport annuel).

Immédiatement après chacun des 2 prélèvements, les plantes et leur monolithe de sol sont ramenés au laboratoire à Nancy où des marquages isotopiques au carbone 14 et à l'azote 15 sont réalisés. Les plantes des anneaux enrichis sont marquées séparément des plantes des anneaux ambiants afin d'établir la pression partielle en CO₂ correspondante (36 ou 60 Pa).

Nous avons opté pour un marquage au laboratoire plutôt que sur le terrain car la régulation des paramètres climatiques et de marquage est une nécessité si l'on souhaite étudier l'allocation de carbone récent aux compartiments rhizosphériques. Cette dernière est en effet fortement influencée par l'état physiologique de la plante. Une perturbation du métabolisme

causée par une variable climatique influence les flux de carbone dans la plante et à la rhizosphère. Cette régulation n'était pas envisageable sur le terrain, compte tenu du nombre de plantes impliquées. Après le transport (environ 6 heures), et dans l'attente du marquage au ¹⁴C, les plantes sont immédiatement placées dans des serres où la concentration en CO₂ correspond à celle observée sur le terrain. Les plantes issues des anneaux ambiants sont placées dans des serres ambiantes et les plantes issues des anneaux enrichis sont placées dans des serres où l'atmosphère est enrichie en CO₂.

1.3. Marquage des parties aériennes au ¹⁴CO₂ et au ¹⁵NH₃ et récolte

Les cylindres de PVC comportant les monolithes de sol avec un plant de ray grass, sont au préalable disposés dans un container en vue du marquage (diamètre : 10 cm, hauteur : 35 cm ; Figure 19) .

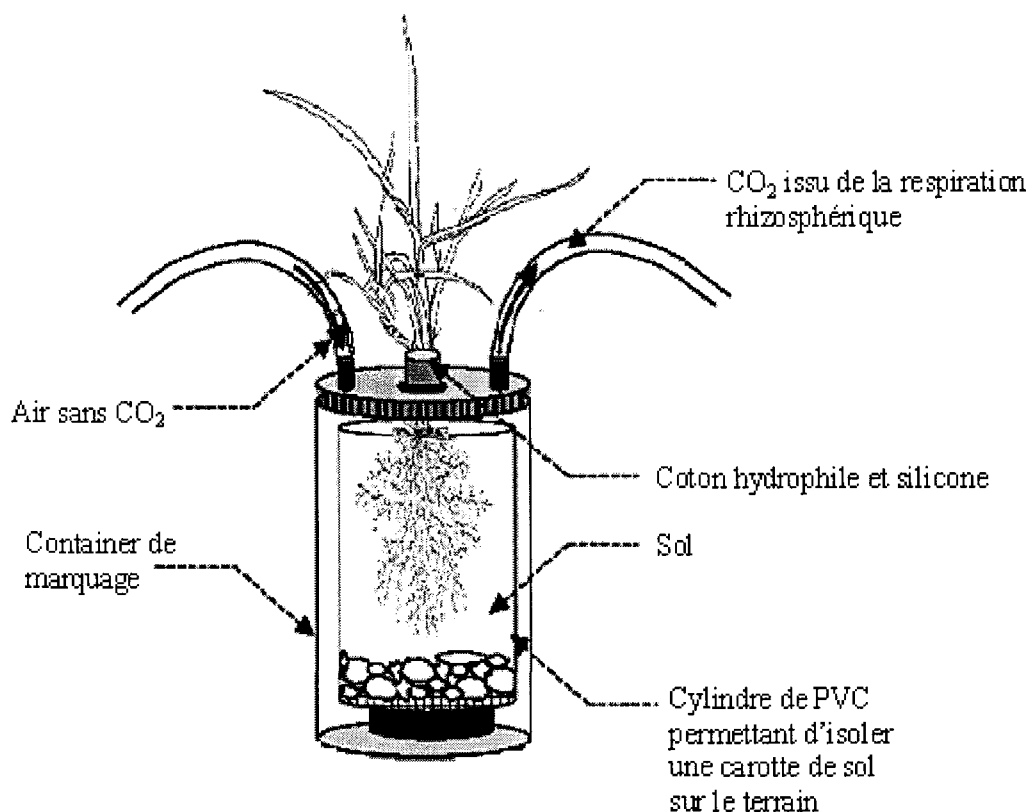


Figure 19 : Container de marquage renfermant un cylindre de PVC planté d'un ray grass destiné à être marqué au ¹⁴CO₂. Le couvercle présente une ouverture permettant le passage de la plante. Cette ouverture, une fois la plante mise en place est bouchée avec du silicone liquide. Le couvercle présente également 2 trous permettant le branchement de 2 tuyaux reliés aux pièges à soude utilisés pour piéger le CO₂ issu de la respiration rhizosphérique.

La veille du marquage, les plantes sont transférées dans la chambre de marquage afin d'acclimater les plantes aux conditions climatiques de la chambre : densité du flux de photons à 400 $\mu\text{moles.m}^2 \text{ s}^{-1}$ à la base des plantes, photopériode de 16h, température à 22°C jour et nuit.

La concentration en CO₂ est régulée à 36Pa pCO₂ $\pm$ 0.7Pa pCO₂ pour les plantes témoins et à 60Pa pCO₂ $\pm$ 1.3Pa pCO₂ pour les plantes issues des anneaux enrichis pendant toute la procédure de marquage. L'activité spécifique de l'atmosphère est fixée à 40 KBq mg C⁻¹ pour les marquages effectués au mois de juin et à 55 KBq mg C⁻¹ pour les marquages effectués au mois de septembre. Les plantes sont exposées pendant 1heure au ¹⁴CO₂ lors des marquages du mois de juin et 1h30 lors des marquages du mois d'octobre.

1.4. Mesure de la minéralisation du carbone total et du carbone 14 dans le sol adhérent

Pour l'échantillonnage effectué à l'automne, la minéralisation des composés organiques marqués au carbone 14 libérés par les racines, ainsi que la minéralisation de la matière organique du sol (C total) sont mesurées. Dans cette optique, 20 grammes de sol adhérent (SA) sont mis à incuber pendant 30 jours à 22°C dans le noir dans des bocaux en verre fermés hermétiquement. Le CO₂ total et le ¹⁴CO₂ minéralisés par la biomasse microbienne sont piégés dans 20ml de NaOH 1M disposés dans un pilulier placé dans le bocal d'incubation. Ces pièges à soude sont remplacés régulièrement afin d'établir une cinétique de minéralisation. Le carbone 14 contenu dans le NaOH est analysé en scintillation liquide (Tri-Carb 2100 Tr, Packard), en mélangeant 1ml de NaOH à 10ml de liquide scintillant Ultima Gold (Packard, USA). Le carbone total contenu dans chaque piège à soude est analysé grâce à l'analyseur COTmètre (Shimadzu TOC-VCSH). Un blanc NaOH est réalisé pour tenir compte du C piégé par la soude pendant la préparation du suivi de minéralisation.

1.5. Expression des résultats du marquage à l'azote 15

La répartition du ¹⁵N dans les différents compartiments composant le système plante-sol-micro-organismes (feuilles, tiges, racines, sol adhérent SA) est comparé pour les deux niveaux de fertilisation ainsi que les deux niveaux de CO₂. Le sol non adhérent n'a pas été

considéré car l'enrichissement était très faible voire nul. Cette répartition est exprimée en pourcentage de ¹⁵N dérivé de l'ammonium (%NDFA ; Janzen et Bruinsma, 1989).

$$\%NDFA = \frac{\text{Excès isotopique dans un compartiment donné}}{\text{Enrichissement isotopique de l'atmosphère}} \times 100$$

1.6. Analyses statistiques

Les données sont analysées à l'aide du logiciel JMP IN[®], SAS institute. Le dispositif expérimental est un split-plot. Des analyses de variances à deux facteurs (CO₂ et azote) sont effectuées. Le CO₂ est considéré comme facteur principal, l'azote comme facteur secondaire. Chaque bloc correspond à une répétition, soit 3 répétitions. Le test de Tukey Kramer a permis de comparer les moyennes entre elles dans le cas d'une interaction entre les effets CO₂ et les effets azote. Sur les figures, les barres verticales correspondent à 2 intervalles de confiance de la moyenne.

II. Résultats

2.1. Production de biomasse végétale

La production de biomasse totale n'est pas modifiée par l'enrichissement CO₂ lors du prélèvement effectué au printemps (P>0,1; Figure 20b, Tableau 10). Néanmoins, lors de l'échantillonnage d'automne, une interaction significative est observée entre les effets CO₂ et N (P=0,019 ; Tableau 10). Dans le cas de l'apport élevé d'azote, l'élévation du CO₂ augmente la production de biomasse des parties aériennes des plantes (P<0,001; test Tukey Kramer) (Figure 20e, Tableau 10). Aux deux dates de prélèvement, l'apport élevé d'azote augmente la production de biomasse (P<0,001; Figures 20b et f, Tableaux 10). Le rapport de biomasse Racines sur Parties aériennes (PR/PA) n'est pas significativement affecté par le CO₂, quelle que soit la date d'échantillonnage (Figures 20d et h). Il est cependant significativement réduit par le fort niveau de fertilisation azotée au printemps (P<0,001 ; Figure 20d, Tableau 10).

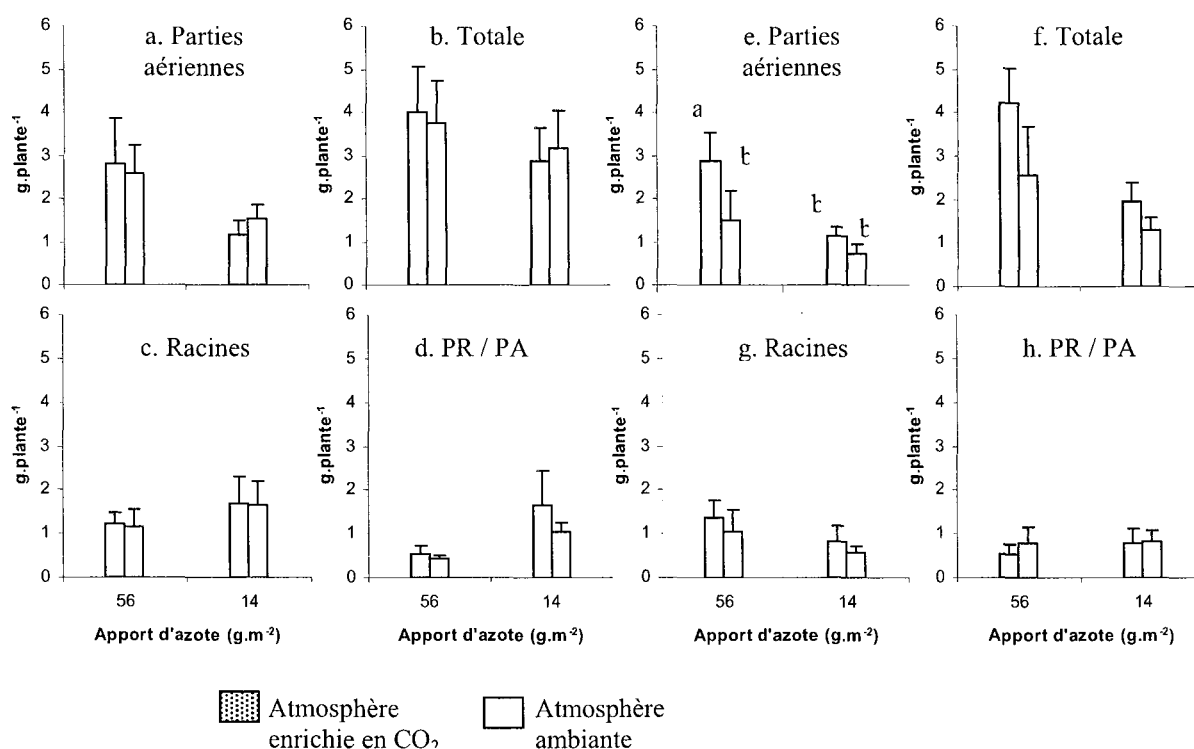


Figure 20 : Biomasse sèche des parties aériennes (a, e), des racines (c, g), biomasse sèche totale (b, f) de la plante en g. plante⁻¹ et ratio de matière sèche Parties racinaires PR / Parties aériennes PA (d, h) des plants de *Lolium perenne* récoltés en Juin (printemps : a, b, c, d) et en Septembre (automne, e, f, g, h) dans les anneaux enrichis en CO₂ et ambiants, pour les deux niveaux de fertilisation azotées (56 et 14 g N. m⁻²). Les différentes lettres représentent les résultats du test de Tukey Kramer, effectué lorsqu'une interaction significative est révélée par l'analyse de variance ; n=3.

2.2. Allocation de carbone 14 et de l'azote 15 au compartiment souterrain

Allocation de carbone 14 :

Printemps

En moyenne, 46% et 50% du ¹⁴C assimilé sont alloués au compartiment souterrain respectivement sous CO₂ enrichi (CO₂+) et CO₂ ambiant (P>0.1, moyenne des traitements azotés). Trente trois% et 36% sont libérés par les racines (¹⁴C retrouvé dans la respiration rhizosphérique RR, le sol et la biomasse microbienne) respectivement sous CO₂++ et CO₂ ambiant (P>0,1, moyenne des traitements azotés ; Figure 21Ac, d,e ; Tableau 10).

L'allocation de ¹⁴C au compartiment souterrain est plus faible lors d'un fort apport d'azote que lors d'un faible apport (39% contre 57% lors d'un faible apport d'azote) : les racines libèrent proportionnellement moins de ¹⁴C lors d'un fort apport d'azote que lors d'un faible apport (27% contre 42% RTR dans la respiration rhizosphérique, le sol et la biomasse microbienne sous faible niveau d'azote; P<0,001; Figure 21Ac, d,e ; Tableau 10).

Automne

Une interaction est observée entre les effets azote et les effets CO₂ (P=0,057; P=0,059; Tableau 10) pour l'allocation de ¹⁴C aux parties aériennes et au compartiment souterrain respectivement. Avec un apport élevé d'azote, une plus faible proportion de ¹⁴C est allouée au compartiment souterrain (P<0,001; test Tukey Kramer). Les plantes enrichies en CO₂ allouent moins de ¹⁴C au sol (biomasse microbienne, sol adhérent SA et sol non adhérent SNA; P<0,05; Figure 21B c, d, e ; Tableau 10). L'azote n'a pas de conséquences majeures sur la répartition du ¹⁴C dans le système plante-sol (Figure 21B ; Tableau 10).

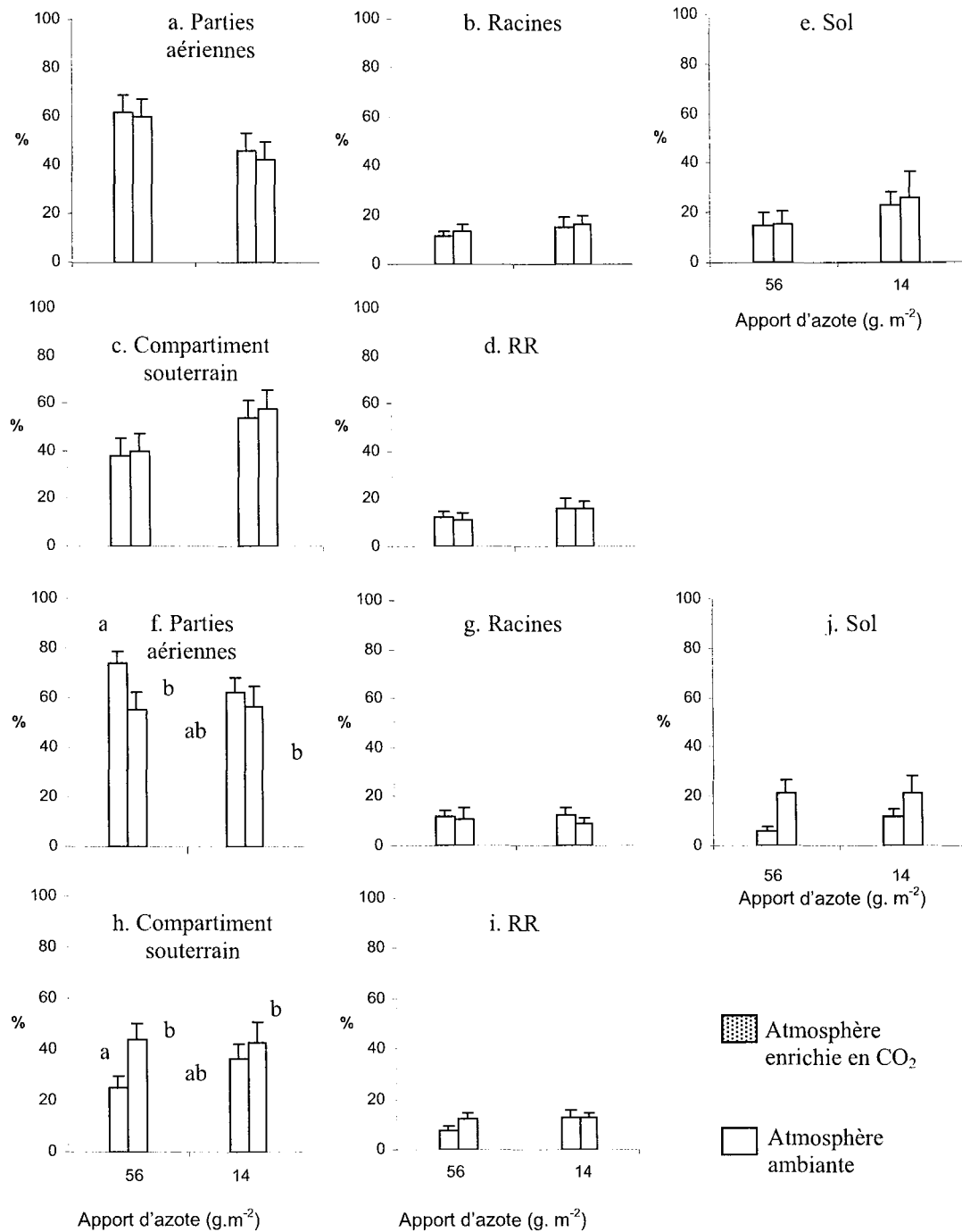


Figure 21: Répartition du ¹⁴C assimilé exprimé en pourcentage de ¹⁴C total retrouvé %RTR dans les parties aériennes (a, f), le compartiment souterrain (c, h) (racines b, g ; respiration rhizosphérique RR d, i ; et le sol incluant sol adhérent, sol non adhérent et biomasse microbienne e, j), lors des échantillonnages du printemps (a, b, c, d, e) et de l'automne (f, g, h, i, j) au sein des monocultures de ray grass, pour deux niveaux de fertilisation azoté (56 et 14 gN.m⁻²). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3). Les différentes lettres représentent les résultats du test de Tukey Kramer, effectué lorsqu'une interaction significative est révélée par l'analyse de variance.

Allocation d'azote 15 :

Printemps

Le pourcentage d'azote dérivé de l'ammonium (%NDFA) retrouvé dans les parties aériennes est significativement plus faible sous atmosphère enrichie en CO₂ que sous atmosphère ambiante ($P < 0,001$ pour les feuilles et les tiges Figure 22a, b ; Tableau 10). En revanche, dans les racines et dans le sol adhérent, aucune différence n'est observée entre les différents traitements CO₂ (Figure 22c,d ; Tableau 10).

La fertilisation azotée diminue la proportion de ¹⁵N dérivée de l'ammonium retrouvée dans les parties aériennes ($P = 0,005$). Aucun effet n'est observée au niveau des racines et du sol adhérent (Figure 22, Tableau 10).

Automne

Le pourcentage d'azote dérivé de l'ammonium (%NDFA) retrouvé dans les parties aériennes est significativement plus faible sous atmosphère enrichie en CO₂ que sous atmosphère ambiante ($P < 0,001$ pour les feuilles et les tiges, Figure 23 a, b ; Tableau 10). En revanche, dans le sol adhérent, la proportion de ¹⁵N dérivée de l'ammonium est significativement plus élevée sous atmosphère enrichie en CO₂ ($P < 0,001$; Figure 23d ; Tableau 10).

La fertilisation azotée diminue la proportion de ¹⁵N dérivée de l'ammonium retrouvée dans les parties aériennes ($P < 0,001$) mais augmente la proportion de ¹⁵N dérivée de l'ammonium retrouvée dans sol adhérent ((Figure 23 ; Tableau 10).

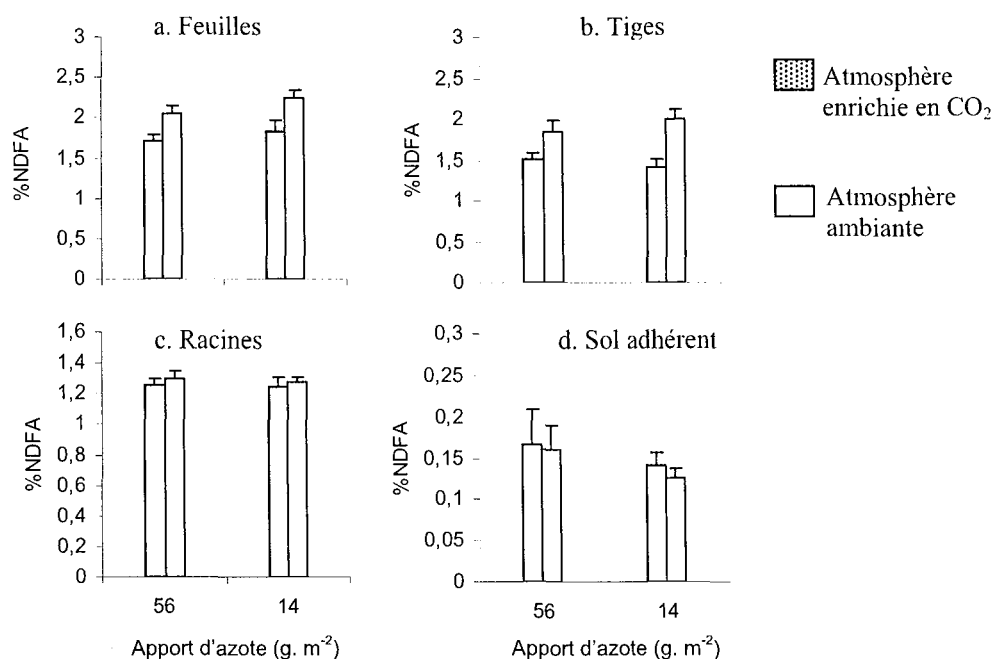


Figure 22 : Pourcentage de ¹⁵N dérivé de l'atmosphère dans les feuilles (a), les tiges (b), les racines (c) et le sol adhérent (d) pour les échantillonnages du printemps au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère ambiante ou enrichie en CO₂, sous deux niveaux de fertilisation.. Les barres verticales présentent les intervalles de confiances (n=3).

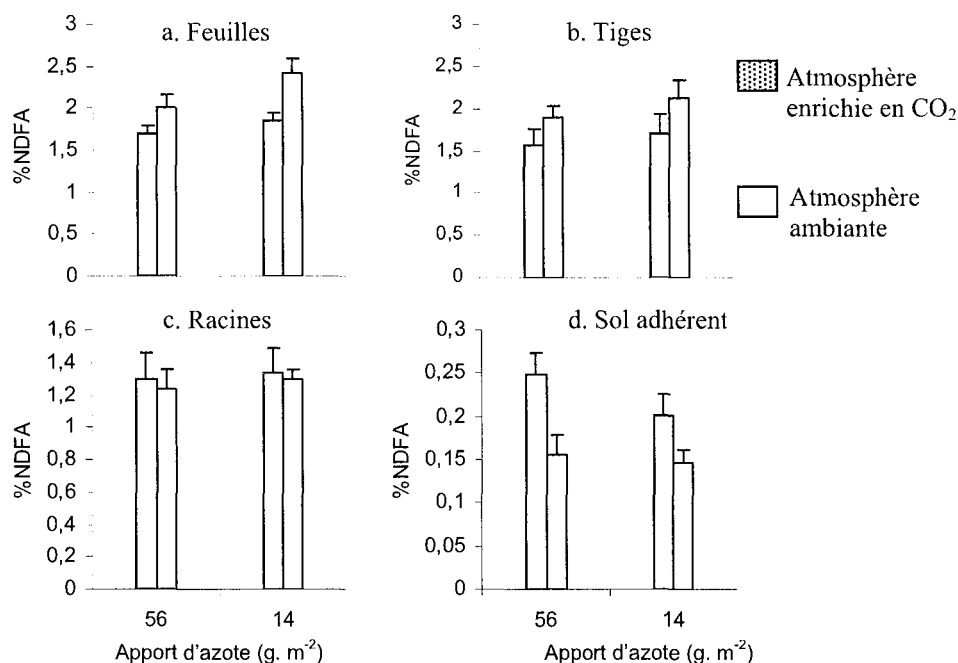


Figure 23 : Pourcentage de ¹⁵N dérivé de l'atmosphère dans les feuilles (a), les tiges (b), les racines (c) et le sol adhérent (d) pour les échantillonnages de l'automne au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère ambiante ou enrichie en CO₂, sous deux niveaux de fertilisation.. Les barres verticales présentent les intervalles de confiances (n=3).

2.3. Concentrations en glucides totaux dans les organes végétaux

Lors de l'échantillonnage du printemps, les feuilles et les racines des plantes issues des anneaux enrichis en CO₂ présentent une concentration en glucides totaux plus importante que celles des plantes issues des anneaux ambiants ($P=0,019$ et $P=0,011$ respectivement dans les feuilles et dans les racines ; Figure 24 a, b, Tableau 10).

Lors de l'échantillonnage d'automne, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations en glucide totaux dans les feuilles des plantes issues des deux niveaux de CO₂ ($P=0,361$). En revanche, la concentration en glucides totaux dans les racines des plantes issues des anneaux enrichis en CO₂ est significativement plus élevée que celle des racines des plantes issues des anneaux ambiants ($P=0,020$; Figure 24 c, d ; Tableau 10).

Le fort apport d'azote augmente la concentration en glucide dans les feuilles seulement lors de l'échantillonnage du printemps ($P=0,007$; Figure 24 a). Dans tous les autres cas, l'apport d'azote n'influence pas la concentration en glucides totaux dans la plante.

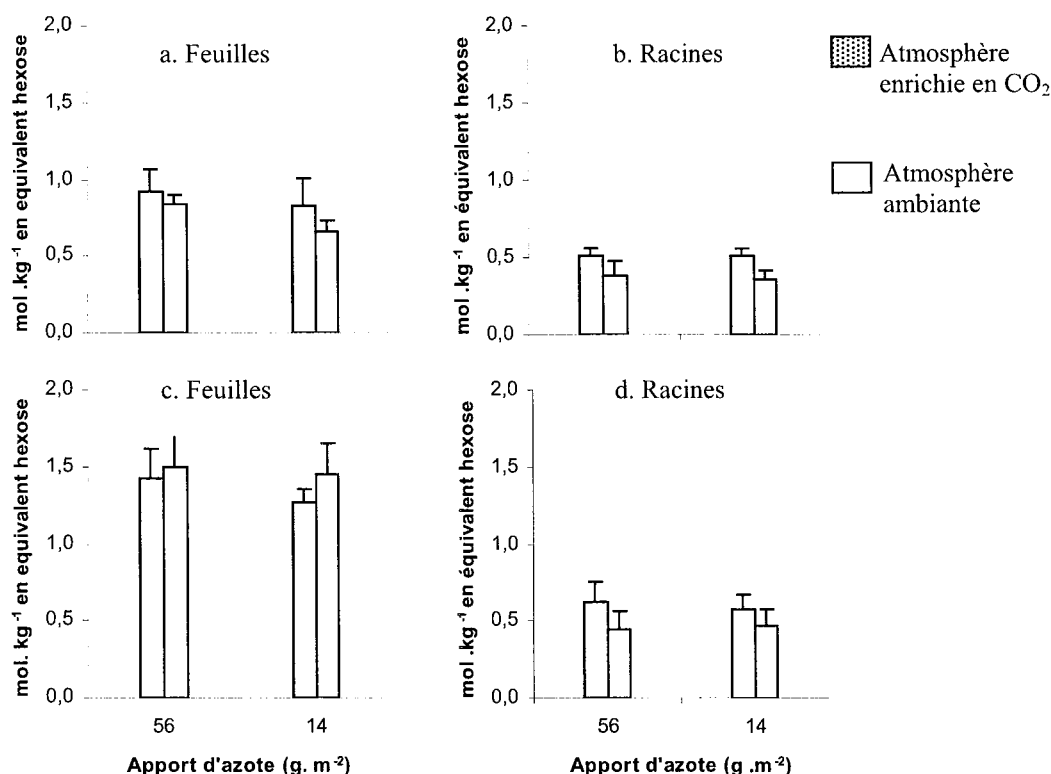


Figure 24: Concentrations en glucides totaux exprimées en mol de glucide par kg d'échantillon en équivalent hexose, dans les feuilles (a, c) et dans les racines (b, d) après les échantillonnages du printemps (a, b) et de l'automne (c, d) au sein des monocultures de ray grass, pour deux niveaux de fertilisation azotée. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

2.4. Quantités de carbone dans la biomasse microbienne

La biomasse microbienne (mg C. kg⁻¹ de sol) du SA n'est pas significativement affectée par l'élévation du CO₂ lors du prélèvement effectué au printemps, alors qu'elle est diminuée à l'automne (P<0,001; Figure 25, Tableau 10). La biomasse microbienne du SNA reste inchangée quelle que soit la date d'échantillonnage. Une biomasse microbienne plus importante dans le SA que dans le SNA est observée sous niveau ambiant de CO₂.

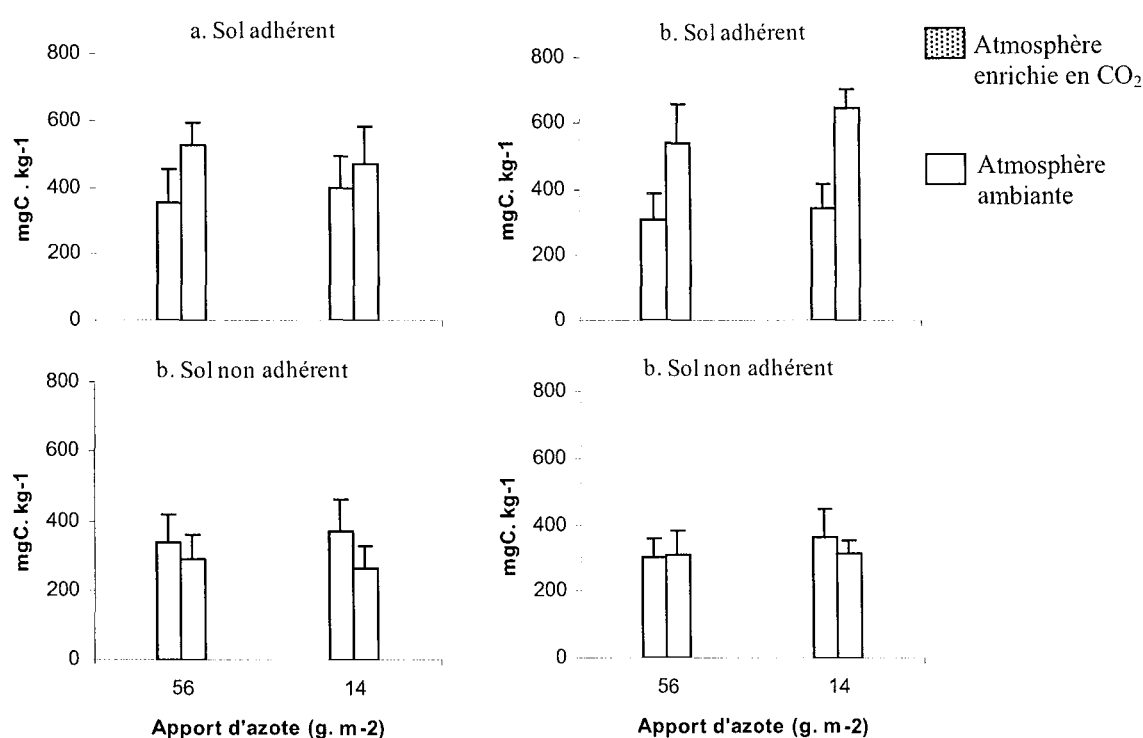


Figure 25: C microbien (mg C kg⁻¹ de sol) du sol adhérent (SA) et non adhérent (SNA) lors des échantillonnages du printemps (a, c) et de l'automne (b, d) au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère ambiante ou enrichie en CO₂, sous deux niveaux de fertilisation. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

2.5. Cinétique de minéralisation du carbone total et des composés organiques ¹⁴C (C rhizodéposé et turnover de la biomasse microbienne marquée) dans le sol adhérent

Lors de l'expérience menée à l'automne, nous avons mesuré le devenir du carbone dans le sol en effectuant une cinétique du CO₂ total et du ¹⁴CO₂ respirés au niveau du sol adhérent. La période d'incubation du sol adhérent après la récolte est de 30 jours.

La fertilisation azotée n'a pas d'influence sur la minéralisation de la matière organique (évolution du carbone total) et des composés organiques marqués (¹⁴C).

Immédiatement après l'échantillonnage (48h après le marquage et avant la période d'incubation), la quantité de ¹⁴C présente dans le sol adhérent est significativement plus élevée sous CO₂ ambiant que sous CO₂+ (80 Bq g⁻¹ de SA sous CO₂ ambiant contre 64 Bq g⁻¹ de SA sous CO₂+, moyenne des deux niveaux d'azote ; P=0,024). Les cinétiques de minéralisation du carbone total et du ¹⁴C indiquent qu'à la fin de l'incubation (30 jours), les quantités de C total et de ¹⁴C minéralisées (exprimée en mg C g⁻¹ de sol adhérent pour le C total et en Bq g⁻¹ de sol adhérent pour le ¹⁴C) sont significativement plus élevées sous CO₂+ que sous CO₂ ambiant (P<0,001 pour le carbone total et pour le carbone 14 ; Figure 26a et 27). De même, les flux de minéralisation du C total et du ¹⁴C (quantité totale de C et de ¹⁴C respirée par unité de temps en mg g⁻¹ SA jour⁻¹ et Bq g⁻¹ SA jour⁻¹) sont significativement plus élevés sous CO₂ élevé (0,049 mg C g⁻¹ SA jour⁻¹ et 0,81 Bq g⁻¹ SA jour⁻¹, moyenne des traitements azotés) que sous CO₂ ambiant (0,034 mg C g⁻¹ SA jour⁻¹ et 0,63 Bq g⁻¹ SA jour⁻¹, moyenne des traitements azotés) (P<0,001 et P=0,012 respectivement pour le carbone total et le ¹⁴C).

Trente % du ¹⁴C initialement présent dans le sol adhérent sont minéralisés sous CO₂ ambiant alors que 44% du ¹⁴C initialement présent dans le sol adhérent sont minéralisés sous CO₂ élevé, à l'issue des 30 jours d'incubation (moyenne des deux niveaux de fertilisation) P=0,002 ; Figure 26b).

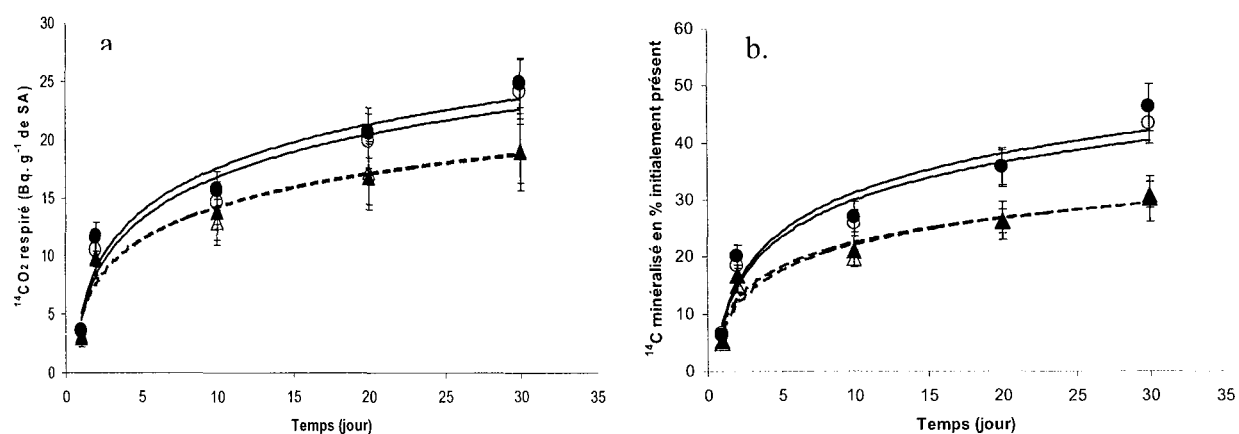


Figure 26 a et b: Production de ¹⁴CO₂ pendant l'incubation de sol adhérent (SA) exprimée en Bq respiré par g de sol adhérent (SA) (26a) et en % de ¹⁴C présent au début de l'incubation dans le sol (26b) lors de l'échantillonnage de l'automne au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère enrichie ou ambiante en CO₂, sous deux niveaux de traitement azoté. Les points sont reliés par une courbe de tendance logarithmique afin de faciliter la lecture. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

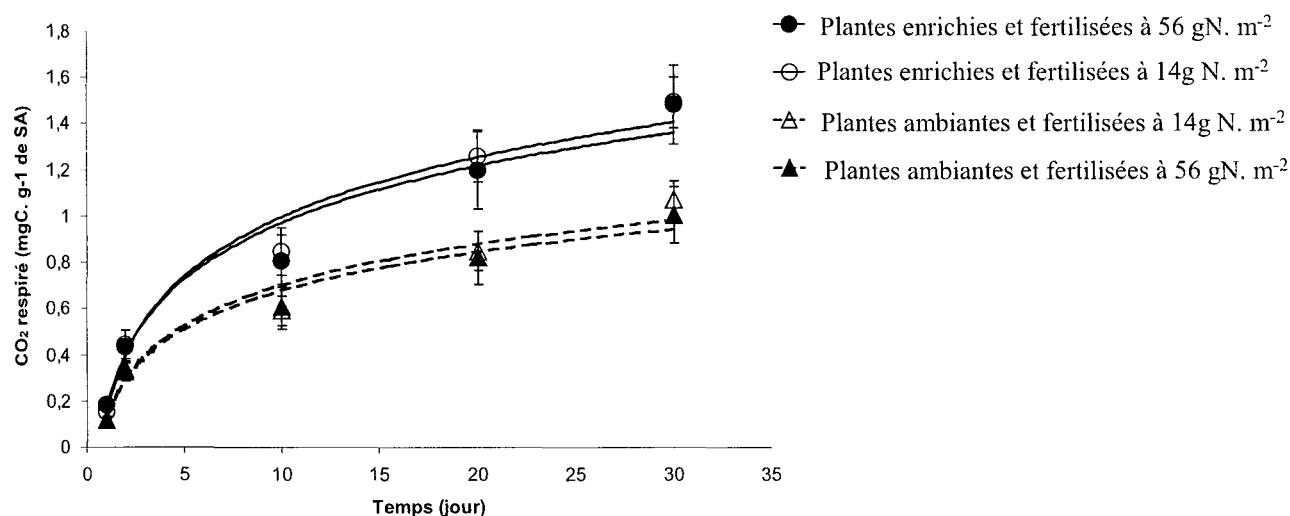


Figure 27: Production de CO₂ pendant l'incubation de sol adhérent (SA) exprimée en mg de C respiré par g de sol adhérent (SA) lors de l'échantillonnage de l'automne au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère enrichie ou ambiante en CO₂ sous deux niveaux de traitement azoté. Les points sont reliés par une courbe de tendance logarithmique afin de faciliter la lecture. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

2.5. Quantités de carbone total dans le sol et ratio C/N

La quantité moyenne de carbone dans le sol sur une profondeur de 0 à 20 cm est comprise entre 6178 et 7108 g m⁻² (sol adhérent et sol non adhérent confondu) lors du prélèvement effectué au printemps. A l'automne, ces valeurs sont comprises entre 5718 et 6578 g m⁻². Ainsi, aucune différence significative n'est observée entre chaque traitement.

Variables	Printemps								Automne			
	CO ₂		N		N X CO ₂		CO ₂		N		N X CO ₂	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Production de biomasse</i>												
Parties aériennes	0,011	0,923	20,31	<0,001	0,821	0,371	3,331	0,142	23,24	<0,001	5,942	0,019
Racines	0,015	0,909	4,836	0,033	0,001	0,983	1,625	0,271	3,691	0,042	0,003	0,953
Totale	0,001	0,992	4,183	0,047	0,394	0,533	3,246	0,148	15,76	<0,001	2,372	0,131
PR/PA	3,421	0,138	16,13	<0,001	1,373	0,248	2,162	0,215	1,062	0,309	1,435	0,238
<i>Répartition du ¹⁴C %RTR</i>												
Parties aériennes	0,307	0,609	20,86	<0,001	0,068	0,795	6,534	0,062	2,885	0,097	3,821	0,057
Compartiment souterrain	0,275	0,627	20,74	<0,001	0,073	0,788	6,851	0,058	2,806	0,101	3,775	0,059
Racines	1,991	0,231	3,057	0,088	0,093	0,761	0,784	0,425	0,141	0,709	0,755	0,391
RR	0,091	0,777	7,151	0,011	0,035	0,851	4,492	0,101	5,403	0,025	2,341	0,134
Sol	0,247	0,645	6,622	0,014	0,117	0,733	7,980	0,047	1,475	0,231	1,280	0,231
<i>Répartition du ¹⁵N %NDFA</i>												
Feuilles	79,52	<0,001	8,575	<0,001	0,736	0,396	39,70	<0,001	16,22	<0,001	2,984	0,093
Tiges	23,86	<0,001	6,765	<0,001	0,564	0,476	4,209	0,015	4,293	0,005	0,067	0,796
Racines	0,221	0,640	1,675	0,203	0,173	0,679	0,544	0,465	1,167	0,287	0,079	0,779
Sol adhérent	0,342	0,522	2,062	0,159	0,574	0,452	32,13	<0,001	7,067	0,011	2,547	0,094
<i>Concentration en sucre totaux</i>												
Feuilles	14,19	0,019	7,822	0,007	0,144	0,705	1,055	0,361	0,891	0,351	0,604	0,441
Racines	19,73	0,011	19,73	0,011	0,117	0,733	5,872	0,02	0,041	0,84	0,537	0,468
<i>Carbone microbien</i>												
Sol adhérent	0,908	0,394	0,851	0,361	0,005	0,983	42,91	<0,001	3,123	0,085	0,721	0,400
Sol non adhérent	2,943	0,156	0,032	0,858	0,443	0,510	0,926	0,389	0,483	0,491	0,894	0,350

Tableau 10 : Résultats des analyses statistiques des différents paramètres : production de biomasse, répartition du ¹⁴C, du ¹⁵N, et carbone microbien du sol adhérent et du sol non adhérent. Les effets CO₂, azote (N) et les interactions CO₂ X N sont testés et considérés comme significative au seuil de 5%.

III. Discussion

3.1. Production de biomasse et répartition des photo-assimilats dans le système plante-sol

Dans les premiers mois suivant la mise en place du dispositif FACE Suisse en 1993, il a été montré que la production de biomasse des plantes n'était pas significativement stimulée par l'enrichissement de l'atmosphère en CO₂ (Hebeisen *et al.*, 1997). Nos résultats de production de biomasse lors de l'échantillonnage de printemps (après une courte période d'exposition des plantes à une concentration élevée en CO₂), corroborent ces précédentes observations, puisque l'élévation du CO₂ n'influence pas significativement la production de biomasse totale des plantes au printemps.

En revanche, les effets de la fertilisation azotée sont plus prononcés que ceux du CO₂ atmosphérique. Un apport élevé d'azote stimule la production de biomasse totale ainsi que celle des parties aériennes mais diminue le ratio de biomasse PR/PA. On constate logiquement qu'un apport élevé d'azote stimule l'allocation de carbone récent aux parties aériennes des plantes et réduit l'allocation de carbone récent au compartiment souterrain, alors que l'élévation du CO₂ n'a aucune influence sur la répartition du carbone dans le système plante-sol. Ces effets sont typiquement rencontrés chez des plantes dont la croissance a été stimulée par un apport conséquent d'azote (Johansson, 1992; Marschner *et al.*, 1996 ; Henry *et al.*, 2005); les plantes bien pourvues en N privilégient l'allocation des assimilats aux parties aériennes ce qui a pour conséquence de diminuer le ratio PR/PA.

Les résultats sont nettement différents pour l'échantillonnage effectué à l'automne, pour lequel les plantes ont été défoliées et fertilisées 3 fois, alors qu'au printemps les plantes n'ont été défoliées et fertilisées qu'une seule fois. Ainsi, à l'automne, une interaction entre les effets CO₂ et les effets azote est observée pour la production de biomasse des parties aériennes. Une stimulation de la biomasse des parties aériennes apparaît lors d'un apport important d'azote. Par conséquent, la disponibilité en azote dans le système apparaît comme le moteur de la réponse de la croissance des parties aériennes au CO₂, confirmant ce qui a été démontré précédemment sur le même dispositif (Hebeisen *et al.*, 1997; Daepf *et al.*, 2000). Les études précédentes expliquent que cette réponse peut être une conséquence de la défoliation. En effet, après une défoliation, la biomasse résiduelle des parties aériennes n'est pas la même sur une parcelle où l'apport d'azote est élevé par rapport à une parcelle où l'apport d'azote est

plus faible. La densité de méristèmes actifs subsistant après la défoliation est plus élevée lors d'une fertilisation azotée forte que lors d'une fertilisation azotée faible, due à une densité de talles plus élevée (Schneider, 2003). Ainsi, la croissance des parties aériennes des plantes défoliées est favorisée suite à un apport important d'azote.

La biomasse racinaire ainsi que le ratio de biomasse PR/PA ne sont pas stimulés par l'élévation du CO₂. Ces données vont à l'encontre des résultats précédents montrant une stimulation de la biomasse racinaire, engendrant un ratio PR/PA plus élevé sous CO₂ élevé (Casella et Soussana, 1997; Loiseau et Soussana, 1999 Daepf *et al.*, 2001; Soussana *et al.*, 1996 ; Suter *et al.*, 2002). Une des raisons à ce résultat pourrait être une limitation de la croissance racinaire par les cylindres en PVC. Cependant, cela ne semble pas être le cas puisque le volume de sol du cylindre n'a pas été complètement exploré par les racines lors de la récolte des plantes. La densité moyenne de racines dans chaque cylindre est comprise entre 1,6 et 5 mg de racine par cm⁻³ de sol. La courte période de croissance des plantes est probablement le facteur explicatif de ce résultat.

Lors de l'échantillonnage de l'automne, sous CO₂ élevé et après un fort apport d'azote, en accord avec la stimulation de biomasse des parties aériennes, le carbone récemment assimilé est préférentiellement alloué aux parties aériennes des plantes et par conséquent, l'allocation de carbone récent au compartiment souterrain est proportionnellement réduite. Il en résulte une diminution de la croissance microbienne, certainement limitée par la disponibilité en carbone dans le sol, plus que par la disponibilité en azote dans le sol (aucun effet de la fertilisation n'est observée sur le carbone de la biomasse microbienne du sol adhérent). Si on admet que la biomasse microbienne est corrélée avec les flux de carbone libérés par les racines (Darrah, 1991), plus particulièrement la rhizodéposition, les flux de rhizodéposition sont réduits par une élévation de la concentration en CO₂ de l'atmosphère, lors de l'échantillonnage d'automne. La taille du système racinaire étant inchangée par le CO₂, il est probable que l'exsudation spécifique soit diminuée (par g de racine, par longueur de racine ou encore par site d'exsudation).

Les flux spécifiques nets d'entrée de carbone dans le système plante-sol sont réduits sous CO₂ élevé (P=0,036 ; Tableau 11 ; exprimé en KBq retrouvé par g⁻¹ de parties aériennes) indiquant que l'assimilation nette de CO₂ était certainement plus faible sous CO₂ élevé que sous CO₂ ambiant au moment de notre expérimentation. Ainsi, une acclimatation de la photosynthèse sous CO₂ élevé peut être supposée (Ainsworth *et al.*, 2003 a; b). La concentration en glucides totaux dans la plante augmentant, celle-ci a pu engendrer une acclimatation de la

photosynthèse comme cela a déjà pu être observé chez *Lolium perenne* (Fischer *et al.*, 1997). En effet, l'expression des gènes contrôlant la photosynthèse est directement dépendante du métabolisme des glucides dans la plante (Sheen, 1994). L'augmentation de la concentration en glucide, due à la repousse suite à une défoliation est exacerbée par le CO₂ élevé (Fischer *et al.*, 1997). Notre échantillonnage d'automne intervient suite à 3 défoliations des plantes, la dernière défoliation ayant eu lieu 25 jours plus tôt. Nos analyses de la concentration en glucides totaux des tissus foliaires ne montrent aucune différence entre les deux traitements CO₂. Néanmoins, la concentration en glucides totaux dans les tissus racinaires est significativement augmentée chez les plantes CO₂+. Ainsi pendant les jours ayant précédé notre échantillonnage, une acclimatation de la photosynthèse a pu avoir lieu, en raison d'une accumulation de glucides dans les tissus foliaires et racinaires (régulation de la photosynthèse par l'activité puits). Du fait d'une réduction de l'activité photosynthétique, les glucides présents en grande quantité dans les tissus de la plante sont utilisés pour la croissance et la maintenance de la plante. Par la suite, la diminution de la concentration en glucide dans les feuilles permet de restaurer l'équilibre source-puits. L'acclimatation de la photosynthèse peut être également un effet du CO₂ dépendant de la saison, comme cela été observé sur le même dispositif mais sur des plants de *Trifolium repens* à l'automne (Ainsworth *et al.*, 2003b). La défoliation, la fertilisation, le rythme des saisons ponctuent le développement d'une prairie gérée de manière intensive, les flux de rhizodéposition dépendent de l'ensemble de ces facteurs.

Apport d'azote (g.m ⁻²)			
CO ₂ +	56	263 (74,9)	
	14	295 (52,9)	
CO ₂	56	400 (74,4)	
	14	392 (58,1)	
Statistiques		Valeur de F	Proba
	CO ₂	4,71	0,036
	N	0,03	0,858
	N X CO ₂	0,1	0,743

Tableau 11 : Flux spécifiques nets d'entrée de ¹⁴C dans le système plante-sol exprimés en KBq retrouvé par g⁻¹ de parties aériennes, après l'échantillonnage d'automne pour les deux niveaux de CO₂ (CO₂+ : enrichi, CO₂ : ambiant) et les deux niveaux de fertilisation (56 et 14 g. m⁻²). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux intervalles de confiance, n=3. On fait l'hypothèse que la respiration des parties aériennes (non mesurée dans notre étude) n'est pas modifiée par l'enrichissement en CO₂.

3.2. Concentration en carbone total du sol et devenir des photoassimilats récents dans la rhizosphère

La stimulation de la production de biomasse des plantes sous CO₂ élevé, observée à l'automne, est le résultat, à l'échelle de la repousse, d'une stimulation de l'activité photosynthétique. Par conséquent, du fait de cette quantité de carbone entrant dans la plante plus importante, les entrées de carbone dans le sol (litière aérienne, rhizodéposition, renouvellement racinaire) auraient du être accrues augmentant ainsi la concentration en carbone total du sol. Nos données montrent d'une part qu'après 9 années consécutives d'enrichissement en CO₂ de l'atmosphère, les flux de rhizodéposition ne sont pas affectés au printemps et diminués à l'automne par le CO₂. D'autre part, aucun changement significatif de la concentration en carbone total du sol n'a été constaté. Ces données sont confirmées par des résultats précédents obtenus sur le même site (Van Kessel *et al.*, 2000 a, b ; Horwath *et al.*, 2000; Van Groeningen *et al.*, 2002 ; de Graff *et al.*, 2004). La teneur équivalente en carbone total du sol entre les deux niveaux de CO₂ peut également s'expliquer par :

- la difficulté de déceler une faible variation du pool de C total sous l'influence de la plante
- l'absence de modifications des flux entrants de C dans le sol
- un turnover plus rapide du carbone labile supplémentaire issu de la plante et entrant dans la rhizosphère sous CO₂ élevé (Horwath *et al.*, 2000).

De Graff *et al.* (2004) observent sur le système FACE Suisse que le sol des parcelles de *L. perenne* après 9 années d'exposition à des teneurs enrichies en CO₂ et un apport d'azote faible montre une respiration significativement plus élevée que le sol issu des parcelles ambiantes en CO₂.

En effet, nos résultats montrent que le taux de minéralisation du carbone (carbone 14 rhizodéposé et carbone total) est plus élevé dans le sol adhérent des plantes enrichies, ce, malgré une biomasse microbienne de plus petite taille. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cet accroissement de l'activité minéralisatrice sous CO₂ élevé :

- i) Une modification de l'activité et de la structure des communautés microbienne du sol adhérent sous CO₂ élevé (Monteallegre *et al.*, 2002 ; Van Groeningen *et*

al., 2005). Ces communautés microbiennes peuvent être composées de populations bactériennes capables de minéraliser plus facilement et plus rapidement la matière organique labile.

- ii) La seconde hypothèse concerne la composition des rhizodépôts. On ne peut pas exclure que des composés plus facilement décomposables peuvent être exsudés en proportions plus importantes sous CO₂ élevé que sous CO₂ ambiant. Ces composés sont par conséquent plus rapidement minéralisables.

Cette minéralisation plus rapide n'influence cependant pas significativement la respiration rhizosphérique (respiration racinaire + respiration microbienne). Un rapide calcul montre que l'augmentation de la capacité des micro-organismes à minéraliser le carbone rhizodéposé ne peut pas influencer la respiration rhizosphérique. Si on exprime ces valeurs en flux journaliers, les rendant ainsi comparables, la respiration rhizosphérique produit en moyenne entre 17 Bq g⁻¹ SA j⁻¹ et 20 Bq g⁻¹ SA j⁻¹ respectivement sous CO₂ élevé et CO₂ ambiant, alors que la minéralisation des composés marqués libérés dans le sol produit entre 0,63 Bq g⁻¹ SA j⁻¹ et 0,81 Bq g⁻¹ SA j⁻¹ respectivement sous atmosphère ambiante et atmosphère enrichie en CO₂, ce qui ne peut pas induire de variations significative de la respiration rhizosphérique.

L'importance de la respiration racinaire par rapport à l'efflux total de CO₂ du sol a déterminé précédemment mise en évidence sur d'autre dispositif FACE. Andrews et al. (1999) ont montré que la respiration racinaire correspondait à 55% de la respiration total du sol dans une forêt de pins. Pendall et al. (2001) ont montré sur une culture de blé en système FACE que la proportion de CO₂ issu de la respiration racinaire pouvait atteindre 65% de la respiration totale du sol.

3.3. Répartition de l'azote 15 dans la plante et rhizodéposition azotée

Le marquage au ¹⁵N des parties aériennes a été réalisé en vue de déterminer la rhizodéposition azotée. Il s'agissait d'une première tentative dans notre laboratoire. L'interprétation des résultats est complexe car la mesure du ¹⁵N résulte d'un flux net, résultante d'un efflux (diffusion passive d'acides aminés selon un gradient de concentration ; Paynel *et al.*, 2001) et d'un influx (mécanisme actif de réabsorption ; Jones et Darrah, 1994). Des études complémentaires seraient nécessaires pour approfondir cet aspect.

Après l'échantillonnage du printemps, la rhizodéposition azotée n'est affectée ni par la disponibilité en azote dans le sol ni par le CO₂. En revanche, lors de l'échantillonnage d'automne, la répartition de l'N dans le système plante-sol montre une augmentation de 14% de l'allocation de l'N vers la rhizosphère pour les plantes ayant évolué dans les parcelles où l'azote est disponible en grande quantité. Néanmoins, notre étude ne permet pas de déterminer quels sont les mécanismes en cause, même s'il a été montré que la rhizodéposition azotée est stimulée par une augmentation de la disponibilité en azote dans le sol (Janzen, 1990). A l'automne, l'augmentation de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère stimule également l'allocation d'N vers la rhizosphère (33%). Ainsi, la rhizodéposition azotée est stimulée à la fois par le CO₂ et par l'apport de fertilisant. La rhizodéposition azotée a pu être stimulée en raison d'une disponibilité élevée en azote dans le sol.

Les micro-organismes peuvent minéraliser l'azote organique libéré par la plante et le rendre ainsi de nouveau disponible pour la croissance de la plante. Nos données ont montré que la production de biomasse des plantes était particulièrement stimulée sous atmosphère enrichie en CO₂ avec un apport élevé d'azote. Dans les parcelles où l'azote est disponible en grande quantité, la rhizodéposition azotée contribue à augmenter cette disponibilité en azote dans le sol.

IV. Conclusion

Nos résultats montrent qu'au printemps, après une seule coupe et un seul apport d'azote, la rhizodéposition carbonée n'est pas affectée par le CO₂. En revanche, à l'automne après 3 défoliations et 4 apports d'azote, la rhizodéposition carbonée est diminuée sous CO₂ enrichi. Les flux de rhizodéposition apparaissent comme fluctuant au cours de la saison, déterminés par le statut physiologique de la plante en réponse aux conditions environnementales et à la gestion agronomique (fauche, fertilisation N). La contribution de la rhizodéposition aux entrées de C dans le sol est donc difficile à prédire et à modéliser. Pour en rendre compte, il est nécessaire d'appréhender ces flux tout au long de la saison de croissance.

La disponibilité en azote dans le sol est le moteur de la réponse de la croissance des plantes au CO₂. Ainsi, à l'automne, la production de biomasse des parties aériennes des plantes soumises au fort apport d'azote est stimulée par le CO₂.

A l'automne, nous observons un accroissement de la minéralisation par les micro-organismes du carbone de la matière organique du sol ainsi que des rhizodépôts sous CO₂ enrichi. Les

micro-organismes utilisant l'azote organique pour leur fonctionnement et leur développement, l'augmentation de la rhizodéposition azotée constatée à l'automne a pu par conséquent stimuler leur activité minéralisatrice. Ainsi le carbone supplémentaire entrant dans le sol est rapidement minéralisé, ce qui pourrait expliquer pourquoi la quantité de C retrouvé dans le sol n'est pas modifiée après 9 années d'enrichissement.



Photographies 7 et 8 : Parcelle d'expérimentation à l'INRA-SAD de Mirecourt (88). Les photographies ont été prises après la seconde coupe. Les piquets délimitent les parcelles et permettent de repérer plus facilement les cylindres de PVC. La parcelle est régulièrement nettoyée de toutes mauvaises herbes.



F. INFLUENCE DE LA DÉFOLIATION SUR LA RÉPARTITION DES ASSIMILATS DANS LA PLANTE ET LES TRANSFERTS DE CARBONE VERS LA RHIZOSPHERE

Alors que le CO₂ atmosphérique accroît la disponibilité en carbone pour la plante, la défoliation, en revanche, la réduit en supprimant des organes source d'assimilats récents. Ainsi, au niveau de la plante entière et de l'écosystème prairial, la défoliation par la fauche ou par la pâture altère transitoirement l'assimilation de C et sa répartition dans la plante (Painter et Detling, 1981; Richards, 1993; Morvan-Bertrand *et al.*, 1999). Il est maintenant clairement établi qu'immédiatement après la défoliation, le C est remobilisé à partir des réserves pour alimenter le métabolisme des méristèmes et assurer les coûts de maintenance de la plante. Ensuite, le C récemment assimilé au niveau des feuilles néo-formées après la défoliation contribue à cette repousse et à la reconstitution des réserves utilisées dans les heures qui suivent la défoliation (Welker *et al.*, 1985; Briske et Richards, 1995; De Visser *et al.*, 1997). Les graminées prairiales re-mobilisent majoritairement le C provenant des feuilles et des tiges résiduelles (subsistant après la coupe) plutôt que des racines (Richards et Caldwell, 1985; Briske et Richards, 1995). Malgré tout, la croissance racinaire (Davidson et Milthorpe, 1966; Richards, 1993) et le prélèvement d'azote (Jarvis et Macduff, 1989; Macduff *et al.*, 1989) sont affectés par la défoliation en raison de la diminution de la disponibilité en assimilats dans les racines.

Alors que les effets de la défoliation sur l'allocation de C dans la plante sont maintenant bien renseignés, il n'en est pas de même pour ses conséquences sur l'allocation de C vers la rhizosphère et sa disponibilité pour les micro-organismes rhizosphériques : par exemple, la défoliation peut augmenter (Holland *et al.*, 1996; Paterson et Sim, 1999; Murray *et al.*, 2004), ne pas modifier (Todorovic *et al.*, 1999) ou diminuer (Mikola et Kytöviita, 2002; Dilkes *et al.*, 2004) les quantités de C libéré par les racines. Ces différences tiennent à plusieurs raisons : stratégies de repousse et d'allocation de C différentes entre espèces (Guitian et Bardgett, 2000), différentes fractions de C assimilé utilisées pour représenter le C libéré par les racines (Mikola et Kytöviita, 2002), essais le plus souvent en conditions contrôlées (*cf* la partie bibliographique pour plus d'éléments explicatifs sur ces aspects). La défoliation a des impacts avérés sur les organismes rhizosphériques, comme les micro-organismes (Guitian et Bardgett,

2000; Hamilton et Franck, 2001), probablement en conséquence de la modification du flux d'énergie disponible alimenté par les racines pour la croissance microbienne. Mais cela reste à démontrer. Au-delà des conséquences sur la libération de C par les racines, la défoliation peut affecter la qualité des tissus racinaires (Seastedt, 1985; Hokka *et al.*, 2004) et stimuler la mortalité des racines (Jarvis et Macduff, 1989). L'importance relative de ces différents mécanismes n'est pas quantifiée; or, il est évident qu'au niveau d'un écosystème prairial, un enjeu majeur consiste à évaluer les conséquences des modifications induites par la défoliation sur le fonctionnement des sols car des effets en retour existent sur la croissance des plantes, le prélèvement et l'allocation d'azote dans la plante (Hamilton et Frank, 2001; Mikola *et al.*, 2005).

En vue d'obtenir une image réaliste sur le plan agronomique et écologique des conséquences de la défoliation sur le transfert du C récent de la plante vers le sol, nous avons établi une expérimentation au champ dans laquelle des parcelles de ray grass sont défoliées ou non.

La quantification *in situ* de la rhizodéposition étant impossible et l'utilisation d'isotopes du carbone en plein champ très contraignante, nous avons estimé les conséquences de la défoliation par la mesure d'indicateurs de la rhizodéposition (cf synthèse bibliographique). Ainsi, nous avons déterminé la croissance de la plante, la disponibilité en C dans la rhizosphère, l'abondance, l'activité et la taille de la communauté microbienne rhizosphérique, 2 et 4 jours après la dernière défoliation. En effet, Paterson et Sim (2000) ont montré un accroissement de la libération de C par les racines pendant les 2 premiers jours suivant la coupe, suivi d'un retour à l'état initial dans les 3 jours suivant ce pic de libération de C par les racines. L'abondance de différents groupes de nématodes (criblés selon leur aptitude trophique) a été déterminée 6 jours après la coupe (Mikola *et al.*, 2001 a, b). Certains groupes de nématodes sont des prédateurs de micro-organismes. Leur abondance est donc proportionnelle à celle des micro-organismes elle-même déterminée par la disponibilité en carbone dans la rhizosphère car le C est le facteur le plus limitant du développement microbien dans le sol. Les populations de nématodes pourraient constituer ainsi un indicateur supplémentaire de la rhizodéposition.

De plus, comme il a été montré que la disponibilité en éléments nutritifs (notamment azote) peut affecter la libération de composés organiques à partir des racines (Hale *et al.*, 1971; Grayston *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 2005), l'étude a été conduite avec 2 niveaux contrastés de disponibilité en N dans le sol.

Dans ce contexte, nous avons testé au champ l'hypothèse suivante : **les modifications d'allocation de C dans la plante (Holland *et al.*, 1996) et des concentrations en C soluble intra-racinaire (Paterson et Sim, 1999) induites par la défoliation modifient la disponibilité en C dans la rhizosphère et influencent, en conséquence, l'abondance et l'activité des micro-organismes et de leurs prédateurs.**

Les analyses sur les nématodes du sol, principaux prédateurs des micro-organismes, ont été effectuées par Juha Mikola, chercheur de l'Université de Jyväskylä (Finlande) qui collaboré avec nous dans le cadre d'un projet Européen (réseau thématique CONSIDER) sur la conservation de la biodiversité des sols dans des environnements changeants.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans *Functional Ecology*.

Bazot S., Mikola J., Nguyen C., Robin C. (2005). Do defoliation-induced changes in C allocation of field-grown *Lolium perenne* affect C availability, microbes and microbial feeders in soil? *Functional Ecology*, 19 (5), 886-896.

I. Matériels et méthodes

1.1. Dispositif expérimental

Cette expérience a été menée à la station expérimentale l'INRA SAD de Mirecourt dans le département des Vosges (6° 81' E & 53° 6' N, Lorraine, France) (Photographies 7 et 8). Avant la mise en place du dispositif, la parcelle a été traitée avec du glyphosate pour détruire les adventices. Trois parcelles expérimentales, chacune constituant un bloc, (4 x 4 m chacune), ont été semées à la volée (graines de ray grass cv. Canasta mélangées à du sable pour assurer un semis homogène) à raison de 25 kg ha⁻¹ le 2 septembre 2002. Le 15 mars 2003, les blocs sont coupées à 5 cm au-dessus de la surface du sol pour éliminer la biomasse résiduelle en sortie d'hiver et homogénéiser les couverts. Chaque bloc est ensuite divisée en 2 parcelles (2 x 4 m) et chacune de ces parcelles divisée en 2 sous-parcelles (1 x 4 m). Pour faciliter l'individualisation de plantes, 4 plantes ont été choisies au hasard dans chaque sous-parcelle et le sol autour de chaque plante isolé en enfonçant un cylindre de PVC (diamètre = 8cm, hauteur = 25cm) autour de la plante. Ainsi, le sol de chaque cylindre n'est pas remanié et la récolte de la plante facilitée.

Le dispositif comporte 2 traitements : défoliation et addition d'azote. Le traitement N est au niveau de la parcelle (une parcelle de chaque bloc choisie au hasard et recevant 10 g N m⁻² a⁻¹ correspondant à 100 kg ha⁻¹, l'autre ne recevant pas d'N). Le traitement défoliation est appliqué au niveau sous-parcelle (une sous parcelle défoliée, l'autre laissée intacte). Les défoliations interviennent lorsque le couvert végétal atteint 20cm de hauteur. La première défoliation intervient le 30 avril 2003, la seconde défoliation intervient le 19 mai 2003. L'azote est apporté sous forme d'une solution de NH₄NO₃ en deux fois : 5 g m⁻² après chaque défoliation, tandis que les parcelles sans addition de N reçoivent uniquement de l'eau.

1.2. Echantillonnages

L'essai est échantillonné 3 fois : 2, 4 et 6 jours après la dernière défoliation de mai. Au 1^{er} et 2^{ème} prélèvement, 2 cylindres de PVC incluant leur plante individualisée sont prélevés sur chaque sous-parcelle en vue des mesures et analyses au laboratoire. Au 3^{ème} échantillonnage, 2 carottes de sol (surface 9,6 cm², hauteur 10 cm) sont prélevées aléatoirement sous des

plantes de chaque sous-parcelle en vue d'examiner la communauté de nématodes dans la rhizosphère.

A chacun des 2 premiers échantillonnages, les cylindres de sol et leur plantes sont rapportés rapidement au laboratoire. Toutes les talles sont coupées et les feuilles et les tiges sont séparées puis séchées et pesées. Les racines et le sol adhérent sont prélevés selon le protocole décrit précédemment.

1.3. Analyses sur les plantes et le sol.

La plupart des techniques analytiques ont été décrites précédemment. Seuls seront décrits les éléments spécifiques à cette expérimentation. Après lyophilisation, les concentrations en C et N dans les échantillons végétaux et le sol sont mesurées. La concentration en glucides totaux dans les racines est mesurée par la méthode au phénol (Dubois *et al.*, 1956). La concentration en C soluble dans le sol adhérent est également déterminée grâce à la technique décrite ci-dessous.

La concentration en carbone soluble du sol adhérent est mesurée grâce à la technique d'extraction à l'eau chaude. Cette technique permet de mesurer la concentration en carbone organique labile du sol (C issu de la biomasse microbienne et de la matière organique formant un pool de carbone facilement disponible pour les micro-organismes (Sparling *et al.*, 1998)). Du sol frais est séché pendant 12h à 37°C puis 5g sont finement broyés. Ils sont ensuite mélangés à 25ml d'eau dans un flacon placé ensuite dans un bain-marie à 80°C pendant 18h. Après agitation, le mélange sol et eau chaude est filtré sur papier Whatman n°42. La concentration en carbone du filtrat est analysé au COTmètre (Shimadzu TOC-VCSH).

1.4. Analyses sur le compartiment microbien

Le carbone de la biomasse microbienne est analysée par la technique d'extraction fumigation (Vance *et al.*, 1987) décrite précédemment.

1.4.1. *Evaluation de l'activité microbienne et de la disponibilité en C pour la biomasse microbienne*

L'activité microbienne et la disponibilité en C pour la BM sont évalués à l'aide d'un test mis au point dans notre laboratoire et décrit par Nguyen et Henry (2002). Brièvement décrit, le principe consiste à déterminer l'activité microbienne grâce à un apport de micro-quantités de ^{14}C -glucose à un sol; le glucose n'est que l'entraîneur du ^{14}C car il est apporté en quantité infime pour ne pas influencer la taille du pool de C soluble et l'activité du compartiment microbien (de l'ordre du nanogramme supplémentaire de C apporté par g de sol). La mesure des quantités de ^{14}C -glucose minéralisé ($^{14}\text{CO}_2$) est une mesure de l'activité microbienne. Il a été montré que la proportion de ^{14}C incorporé dans le compartiment microbien augmente (^{14}Cfe) et la proportion de ^{14}C -glucose minéralisé ($^{14}\text{CO}_2$) par la biomasse microbienne diminue lorsque la disponibilité en C dans le sol diminue (Nguyen et Henry, 2002) Ainsi, le ratio $^{14}\text{CO}_2 / ^{14}\text{Cfe}$ est un indicateur de la disponibilité en C dans le sol : plus le ratio est élevé, plus la quantité de C disponible pour la BM est élevé.

Pour réaliser ce test, 2 piluliers en verre de 25 ml contenant chacun 4 g de sol adhérent frais (destiné à une extraction fumigation) sont placés dans un récipient d'incubation de 100ml contenant 25ml de NaOH 1M. Dans chacun des deux piluliers en verre est appliquée une aliquote de 100 μL de ^{14}C -glucose (37 KBq.ml $^{-1}$). Le récipient est immédiatement hermétiquement fermé et mis à incuber à 22°C à l'obscurité pendant 6 jours.

Le $^{14}\text{CO}_2$ respiré est ensuite régulièrement quantifié (1, 2, 6, 24, 30, 36, 49, 59, 72, 106, 130 et 144h après le début de l'incubation) par comptage en scintillation liquide de 0,5ml de soude mélangé avec 5ml de Ultima Gold (Packard). Après l'incubation, une extraction fumigation permet de doser le ^{14}C incorporé dans le compartiment microbien (^{14}Cfe).

1.4.2. *Dénombrement des bactéries cultivables du sol*

Les bactéries cultivables du sol représentent au plus 10% des bactéries totales du sol. Cependant, ces bactéries utilisent pour se développer du carbone labile libéré par les racines. Leur abondance dans la rhizosphère est ainsi un indicateur de la quantité de carbone libéré par les racines et constitue un outil d'estimation de la rhizodéposition.

Cinq g de sol adhérent frais sont mis à agiter (40 tr.min $^{-1}$) pendant 10 minutes dans 50 ml de tampon phosphate (PBS ; 7,2g de NaCl, 2,8g de N_2HPO_4 et 0,4g de KH_2PO_4 par litre à pH

7,2). Après centrifugation (10 min à 750 rpm), 2 ml de surnageant contenant les micro-organismes sont placés dans un tube auto-clavé contenant 18ml de PBS. Quatre dilutions en cascade sont effectuées en série de 10^{-2} à 10^{-5} . Cent micro-litres des solutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} sont ensuite étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu nutritif TSA (Tryptone Soy Agar, Difco). Pour chaque dilution, 2 répétitions sont effectuées. Les boîtes de Pétri sont incubées à 27°C à l'obscurité pendant 10 jours. Un premier comptage des colonies développées est effectué 2 jours après le début de l'incubation (bactéries à stratégie r). Un second comptage est effectué à la fin des 10 jours d'incubation (bactéries à stratégie k). Les résultats sont exprimés en log CFU (Colony Forming Unit) par g de sol adhérent sec.

1.4.3. Analyse des aptitudes cataboliques des communautés microbiennes (Biolog®)

Cette méthode permet de mettre en évidence la structuration des communautés microbiennes rhizosphériques selon sur les aptitudes cataboliques de la fraction cultivable des micro-organismes. L'inoculation de plaques Biolog® GN2 est effectuée à partir de la dilution 10^{-3} . Cent cinquante microlitres sont inoculés dans chacun des 96 puits de la plaque. Chaque puits contient un substrat. Les plaques sont placées à 27°C à l'obscurité pendant 72h. L'absorbance de chaque puits correspondant au degré d'oxydation par les micro-organismes du composé présent dans chaque puits est mesurée régulièrement à une longueur d'onde de 550nm grâce à un lecteur de plaque (MR 7000 Dynatech).

Pour chaque puits, il est possible de tracer une courbe d'évolution de l'absorbance en fonction du temps. L'intégration de cette courbe d'évolution donne une valeur caractérisant la consommation du substrat sur la durée d'incubation. Les valeurs inférieures à celle obtenue sur le puits ne contenant aucun substrat carboné sont considérées comme égales à zéro. Le calcul d'une aire pour chaque puits permet de déterminer l'utilisation relative par les micro-organismes de chacune des 95 sources carbonées. De même le calcul de l'indice de Shannon H permet de déterminer la diversité globale d'utilisation des substrats par les micro-organismes (Preston-Mafham *et al.*, 2002).

$$H = -\sum ((A_i / \sum A_i) \times \log_{10} (A_i / \sum A_i)),$$

avec A_i l'aire calculée sur le puits i . Nous cherchons ensuite parmi les différentes classes biochimiques de substrat (glucides, acides aminés, acides organiques...), par le biais d'une analyse de variance si l'une ou plusieurs de ces classes sont plus spécifiquement utilisées par les micro-organismes (Preston-Mafham *et al.*, 2002).

1.5. Analyse de la communauté de nématodes

Les nématodes sont extraits à partir de 30 g de sol adhérent frais en utilisant un dispositif en entonnoir (Sohlenius, 1979). Le nombre total d'individus est compté et à partir d'échantillons de 150 individus, les genres de nématodes sont identifiés et alloués dans des groupes selon leur aptitude trophique d'après Yeates *et al.* (1993).

1.6. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données est réalisée, pour chaque variable, en faisant la moyenne de deux échantillons par sous-parcelle. Les effets de la défoliation, de l'apport d'azote, de la date de récolte, ainsi que les interactions entre ces différents facteurs sont analysées grâce à une analyse de variance à facteurs hiérarchisés (du fait des 2 dates d'échantillonnages) avec le logiciel SPSS (Statistical package ; SPSS, 2001). L'homogénéité des variances est testée en utilisant le test de Levene. Dans le cas où l'homogénéité des variances n'est pas conservée, les valeurs sont exprimées en logarithme. Si une interaction significative est mise en évidence entre l'effet date et l'effet défoliation ou entre l'effet date et l'effet azote, les effets défoliation et azote sont traités séparément. Si une interaction est significative entre défoliation et azote, les facteurs sont alors analysés un par un.

Sur les figures, les barres verticales correspondent à 2 intervalles de confiance de la moyenne.

II. Résultats

2.1. Production de biomasse végétale

On observe une interaction entre les effets de la fertilisation azotée et de la défoliation sur la production de biomasse (biomasse résiduelle + biomasse récoltée) des parties aériennes (Tableau 12); l'apport d'azote stimule 3,3 fois la production de biomasse des parties aériennes des plantes non défoliées ($P < 0,001$), mais n'a aucun effet sur les plantes défoliées ($P = 0,223$). La défoliation diminue de 27% la production de biomasse des parties aériennes des plantes fertilisées ($P = 0,023$), mais n'a pas d'effet significatif sur les plantes non fertilisées ($P = 0,178$) (Figure 28a, d).

La fertilisation et la défoliation n'ont pas d'effet sur la production de biomasse racinaire. (Figure 28b, e ; Tableau 12). Le rapport de biomasse racines sur parties aériennes (PR/PA) est diminué de 61% en moyenne par l'apport d'azote mais n'est pas affecté par la défoliation (Figure 28c, f ; Tableau 12).

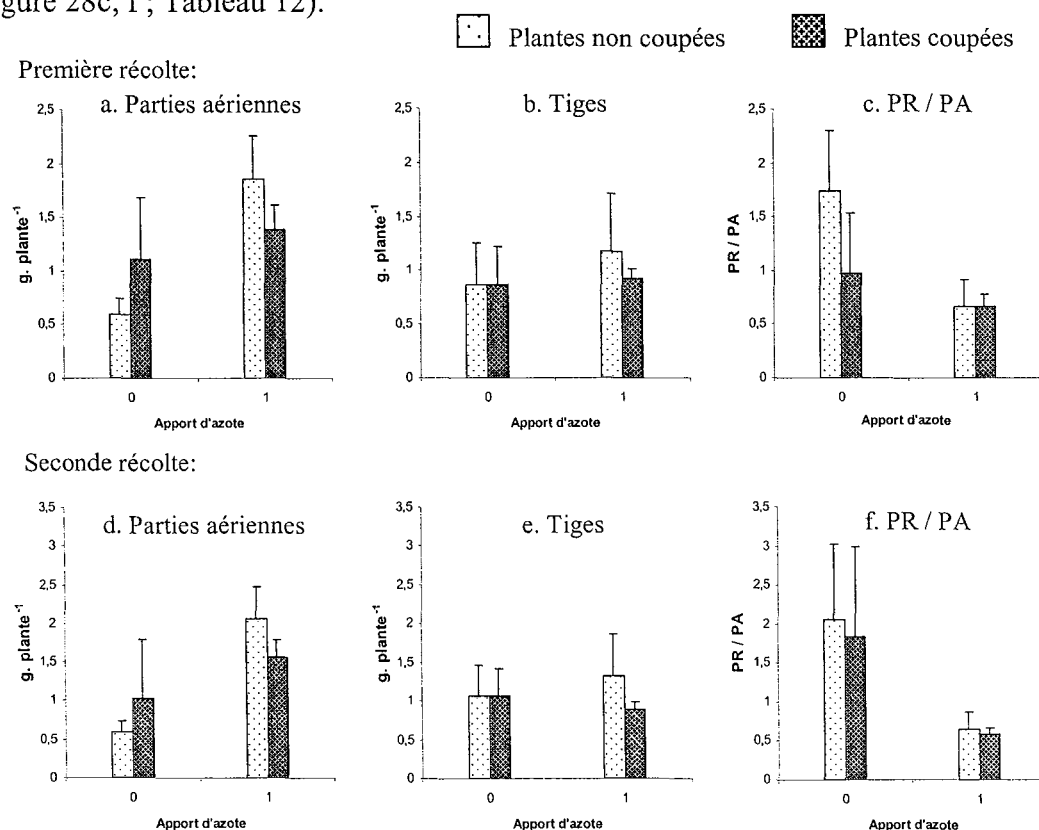


Figure 28 : Production de biomasse sèche des plantes (g plante⁻¹, biomasse défoliée + biomasse récoltée) et ratio racines parties aériennes, 2 et 4 jours après la coupe dans les parcelles mono spécifiques de ray grass avec (1) ou sans (0) apport d'azote. Les barres verticales correspondent aux intervalles de confiance (n=3).

2.2. Concentrations en carbone total, azote total des organes végétaux et en glucides totaux dans les racines

La défoliation réduit la concentration en carbone dans les feuilles et les tiges respectivement de 12 et 7% en moyenne, mais n'a aucune conséquence sur la concentration en C des racines. L'apport d'N augmente la concentration en C des racines et des tiges respectivement de 7 et 9% en moyenne, mais ne modifie pas la concentration en carbone des feuilles (Figure 29 et Tableau 12).

L'apport d'azote augmente les concentrations en azote dans la plante, avec 111, 101 et 38% d'augmentation dans les feuilles, les tiges et les racines, respectivement (Figure 29 et Tableau 12). La défoliation réduit la concentration en azote des feuilles de 27% lors du 1^{er} échantillonnage ($P=0,022$) mais n'a aucun effet lors du second ($P=0,585$). La défoliation augmente la concentration en azote dans les tiges de 14% en moyenne pour les deux échantillonnages. La concentration en azote des racines reste inchangée (Figure 29 et Tableau 12). Entre les deux récoltes, la concentration en carbone et en azote dans les racines est diminuée de 16 et 8%, alors que les concentrations dans les feuilles et les tiges restent équivalentes (Figure 29 et Tableau 12). Les rapports C/N des différents organes de la plante sont significativement diminués par l'apport d'azote, alors que la défoliation augmente ce ratio dans les racines, le diminue dans les tiges et n'a pas d'effet significatif dans les feuilles.

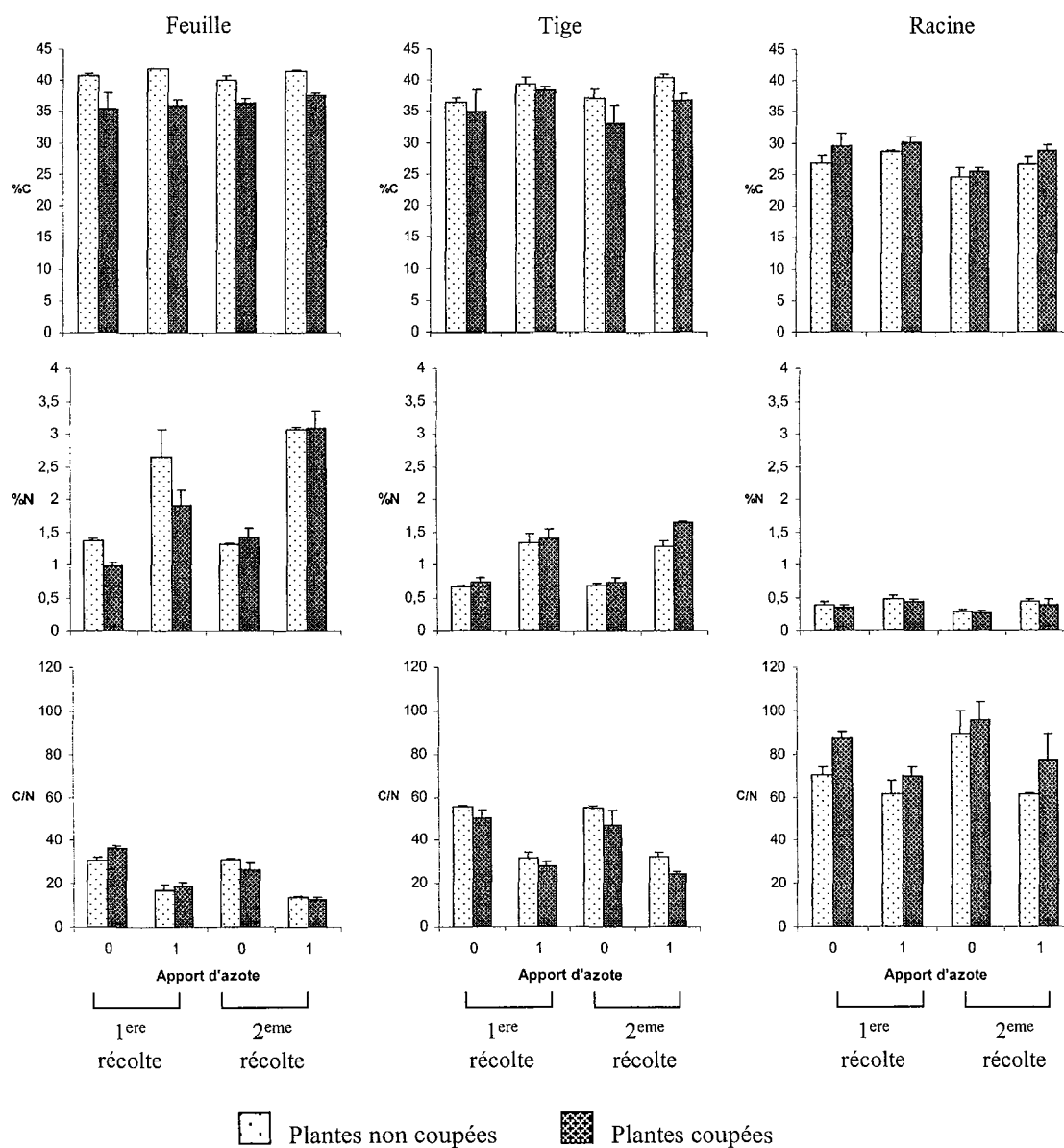


Figure 29 : Concentrations en carbone et en azote, exprimées en pourcentage de la MS dans les feuilles, les tiges, les racines, ratio C/N dans les feuilles les tiges et les racines, 2 (1^{ère} récolte) et 4 (2^{ème} récolte) jours après la coupe des plants de ray grass avec (1) ou sans (0) apport d'azote. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

La défoliation augmente la concentration en glucides totaux dans les tissus racinaires de 26% et de 18% respectivement lors de la première et de la seconde récolte ($P=0,001$; $P=0,021$). L'apport d'azote n'a pas d'effet sur ce paramètre (Figure 30).

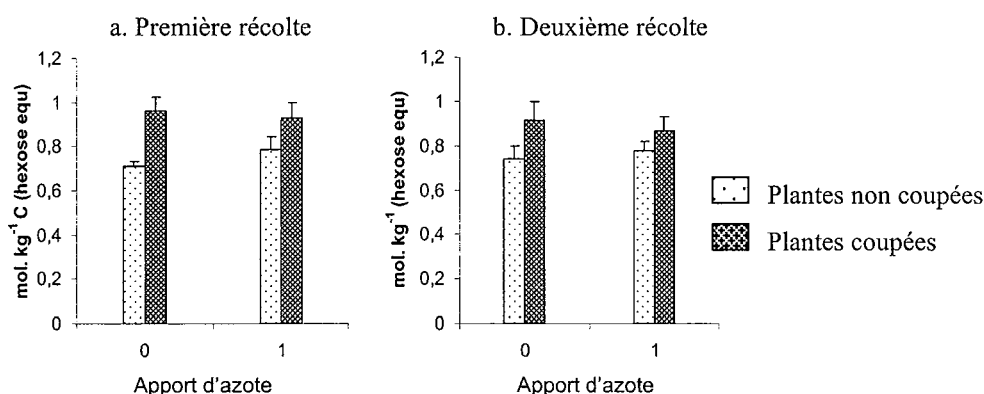


Figure 30 : Concentrations en glucides totaux dans les racines, exprimée en mol. kg⁻¹ de carbone en équivalent hexose pour les différents traitements (0 : sans apport d'azote, 1 : avec apport d'azote), 2 (a) et 4 (b) jours après la coupe. Les barres verticales correspondent aux intervalles de confiance (n=3).

2.3. Concentration en carbone et en azote du sol

Les concentrations en carbone total, carbone soluble et azote total du sol ne sont pas modifiées par la défoliation et l'apport d'azote (Figure 31, Tableau 12).

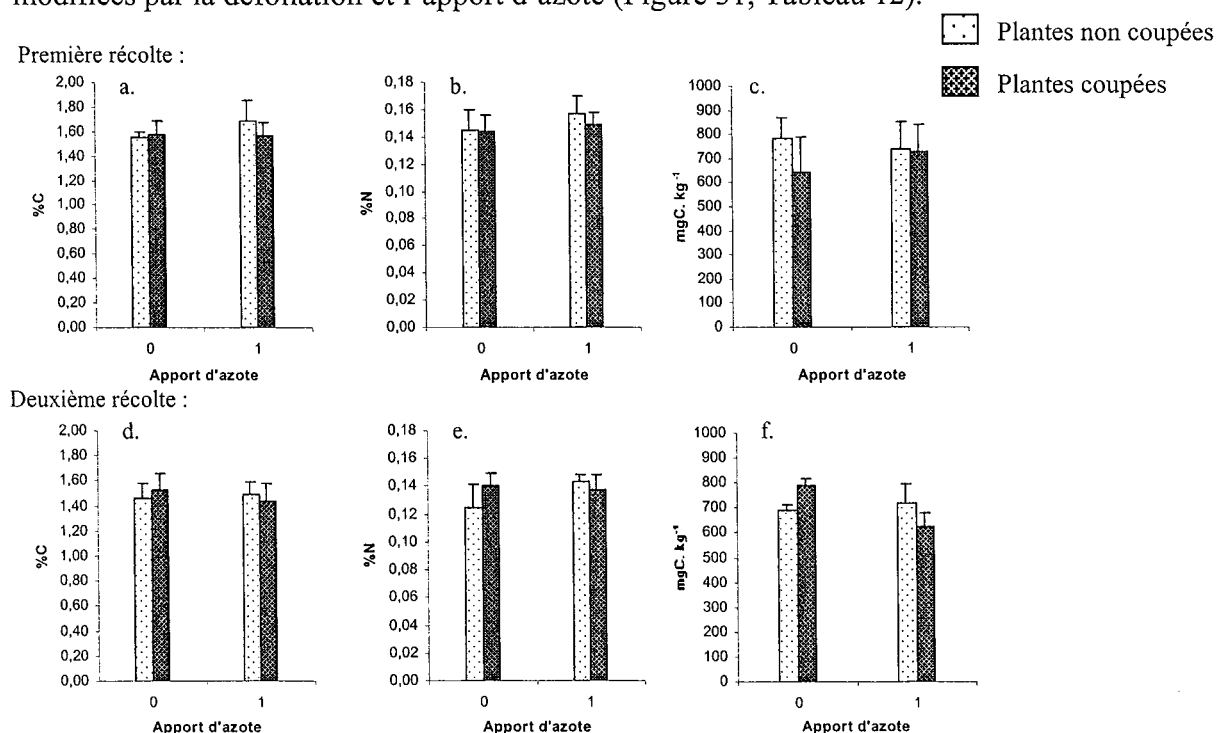


Figure 31 : Pourcentage de carbone (a, d) et d'azote total (b,e) ; concentration en carbone soluble (mg.kg⁻¹ de sol sec ; c, f) dans le sol adhérent (SA) des plantes coupées et des plantes non coupées issues des parcelles fertilisées (1) et non fertilisées (0) après la première (a, b, c) et la seconde récolte (d, e, f). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

2.4. Compartiment microbien

Le carbone et l'azote (mg C. kg^{-1} et mg N. kg^{-1}) de la biomasse microbienne du SA reste inchangée pour les deux dates d'échantillonnage quel que soit le traitement (Figure 32 et Tableau 12).

Dans le cas du test ^{14}C -glucose, la proportion de ^{14}C ajouté qui est respirée par la biomasse microbienne est diminuée par l'apport d'azote au 1^{er} prélèvement ($P=0,018$). Aucun autre effet de N ou de la défoliation est observé; le ratio $^{14}\text{CO}_2/^{14}\text{Cfe}$ n'est pas significativement affecté par la fertilisation azotée et la défoliation, pour les deux dates de prélèvement (Figure 32 et Tableau 12).

Le nombre de bactéries cultivables à stratégie r (2 jours d'incubation) n'est pas modifié par les traitements (Figure 32 et Tableau 12). Les profils d'activité cataboliques des micro-organismes (Biolog[®], après 72h d'incubation) ne sont pas significativement affectés par la défoliation et la fertilisation azotée aux deux d'échantillonnage; l'indice de Shannon correspondant à la diversité d'utilisation des substrats carbonés par les micro-organismes du sol adhérent reste le même quel que soit le traitement (Figure 32 et Tableau 12).

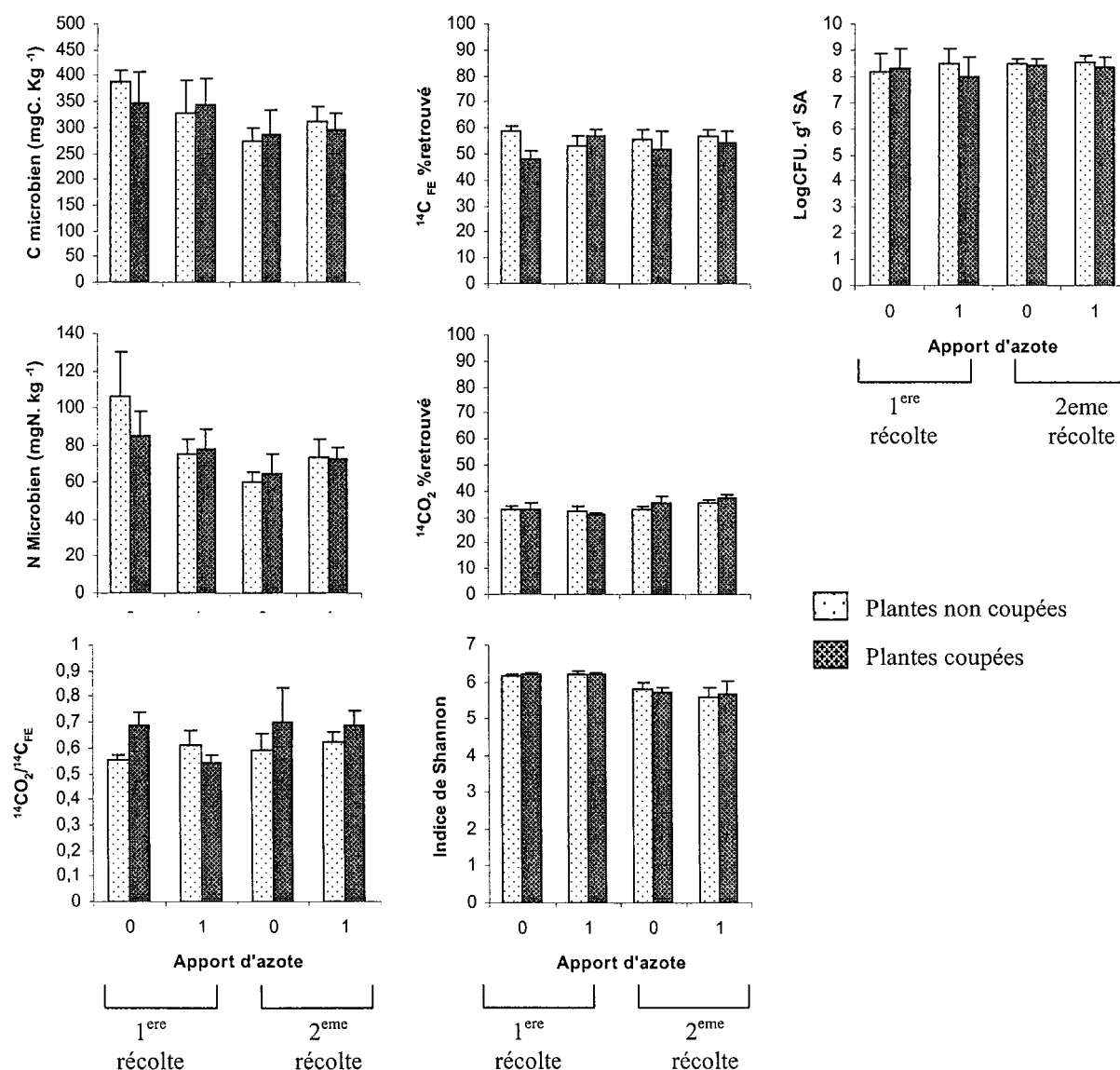


Figure 32 : Carbone et azote microbien (mg C et N par kg de sol sec) pour le sol adhérent (SA); mesure de l'activité microbienne (test glucose ¹⁴C) ¹⁴CO₂ : ¹⁴C respiré (¹⁴CO₂), ¹⁴C_{FE} : ¹⁴C de la biomasse microbienne et ¹⁴CO₂/¹⁴C_{FE} : activité microbienne exprimée proportionnellement à la biomasse microbienne dans le sol adhérent, Nombre de bactéries cultivables à stratégie r (2 jours de développement) exprimée en log de CFU (Colonies formant unités) par gramme de sol adhérent sec et indice de Shannon correspondant à la diversité d'utilisation des substrats carbonés par les micro-organismes du sol adhérent des plantes coupées et des plantes non coupées issues des parcelles fertilisées (1) et non fertilisées (0) après la première et la seconde récolte. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

2.5. Nématodes

L'abondance des nématodes herbivores est supérieure à celle des fongivores et bactérivores. La défoliation diminue l'abondance des nématodes fongivores et herbivores en moyenne de 70 et 47% respectivement, mais n'a pas d'effet significatif sur l'abondance des nématodes bactérivores, omnivores et des nématodes prédateurs. Aucun groupe de nématodes n'est affecté par l'apport d'azote (Figure 33).

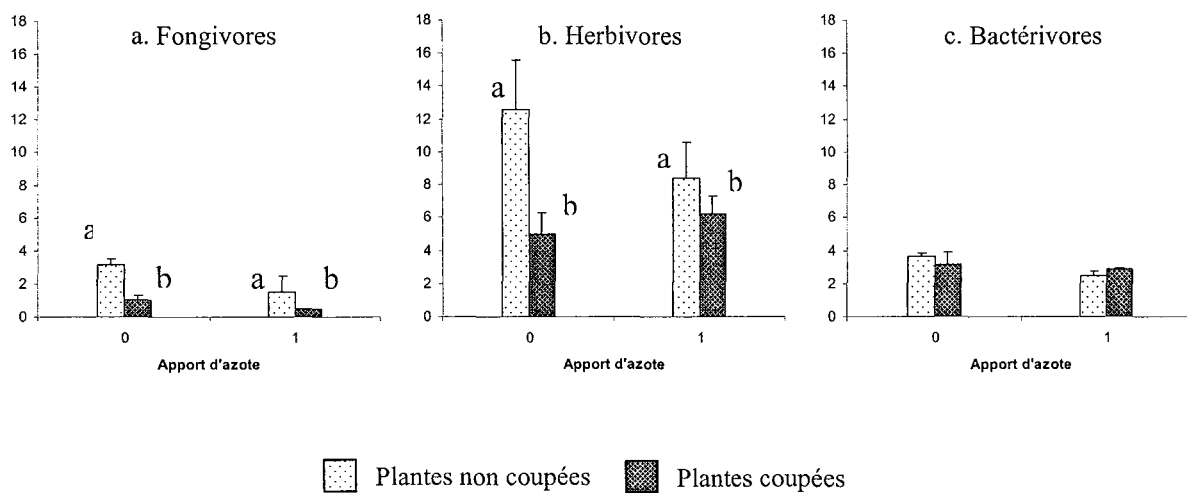


Figure 33 : Nombre de fongivores (a), herbivores (b) et bactérivores (c) par gramme de sol, dans les parcelles coupées et non coupées, fertilisées (1) et non fertilisées (0). Les barres verticales correspondent aux intervalles de confiance. Les différentes lettres montrent des différences significatives au seuil de 5%.

Défoliation et les transferts de carbone vers la rhizosphère

Variables	Défoliation		Azote		Récolte		D x N		D x R		N x R		D x N x R	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Production de biomasse</i>														
Parties aériennes	0,05	0,843	35,9	0,004	0,09	0,775	16,5	0,015	0,14	0,729	0,36	0,582	<0,01	0,976
Racines	5,24	0,084	0,83	0,413	3,52	0,134	5,06	0,088	0,11	0,757	1,84	0,247	0,16	0,71
PR /PA	2,88	0,165	24,4	0,008	0,83	0,413	2,64	0,18	0,26	0,636	1,31	0,317	0,64	0,469
C concentration (feuilles)	58	0,002	1,32	0,315	0,48	0,526	0,05	0,834	2,77	0,172	0,34	0,592	0,02	0,895
C concentration (tiges)	9,97	0,034	8,05	0,047	0,16	0,712	0,09	0,776	7,07	0,056	0,02	0,89	0,01	0,915
C concentration (racines)	2,5	0,189	9,75	0,035	8,5	0,043	<0,01	0,955	0,68	0,457	0,8	0,421	3,66	0,128
Concentration en sucre totaux (racines)	31,5	0,005	0,07	0,801	1,83	0,247	2,66	0,178	10,3	0,033	0,55	0,5	0,59	0,485
N concentration (feuilles)	9,27	0,038	336	<0,001	11,1	0,029	0,05	0,831	9,92	0,035	1,19	0,337	0,12	0,752
N concentration (tiges)	16,3	0,016	204	<0,001	0,78	0,428	2,65	0,179	0,4	0,564	0,31	0,61	0,69	0,454
N concentration (racines)	3,25	0,146	13,5	0,021	7,81	0,049	0,12	0,744	0,06	0,825	1,92	0,238	0,48	0,527
C /N feuilles	0,37	0,578	152	<0,001	17,8	0,014	0,01	0,93	10,3	0,033	0,02	0,909	2,22	0,211
C /N tiges	105	0,001	204	<0,001	0,95	0,385	4,09	0,113	0,62	0,476	0,02	0,891	0,1	0,765
C /N racines	21,2	0,01	10,7	0,031	3,55	0,133	<0,01	0,966	0,03	0,867	1,25	0,326	1,14	0,345
<i>Sol adhérent</i>														
C Totale	0,65	0,465	0,1	0,773	12,5	0,024	7,01	0,057	0,58	0,488	1,91	0,24	0,02	0,893
Carbone soluble	0,5	0,524	0,92	0,392	0,01	0,926	0,02	0,889	1,08	0,407	2,42	0,18	3,98	0,184
N Totale	<0,01	0,968	2,38	0,197	6,02	0,07	1,92	0,239	1,48	0,291	0,01	0,946	0,86	0,406
<i>Compartiment microbien</i>														
C microbien	0,14	0,723	0,01	0,923	7,8	0,048	0,14	0,723	1,76	0,277	0,62	0,473	14,3	0,032
N microbien	2,64	0,151	0,02	0,884	18,9	0,006	4,51	0,073	1,02	0,388	11,9	0,016	1,87	0,265
¹⁴ CO ₂	0,26	0,64	0,76	0,434	23,9	0,008	0,35	0,586	2,51	0,188	10,6	0,031	0,13	0,734
¹⁴ C _{FF}	3,33	0,142	1,16	0,342	0,02	0,907	6	0,07	<0,01	0,989	<0,01	0,961	1,65	0,269
¹⁴ CO ₂ / ¹⁴ C _{FF}	2,01	0,229	1,36	0,309	4,93	0,091	2,87	0,165	0,46	0,534	1,45	0,295	0,76	0,432
Strategie r bacterie	2,14	0,217	<0,01	0,972	7,65	0,051	2,31	0,203	0,06	0,825	<0,01	0,963	0,64	0,47
Strategie k bacterie	2,65	0,179	<0,01	0,967			0,27	0,633						
Indice de Shannon	0,01	0,933	0,22	0,666	11,4	0,028	0,62	0,476	0,04	0,844	0,27	0,629	1,62	0,272

Tableau 12 : Résultats des analyses statistiques pour les différents paramètres analysés : Production de biomasse, concentration en C et en N et ratio C/N dans les différents organes de la plante, Concentration en carbone, azote total et carbone soluble du sol adhérent, C et N microbien, activité microbienne (test glucose ¹⁴C), éalement bactérien et test Biolog® (indice de Shannon). Les effets défoliation, azote et date de récolte sont testés, ainsi que les interactions Défoliation X Azote, Défoliation X Récolte, Azote X Récolte, Défoliation X Azote X Récolte. Les effets sont considérés comme significatifs au seuil de 5%.

III. Discussion

A notre connaissance, cette étude est la première s'intéressant aux conséquences de la défoliation sur la plante, les micro-organismes du sol et leurs prédateurs sur des plantes se développant dans un couvert végétal au champ. En effet, tous les travaux précédents ont été conduits en conditions contrôlées et étudiaient indépendamment les plantes et les micro-organismes (Dyer et Bokhari 1976; Bokhari 1977; Delting et Painter 1983; Holland *et al.*, 1996; Paterson et Sim 1999, 2000; Hamilton et Frank 2001; Paterson *et al.*, 2003). Nous souhaitons maintenir un réalisme agronomique (notamment pour l'apport de fertilisant, la coupe à 5 cm de hauteur maintenant une surface foliaire résiduelle, échantillonnage après deux défoliations successives) pour tester l'hypothèse d'une modification de la disponibilité en C dans la rhizosphère par la défoliation.

3.1. La défoliation modifie la répartition de carbone dans la plante

Les changements quantitatifs et qualitatifs des paramètres de croissance de la plante induits par la défoliation dépendent de la disponibilité en azote dans le sol. En effet, la réponse de la plante à l'apport d'azote est forte. La fertilisation azotée stimule la production de biomasse et le ratio de biomasse racines sur parties aériennes (PR/PA) est réduit. Lorsque l'azote est limitant, une augmentation de la biomasse racinaire et de la longueur des racines est classiquement observée. Ceci permet une exploration plus importante du compartiment souterrain afin de puiser au mieux les nutriments présents dans le sol (Fitter, 1985 ; Paterson et Sim, 1999).

Après la défoliation la production de biomasse des parties aériennes dans les parcelles fertilisées est réduite. A l'inverse dans les parcelles non fertilisées, la défoliation n'affecte pas la croissance des plantes. La défoliation réduit l'assimilation de nutriment par les racines (Jarvis et Macduff, 1989; Donaghy et Fulkerson, 1998). Ainsi, l'apport d'azote ayant lieu après la coupe, la réduction de croissance des plantes défoliées présentes au sein des parcelles fertilisées, peut être le résultat de cette capacité réduite à utiliser l'azote supplémentaire disponible dans le sol. Ces données sont confirmées par le fait que l'apport d'azote n'augmente pas de manière significative la production de biomasse des parties aériennes quand les plantes sont coupées, mais stimule la production de biomasse des parties aériennes des plantes non coupées.

Au-delà de ces aspects quantitatifs, la défoliation induit des changements qualitatifs dans la répartition du carbone dans la plante. La concentration en carbone dans les talles est plus faible, alors que la concentration en glucides totaux dans les racines est significativement augmentée. Ces résultats vont à l'encontre des observations habituelles, expliquant que les plantes tolèrent la défoliation en mobilisant le carbone issu des réserves vers les méristèmes foliaires à la base des talles, au dépend des racines (Caldwell *et al.*, 1981; Miller and Rose 1992; Briske et Richards, 1995; Strauss et Agrawal 1999). Peu de changements sont observés dans notre cas au niveau des racines, sans doute parce que les réserves y étant stockées sont peu mobilisées. L'augmentation de l'activité photosynthétique des nouvelles feuilles (Delting *et al.*, 1979 ; Richards et Caldwell, 1984 ; Hiernaux et Turner, 1996) conjointement à la remobilisation des réserves présentes à la base des talles (Morvan-Bertrand *et al.*, 1999a, b) contribuent à la repousse de la plante.

Le modèle d'allocation du carbone dans la plante illustre la stratégie qu'adopte les plantes défoliées en stockant préférentiellement le carbone dans des organes moins accessibles pour les herbivores (base des talles, racines).

3.2. La disponibilité en carbone et en azote dans la rhizosphère n'est pas modifiée par la défoliation

La disponibilité en carbone dans la rhizosphère est le moteur des activités microbiennes dans la rhizosphère, qui en retour vont influencer le fonctionnement de la plante. En effet l'accroissement de l'activité photosynthétique chez les plantes défoliées couramment observée (Delting et Painter, 1983; Richards et Caldwell, 1985) n'est pas simplement une réponse physiologique de la plante à la défoliation, incluant une remobilisation des ressources vers les parties aériennes, mais est également le résultat d'un rétrocontrôle positif entre les plantes coupées et les communautés microbiennes de la rhizosphère. Ces communautés, dont le développement et l'activité dépendent de la disponibilité en C facilement assimilable, minéralisent les nutriments et les rendent ainsi disponibles pour la plante. Par conséquent, il est primordial d'évaluer si la défoliation peut moduler la disponibilité en carbone pour les micro-organismes.

Des études précédentes menées par l'équipe, montrent une relation positive entre la concentration en composés solubles dans les racines et la rhizodéposition (Marchand, 2003 ; Henry, 2004). Cette même relation a été mise en évidence dans d'autres travaux (Mikola et

Kytöviita, 2002; Dilkes *et al.*, 2004). L'augmentation de l'allocation de photo-assimilats aux racines après la coupe (Holland *et al.*, 1996) ainsi que l'accroissement de la concentration en carbone soluble dans les racines des plantes défoliées (Paterson et Sim, 1999) devrait donc logiquement entraîner une stimulation de la rhizodéposition carbonée. Or, nos résultats ne confirment pas cette relation; l'augmentation de la concentration en composés solubles dans les racines suite à la défoliation n'est pas accompagnée d'une plus grande disponibilité en C dans la rhizosphère. Cette relation contradictoire a été également observée par Paterson *et al.* (2003) qui montrent que la coupe diminue la concentration en C soluble dans les racines de fétuque rouge mais augmente l'exsudation racinaire. Murray *et al.* (2004) a récemment montré qu'il n'y avait pas de changement significatif de l'exsudation de carbone total par les racines de *Agrostis capillaris* suite à une défoliation. Dans d'autres études sur les graminées, la libération de carbone par les racines augmente (Holland *et al.*, 1996 ; Paterson et Sim, 1999, 2000; Paterson *et al.*, 2003) ou diminue (Mikola et Kytöviita, 2002 ; Nguyen et Henry, 2002 ; Dilkes *et al.*, 2004) après la défoliation.

L'activité et la biomasse microbienne, ainsi que l'abondance des nématodes bactérivores montrent également que la disponibilité en composés carbonés labiles dans la rhizosphère n'est probablement pas affectée par la défoliation.

Toutes ces études suggèrent que les conséquences de la défoliation sur la libération de carbone par les racines sont controversées et donc difficiles à prédire. Ces études diffèrent cependant de la nôtre et entre elles au niveau des espèces utilisées, du régime de coupe ou encore de la fraction du carbone assimilé mesuré dans la rhizosphère (Mikola et Kytöviita, 2002). Face à ces travaux, nos résultats ont l'avantage d'avoir été obtenus dans des conditions de plein champ en respectant un réalisme agronomique. Dans ce contexte, la défoliation n'a pas d'effets majeurs sur l'allocation de C à la rhizosphère.

La moindre densité de nématodes herbivores (se nourrissant notamment de débris racinaires) est probablement causée par une modification de la qualité des tissus racinaires après la coupe (ratio C/N plus élevé). Cependant, il est fréquent d'observer une augmentation de la qualité des tissus racinaires après la coupe (Seastedt, 1985; Seastedt *et al.*, 1988 ; Hokka *et al.*, 2004). Pour ce qui est des fongivores, la réponse est plus inattendue. Leur abondance est diminuée après la coupe. Celle-ci dépend directement du développement des champignons. Dans nos analyses nous n'avons pas de mesure directe des conséquences de la défoliation sur le

compartiment fongique. Un moindre développement de ce dernier a pu réduire l'abondance des fongivores.

La fertilisation azotée n'affecte pas la communauté de nématodes du sol. La seule conséquence observable de l'apport d'azote concerne l'activité minéralisatrice des micro-organismes après la première récolte. Cette dernière est réduite et peut illustrer une plus faible compétition entre la plante et les micro-organismes lorsque l'azote n'est pas limitant.

Hamilton et Frank (2001) ont récemment montré que l'augmentation de la libération de carbone par les racines de *Poa pratensis* après la coupe stimule la croissance des micro-organismes, augmente la disponibilité en azote dans la rhizosphère et finalement engendre un accroissement de la concentration en N dans les parties aériennes des plantes défoliées. Contrairement à ces travaux et à ceux d'Hokka *et al.* (2004) montrant une forte augmentation de la concentration en azote chez *Phleum pratense* après la coupe, dans notre cas, la défoliation n'a qu'un faible impact sur la concentration en azote dans la plante. Ainsi, dans notre étude, la disponibilité en azote dans la rhizosphère n'est probablement pas augmentée par la défoliation car la libération de C, la croissance et l'activité microbienne ne sont pas stimulées.

IV. Conclusion

Dans notre expérimentation au champ, la défoliation n'engendre pas de modifications de la quantité de composés organiques libérés par les racines ou les variations des flux d'exsudation sont beaucoup trop faibles pour provoquer des variations de la biomasse, de l'activité ou de la structure du compartiment microbien dans les quatre premiers jours suivant la coupe.

En revanche, cette expérimentation montre que la libération de composés organiques par les racines n'est pas toujours dépendante de la concentration en carbone soluble intra-racinaire. Ainsi, dans le cadre de cette étude, la concentration en carbone soluble dans les racines ne constituerait pas un bon indicateur de la rhizodéposition, contrairement à ce qui est classiquement observé en conditions plus contrôlées au laboratoire.

G. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La rhizosphère constitue une interface par laquelle transitent des composés organiques libérés par les racines. Cet efflux, qui contribue aux transferts de C d'origine végétale vers le sol, est étroitement dépendant du fonctionnement de la plante.

Ainsi, dans ce contexte, notre travail vise à étudier le **couplage entre l'écophysiologie de la plante et la rhizodéposition**. Nous avons choisi de travailler sur une graminée pérenne : le ray grass anglais *Lolium perenne* L. Cette plante possède des **réserves carbonées** qui sont périodiquement remobilisées et reconstituées du fait des régimes de défoliation et des rythmes nycthéméraux et saisonniers ponctuant sa période de vie. Ces réserves carbonées sont susceptibles de contribuer aux flux de rhizodéposition.

Nous nous sommes placés dans un premier temps à l'échelle de la plante indépendante de son environnement afin de **définir la contribution du carbone récemment assimilé par la plante à la rhizodéposition**. La contribution du carbone issu de la remobilisation des réserves aux transferts de C à la rhizosphère n'avait jusqu'alors jamais étudiée. Cependant, il est reconnu qu'en fonction de leur origine le long du système racinaire, **la nature biochimique des rhizodépôts** varie, ce qui affecte l'activité et le développement microbien dans la rhizosphère, modifiant en retour par le jeu de rétro-contrôles la croissance et la physiologie de la plante.

Pour appréhender cette question, nous avons développé pour la première fois au laboratoire **un double marquage long des parties aériennes** des plantes ($^{14}\text{CO}_2$ / $^{13}\text{CO}_2$). Cette technique nous est apparue comme étant la plus adaptée pour déterminer *in situ* la contribution à la rhizodéposition du C anciennement assimilé par la plante par rapport à celle du C nouvellement assimilé. Contrairement à ce qui est admis généralement, **le C ancien apparaît comme contribuant significativement à la rhizodéposition**. Cependant, **nos résultats ne permettent pas de quantifier la part de C récent et de C ancien** composant les flux de rhizodéposition. Cette première étude devra être complétée pour quantifier *in situ* ou en conditions hydroponiques la part du C ancien et du C nouveau retrouvée dans la rhizodéposition (marquages longs et pulses). De plus, une étude ciblée sur la racine devrait permettre de quantifier ces 2 flux de rhizodéposition au niveau des sites d'exsudation (zone d'élongation et apex notamment).

Dans un second temps nous avons élargi notre travail à la plante interagissant avec son environnement. Nous avons ainsi cherché à **évaluer comment des contraintes subies par les parties aériennes de la plante modulent les flux de C récent vers la rhizosphère**. En conditions contrôlées, les facteurs étudiés (CO_2 , défoliation, disponibilité en azote dans le sol) modulent les flux de C vers le sol et notamment les flux de rhizodéposition. Ainsi, les caractéristiques biotiques (micro-organismes) et abiotiques (structure, physicochimie) du sol sont modifiées et affectent les cycles biogéochimiques dans la rhizosphère et plus largement la qualité des sols.

En est-il de même sur des dispositifs de terrain conduits de manière intensive mais conservant un réalisme écologique et agronomique ? Peu d'études s'intéressent aux variations des flux de rhizodéposition à l'échelle de la plante interagissant avec son environnement.

L'utilisation du ^{14}C et du ^{15}N au laboratoire et d'indicateurs au champ de la disponibilité en C dans la rhizosphère nous ont semblé être les outils les plus adéquats à mettre en œuvre. Ainsi, notre étude a **contribué au développement d'outils pour estimer ou mesurer la rhizodéposition** (marquages isotopiques des parties aériennes, détermination de nématodes comme indicateurs de disponibilité en C dans la rhizosphère...).

Nos observations montrent qu'en conditions de plein champ, le fonctionnement de la plante est conditionné par l'ensemble des interactions entre tous les facteurs de l'environnement (gestion de la parcelle cultivée, climat...). C'est pourquoi, des effets nets de certains facteurs (comme ceux du CO_2 ou de la défoliation) observés en conditions contrôlées sont beaucoup moins marqués dans nos conditions de plein champ.

Notre étude montre que **la disponibilité en azote dans le sol est un facteur déterminant** la réponse des plantes à l'élévation des concentrations en CO_2 ou à la défoliation. Sous atmosphère enrichie en CO_2 , l'azote est le moteur de la réponse de la production de biomasse des plantes au CO_2 . La défoliation, après un apport d'azote, réduit la biomasse des plantes, alors qu'à l'inverse, sur les parcelles non fertilisées, la défoliation n'affecte pas la croissance des plantes.

Les **flux de rhizodéposition apparaissent comme fluctuants, déterminés par le statut physiologique de la plante** en réponse aux conditions environnementales et à la gestion agronomique (fauche, fertilisation N). Par ailleurs, en développant des indicateurs de la

rhizodéposition carbonée, l'équipe a précédemment démontré en conditions contrôlées une corrélation positive entre la concentration en C soluble racinaire et la concentration en C soluble dans la rhizosphère. Nos résultats obtenus en conditions naturelles ne le montrent pas pour les plantes défoliées, malgré un accroissement de la concentration en glucides totaux dans les racines. Ainsi, cette relation simple n'est probablement pas valide lorsque des facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement racinaire interviennent sur la physiologie de la racine.

La contribution de la rhizodéposition aux entrées de C dans le sol est donc difficile à prédire et à modéliser. Pour en rendre compte, il est nécessaire d'appréhender ces flux tout au long de la saison de croissance.

Au travers de ce travail nous n'avons évalué qu'un des volets concernant les facteurs modulant les flux de rhizodéposition. Outre des contraintes appliquées aux parties aériennes de la plante, des contraintes appliquées au niveau du système racinaire peuvent influencer la rhizodéposition et les processus lui étant associés. En effet, l'architecture racinaire, le nombre d'apex racinaires, peuvent être affecté par l'environnement « sol ». Des contraintes mécaniques, des variations de températures ou d'humidité (relatives aux changements climatiques) peuvent modifier la morphologie du système racinaire, et affecter quantitativement et qualitativement la rhizodéposition. C'est alors le contrôle de la rhizodéposition par l'environnement racinaire qu'il serait nécessaire d'étudier.

Suite à ce travail il est nécessaire de s'interroger sur à l'intérêt de mesurer les flux de rhizodéposition puisque ces derniers ne varient que très faiblement en conditions de plein champ lorsque les plantes sont soumises à des contraintes tenant à l'environnement ou aux pratiques agronomiques. En effet, dans des agro-systèmes prairiaux intensifs tels que ceux qui ont constitué le cadre de notre étude, la rhizodéposition n'apparaît pas comme contribuant de manière significative à l'apport de C au sol. Ainsi, il paraît difficile d'agir sur la composante quantitative de la rhizodéposition par le biais de la plante afin d'améliorer la gestion et la qualité agro-environnementales des sols. Cependant, **l'activité biologique est la clé du fonctionnement de la rhizosphère.** Cette activité biologique dépend de la totalité du C entrant dans le sol (détritosphère et rhizosphère), aussi bien par le biais de la rhizodéposition, du renouvellement racinaire ou encore de la chute de litière. Celle-ci contrôle le fonctionnement des sols, comme nous avons pu l'observer sur le dispositif FACE où l'activité

minéralisatrice des micro-organismes est accrue. Cette activité provoque une libération sous forme de CO₂ plus rapide du C supplémentaire entrant dans le sol du fait d'une production de biomasse végétale stimulée sous atmosphère enrichie en CO₂. Au-delà du flux quantitatif de rhizodéposition, la qualité des rhizodépôts mais également la qualité de l'ensemble des composés carbonés issus de la plante (débris racinaires, litière) contrôlent l'activité et le développement des micro-organismes. En modifiant les relations source-puits dans la plante la nature des composés libérés par la plante peut varier influençant ainsi l'activité, la composition et le développement des micro-organismes. En conditions de plein champ, c'est donc **le couplage entre l'écophysiologie de la plante, la nature biochimique des composés libérés dans sol (dont les rhizodépôts font partie) et l'activité biologique du sol** qui serait intéressant d'étudier en vue de comprendre les processus clés du fonctionnement rhizosphérique et d'améliorer la gestion et la qualité agro-environnementale des sols.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamczyk J., Hesselsoe M., Iversen N., Horn M., Lehner A., Nielsen PH., Schloter M., Roslev P., Wagner M.** 2003. The Isotope Array, a New Tool That Employs Substrate-Mediated Labeling of rRNA for Determination of Microbial Community Structure and Function. *Applied Environmental Microbiology*, **69(11)**, 6875 – 6887.
- Aeschlimann U.** 2003. Effects of elevated atmospheric pCO₂ on net ecosystem CO₂ exchange in managed grassland. PhD Thesis ETH Zurich.
- Ainsworth ED., Hymus GJ., Osborne CP., Rogers A., Blum H., Nösberger J., Long SP.** 2003 a. Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilisation levels under Free Air CO₂ enrichment (FACE). *Plant, Cell and Environment* **26**, 705-714.
- Ainsworth EA., Rogers A., Blum H., Nösberger J., Long SP.** 2003 b. Variation in acclimation of photosynthesis in *Trifolium repens* after eight years of exposure to Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Journal of Experimental Botany* **54**, 2769-2774.
- Allard V., Robin C., Newton PCD., Lieffering M., Soussana JF.** 2005. Short and long-term effects of elevated CO₂ on *Lolium perenne* rhizodeposition and its consequences on soil organic matter turnover and plant N yield. *Soil Biology and Biochemistry*, sous presse.
- Amthor JS.** 1995. Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO₂] in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biology* **1**, 243–274.
- Amthor JS.** 1997. Plant respiratory responses to elevated carbon dioxide partial pressure. In: Allen LH, Kirkham MB, Olszyk DM, Whitman CE, eds. *Advances in carbon dioxide effects research*. Madison, WI: American Society of Agronomy, 35-77.
- Andersen CP.** 2003. Source-sink balance and carbon allocation below ground in plants exposed to ozone. *Tansley Review, New Phytologist* **157**, 213-228.
- Andrews JA., Harrison KG., Matamala R., Schlesinger WH.** 1999. Sequestration of root respiration from total soil respiration using carbon-13 labelling during Free Air Carbon Dioxide Enrichment (FACE). *Soil Science Society of American Journal* **63**, 1429-1435.
- Arnold JA., Körner C.** 1995. Soil and biomass carbon pools in model communities of tropical plants under elevated CO₂. *Oecologia* **104**, 61-71.

- Avice JC.** 1996. Mobilisation des réserves azotées et carbonées chez *Medicago Sativa* L.: Etude par marquage ^{15}N et ^{13}C , caractérisation des protéines de réserve du pivot et relations avec le potentiel de repousse après la coupe. Thèse, Université de Caen.
- Balesdent J., Balabane M.** 1992. Maize root derived soil organic carbon estimated by natural ^{13}C abundance. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 97-101.
- Balesdent J., Balabane M.** 1996. Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1261-1263.
- Bally R., Heulin T., Lemenceau P.** 1999. Les microbes et le cultivateur. *Biofutur*, 17-19.
- Benizri E., Baudoin E., Guckert, A.** 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Tech* **11**, 557-574.
- Benoit P., Chone T., Barriuso E.** 1994. On line measurement of total C and ^{14}C of ^{14}C labelled organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **0**, 1-5.
- Berntson GM., Bazzaz FA.** 1997. Nitrogen cycling in microcosms of yellow birch exposed to elevated CO_2 : simultaneous positive and negative below-ground feedbacks. *Global Change Biology* **3(3)**, 247-258.
- Billes G., Rouhier H., Bottner P.** 1993. Modifications of the carbon and nitrogen allocation in the plant (*Triticum aestivum* L.). Soil system in responses to increased atmospheric CO_2 concentration. *Plant and Soil* **157**, 215-225.
- Bokhari UG.** 1977. Regrowth of western wheatgrass utilizing ^{14}C -labelled assimilates stored in belowground parts. *Plant and Soil* **48**, 115-127.
- Bret-Harte MS., Silk WK.** 1994. Nonvascular, symplasmic diffusion of sucrose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of *Zea mays* L. *Plant Physiology* **105**, 19-33.
- Briske DD., Richards JH.** 1995. Plant responses to defoliation: a physiological, morphological and demographic evaluation. *Wildland plants: physiological ecology and developmental morphology* (eds. D.J. Bedunah & R.E. Sosebee), pp. 635-710. Soc. for Range Manage., Denver, CO.
- Broughton LC., Gross KL.** 2000. Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia* **125**, 420-427.
- Butler JL., Bottomley PJ., Griffith SM., Myrold DD.** 2004. Distribution and turnover of recently fixed photosynthate in ryegrass rhizospheres. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 371-381.
- Caldwell MM., Richards JH., Johnson DA., Nowak RS., Dzurec RS.** 1981. Coping with herbivory: Photosynthetic capacity and resource allocation in two semi-arid *Agropyron* bunchgrasses. *Oecologia* **50**, 14-24.

- Cardon ZG.** 1996. Influence of rhizodeposition under elevated CO₂ on plant nutrition and soil organic matter. *Plant and Soil* **187**: 277-288.
- Casella E., Soussana JF.** 1997. Long-term effect of CO₂ enrichment and temperature increase on the carbon balance of a temperate grassward. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1309-1321.
- Cechin I.** 1998. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in two hybrids of sorghum under different nitrogen and water regimes. *Photosynthetica* **35(2)**, 233-240.
- Chen G., Zhu HL., Zhang Y.** 2003. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in microbiology* **154**, 393-398.
- Cheng W., Zhang Q., Coleman DC., Carroll CR., Hoffman CA.** 1996. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1283-1288.
- Cheng W.** 1999a. Rhizosphere feedbacks in elevated CO₂. *Tree Physiology*, **19**, 313-320.
- Cheng W.** 1999b. Rhizosphere Processes under elevated CO₂. In Y. Luo, and H. Mooney (eds.) *Carbon Dioxide and Environmental Stress*. pp.245-263, Academic Press.
- Clarholm M.** 1985. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* **17**, 181-187.
- Coleman DC., Anderson RV., Cole CV., Elliott ET., Woods L., Campon MK.** 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. IV. Flows of metabolic and biomass carbon. *Microbial Ecology* **4**, 373-380.
- Cotrufo MF., Ineson P., Scott A.** 1998. Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Global Change Biology* **4**, 43-54.
- Cralle HT., Heichel GH.** 1985. Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa. *Plant Physiology* **79**, 381-385.
- 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.
- Cure JD., Acock B.** 1986. Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology* **8**, 127-145.
- Curl EA., Truelove B.** 1986. The rhizosphere. ed. *Springer verlag*. Berlin, Germany.
- Daepp M., Suter D., Almeida JPF., Isopp H., Hartwig UA., Blum H., Nösberger J., Lüscher A.** 2000. Yield response of *Lolium perenne* swards to free air CO₂ enrichment increased over six years in a high-N-input system. *Global Change Biology* **6**, 805-816.

- Daepp M., Nosberger J., Lüscher A.** 2001. Nitrogen fertilisation and developmental stage alter the response of *Lolium perenne* to elevated CO₂. *New Phytologist* **150**, 347-358.
- Dalmastri C., Chiarini L., Cantale C., Bevivino A., Tabacchioni S.** 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbial Ecology* **38**, 273-284.
- Darrah P.R.** 1991. Models of the rhizosphere. I. Microbial population dynamics around a root releasing soluble and insoluble carbon. *Plant and Soil* **133**, 187-199.
- Darwent M.J., Paterson E., James A., McDonald S., Deri Tomos A.** 2003. Biosensor reporting of root exudation from *Hordeum vulgare* in relation to shoot nitrate concentration. *Journal of Experimental Botany* **54** (381), 325-334.
- Daunert S., Barrett G., Feliciano J.S., Shetty R.S., Shrestha S., Smith Spencer W.** 2000. Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews* **100**, 2705-2738.
- Davidson J.L., Milthorpe F.L.** 1966. Leaf growth in *Dactylis glomerata* following defoliation. *Annals of Botany* **30**, 173-184.
- Dedourge O., Vong P.C., Lasserre-Joulin F., Benizri E., Guckert A.** 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-S-35, microbial biomass-S-35 and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science* **55**, 645-656.
- De Graaff M.A., Six J., Harris D., Blum H., Van Kessel C.** 2004. Decomposition of soil and plant carbon from pasture systems after 9 years of exposure to elevated CO₂: impact on C cycling and modeling. *Global Change Biology* **10**, 1922-1935.
- Deléens E., Cliquet J.B., Prioul J.L.** 1994. Use of ¹³C and ¹⁵N plant label near natural abundance for monitoring carbon and nitrogen partitioning. *Australian Journal of Plant Physiology* **21**, 133-146.
- Delting J.K., Dyer M.L., Winn D.T.** 1979. Net photosynthesis, root respiration, and regrowth of *Bouteloua gracilis* following simulated grazing. *Oecologia* **41**, 127-134.
- Delting J.K., Painter E.L.** 1983. Defoliation responses of western wheatgrass populations with diverse histories of prairie dog grazing. *Oecologia* **57**, 65-71.
- De Visser R., Vianden H., Schnyder H.** 1997. Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by ¹³C and ¹⁵N steady-state labeling. *Plant Cell Environment* **20**, 37-46.
- Dilkes N.B., Jones D.L., Farrar J.F.** 2004. Temporal dynamics of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology* **134**, 706-715.

- 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**, 381–387.
- Donaghy DJ., Fulkerson WJ.** 1998. Priority for allocation of water-soluble carbohydrate reserves during regrowth of *Lolium perenne*. *Grass and Forage Science* **53**, 211–218.
- Drakes BG., Gonzalez Meler MA., Long SP.** 1997. More efficient plants: a consequence of rising CO₂? *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 609–639.
- Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F.** 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry* **28**, 350–356.
- Dyer MI., Bokhari UG.** 1976. Plant-animal interactions: studies of the effects of grass hopper grazing on blue grama grass. *Ecology* **57**, 762–772.
- Dyer MI., Acra MA., Wang GM., Coleman DC., Frekman DW., Mcnaughton SJ., Strain BR.** 1991. Source-sink carbon relations in two *Panicum coloratum* ecotypes in response to herbivory. *Ecology* **72**, 1472–1483.
- Fang C., Radosevich M., Fuhrmann JJ.** 2001a. Characteristaion of rhizosphere microbial community structure in five similar grass species using FAME and BIOLOG analyses. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 679–682.
- Fang C., Radosevich M., Fuhrmann JJ.** 2001b. Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 671–678.
- Farrar JF., Williams ML.** 1991. The effect of increased atmospheric carbon dioxide and temperature on carbon partitioning, source-sink relations and respiration. *Plant, Cell and Environment* **14**, 819–830.
- Farrar JF.** 1996a. Sinks - Integral parts of a whole plant. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1273–1279.
- Farrar JF.** 1996b. Regulation of root weight ratio is mediated by sucrose: Opinion. *Plant and Soil* **185**, 13–19.
- Farrar JF., Minchin PEH., Thorpe MR.** 1995. Carbon import into barley roots: effects of sugar and relation to cell expansion. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1859–1865.
- Farrar JF., Jones DL.** 2000. The control of carbon acquisition by roots. *New Phytologist* **147**, 43–53.
- Fischer BU., Frehner M., Hebeisen T., Zanetti S., Stadelmann F., Lüscher A., Hartwig UA., Hendrey GR., Blum H., Nösberger J.** 1997 Source-sink relations in *Lolium perenne* L. as reflected by carbohydrate concentrations in leaves and pseudo-stems during regrowth in a free air carbon dioxide enrichment (FACE) experiment. *Plant, Cell and Environment* **20**, 945–952.

- Fitter A.H.** 1985. Functional significance of root morphology and root system architecture. In: Fitter, A.H. (Ed.) *Ecological interactions in soil*. Oxford: Blackwell, p.87-106.
- Gammon RHE., Sundquist E., Fraser PJ.** 1985: History of carbon dioxide in the atmosphere. In: *Atmospheric carbon dioxide and the global carbon cycle* (Trabalka, Ed.), DOE/ER-0239, US Department of Energy, Washington, DC, 25-62.
- Garcia FO., Rice, CW.** 1994. Microbial biomass dynamics in tallgrass prairie. *Soil Science Society of America Journal* **58**, 816-823.
- Garland JL., Mills AL.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 2351-2359.
- Garland JL.** 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **24**, 289-300.
- Gebbing T., Schnyder H., Kubach W.** 1999. The utilization of pre-anthesis reserves in grain filling in wheat. Assessment by steady-state $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ labelling. *Plant Cell and Environment* **22**, 851-858.
- Germida JJ., Siciliano SD., Freitas JR., Seib AM.** 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol Ecology* **26**, 43-50.
- Gifford RM.** 1994. The global carbon cycle: a view point on the missing sink. *Australian Journal of Plant Physiology*, **21**, 1-15.
- Gill RA., Polley HW., Johnson HB., Anderson LJ., Maherali H., Jackson RB.** 2002. Non-linear grassland responses to past and future atmospheric CO_2 . *Nature* **417**, 279-282.
- Gorissen A.** 1996. Elevated CO_2 evokes quantitative and qualitative changes in carbon dynamics in a plant/soil system: mechanisms and implications. *Plant and Soil* **187**, 289-298.
- Gorissen A., Van Ginkel JH., Keurentjes JJB., Van Veen JA.** 1995. Grass root decomposition is retarded when grass has been grown under elevated CO_2 . *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 117-120.
- Grayston SJ., Vanghan D., Jones D.** 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* **5**, 29-56.
- Grayston SJ., Wang S., Campbell CD., Edwards AC.** 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 369-378.
- Gregory PJ., Atwell BJ.** 1991. The fate of carbon pulse-labelled crops of barley and wheat. *Plant and Soil* **136**, 205-213.

- Griffin GJ., Hale MG., Shay FJ.** 1976. Nature and quality of sloughed organic matter produced by roots of axenic plants. *Soil Biology and Biochemistry* **8**, 29-32.
- Griffiths B., Robinson D.** 1992. Root induced nitrogen mineralisation. A nitrogen balance model. *Plant and Soil* **139**, 253-263.
- Groleau-Renaud V.** 1998. Contrainte mécanique et exsudation racinaire du maïs : incidence de la morphologie du système racinaire, Thèse INPL/ENSAIA.
- Groleau-Renaud V., Plantureux S., Guckert A.** 1998. Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant and Soil* **201**, 231-239.
- Guitian FJ., Dohoo IR., Markham RJF., Conboy G., Keefe GP.** 2000. Relationships between bulk-tank antibodies to *Ostertagia ostertagi* and herd-management practices and measures of milk production in Nova Scotia dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* **47**, 79-89.
- Guckert A., Breich H., Reisinger O.** 1975. Interface sol racine. I. Etude au microscope électronique des relations mucigel-argile-microorganismes. *Soil Biology and Biochemistry* **7**, 241-250.
- Guitian R., Bardgett RD.** 2000. Plant and soil microbial responses to defoliation in temperate semi natural grassland. *Plant and soil* **220**, 271-277.
- Hageman RH., Below FE.** 1990. Role of nitrogen metabolism in crop productivity. In: ABROL, Y.P. (Ed.). *Nitrogen in higher plants*. Taunton : Research Studies, p.313-334.
- Hale MG., Foy CL., Shay FJ.** 1971. Factors affecting root exudation. *Advance in Agronomy* **23**, 89-109.
- Hale MG., Moore LD.** 1979. Factors affecting root exudation II: 1970-1978. *Advances in Agronomy* **31**, 93-124.
- Hamilton EW., Frank DA.** 2001. Plant defoliation promotes microbial nitrogen cycling through increased root exudation of carbon. *Ecology* **82**, 2397-2402.
- Hannaway D., Fransen S., Cropper J., Teel M., Chaney M., Griggs T., Halse R., Hart J., Cheeke P., Hansen D., Klinger R., Lane W.** 1999: *Perennial Ryegrass (Lolium perenne L.)*. Pacific Northwest Extension Publications, Oregon State University.
- Hart SC., Stark JM., Davidson EA.** 1994. Nitrogen mineralization, immobilization, and nitrification. Ch 42 in: Methods of Soil Analysis, Part 2. *Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series, n°5 Madison, WI.
- Hassink J.** 1997. The capacity of soils to preserve organic C and N by their association with clay and silt particles. *Plant and Soil* **191**, 77-87.

- Hebeisen T., Lüscher A., Zanetti S., Fischer BU., Hartwig UA., Frehner M., Hendrey GR., Blum H., Nösberger J.** 1997. The different responses of *Trifolium repens* L. and *Lolium perenne* L. grassland to free air CO₂ enrichment and management. *Global Change Biology* **3**, 149-160.
- Helal HM., Sauerbeck D.** 1986. Effects of plant roots carbon metabolism of soil microbial biomass. *Z. Pflanzenernährung. Bodenk* **149**, 181-188.
- Henry F.** 2004. Interactions entre la rhizodéposition de composés carbonés et la disponibilité en azote minéral chez *Lolium multiflorum* aux stades végétatifs. Thèse INPL/ENSAIA.
- Henry F., Nguyen C., Paterson E., Sim A., Robin C.** 2005. How does nitrogen availability alter rhizodeposition of *Lolium multiflorum* at vegetative stage? *Plant and Soil* in press.
- Hiernaux P., Turner M.D.** 1996. The effect of the timing and frequency of clipping on nutrient uptake and production of Sahelian annual rangelands. *Journal of Applied Ecology* **33**, 387-399.
- Higgins PAT., Jackson RB., des Rosiers JM., Field CB.** 2002. Root production and demography in a California annual grassland under elevated atmospheric carbon dioxide. *Global Change Biology* **8**, 841-850.
- Hitner L.** 1904. Über neuer Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besondere Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft* **98**, 59-78.
- Hodge A., Grayston SJ., Ord BG.** 1996. A novel method for characterisation and quantification of plant root exudates. *Plant and Soil* **184**, 97-104.
- Hodge A., Stewart J., Robinson D., Griffiths BS., Fitter AH.** 2000. Competition between roots and soil micro-organisms for nutrients from nitrogen-rich patches of varying complexity *Journal of Ecology* **88**, 150-164
- Hoffland E., Van Den Boogaard R., Nelemans J., Findenegg G.** 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytologist* **122**, 675-680.
- Høgh-Jensen H., Schjørring JK.** 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 439-448.
- Hokka V., Mikola J., Vestberg M., Setälä H.** 2004. Interactive effects of defoliation and an AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume-grass communities. *Oikos* **106**, 73-84.
- Holland JN., Cheng W., Crossley DA.** 1996. Herbivore induced changes in plant carbon allocation: assessment of below ground C fluxes using carbon 14. *Oecologia* **107**, 87-94.
- Holmes W. (ed.)** 1980 *Grass: its Production and Utilisation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Horwath WR., Van Kessel C., Hartwig UA., Harris D.** 2001. Use of ^{13}C isotopes to determine net carbon sequestration in soil under ambient and elevated CO_2 . In: Lal R, Kimble JM, Follet RF, Stewart BA, ed. *Assessment methods for soil carbon*, Boca Raton, CRC Press, 221-231.
- Hungate BA., Jackson RB., Field CB., Chapin FS.** 1996. Detecting changes in soil carbon in CO_2 enrichment experiments. *Plant and Soil* **187**, 135-145.
- Hungate BA., Holland EA., Jackson RB.** 1997. The fate of carbon in grassland under carbon dioxide enrichment. *Nature* **388**, 576-579.
- Ilmarinen K., Mikola J., Nieminen M., Vestberg M.** 2005. Does plant growth phase determine the response of plants and soil organisms to defoliation? *Soil Biology & Biochemistry* **37**, 433-443.
- Isopp H., Frehner M., Almeida JPF., Blum H., Daepf M., Hartwig UA., Lüscher A., Suter D., Nösberger J.** 2000. Nitrogen plays a major role in leaves when source sink relations change: C and N metabolism in *Lolium perenne* growing under free air CO_2 enrichment. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 851-858.
- Jaeger CH., Lindow SE., Miller W., Clark E., Firestone MK.** 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2685-2690.
- Janzen HH.** 1990. Deposition of nitrogen into the rhizosphere by wheat roots. *Soil Biology and Biochemistry* **22(8)**, 1155-1160.
- Jarvis SC., Macduff JH.** 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I. Recovery of uptake and growth and their interactions. *Journal of Experimental Botany* **40**, 965-976.
- Jensen B.** 1993. Rhizodeposition by $^{14}\text{CO}_2$ pulse labelled spring barley grown in small plots on sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* **25 (11)**, 1553-1559.
- Johansson G.** 1992. Belowground carbon distribution in barley (*Hordeum vulgare* L.) with and without nitrogen fertilisation. *Plant and Soil* **144**, 93-99.
- Johansson G.** 1993. Carbon distribution in grass (*Festuca pratensis* L.) during regrowth after cutting- utilization of stored and newly assimilated carbon. *Plant and Soil* **151**, 11-20.
- 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 ^{14}C -labelled glucose, mannose and citric acid. *Plant and Soil* **143**, 259-266.
- Jones DL., Darrah PR.** 1993. Influx and efflux of amino acids from *Zea mays* L. roots and their implications for N nutrition and the rhizosphere. *Plant and Soil* **155/156**, 87-90.

- Jones DL., Darrah PR.** 1994. Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. *Plant and Soil* **163**, 1–12.
- Jones DL., Farrar J., Giller KE.** 2003. Associative nitrogen fixation and root exudation What is theoretically possible in the rhizosphere? *Symbiosis* **35**, 19–38.
- Jones DL., Hodge A., Kuzyakov Y.** 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *Tansley review, New Phytologist* **163(3)**, 459-474.
- Jongen M., Jones MB., Hebeisen T., Blum H., Hedrey G.** 1995. The effects of elevated CO₂ concentrations on the root growth of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* grown in a FACE system. *Global Change Biology* **1**, 361-371.
- Kandeler E., Tscherko D., Jones TH.** 1998. The response of soil microorganisms and roots to elevated CO₂ and temperature in a terrestrial model ecosystem. *Plant and Soil* **202**, 251 - 262.
- Kandeler E., Marschner P., Tscherko D., Gahoonia TS., Nielsen NE.** 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil* **238**, 301–312.
- Kaye JP., Hart SC.** 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Tree* **12**, 139–143.
- Killham KS., Yeomans CV.** 2001. Rhizosphere carbon flow measurement and implications: from isotopes to reporter genes. *Plant and Soil* **232**, 91-96.
- Kimball BA.** 1983. Carbon dioxide and agricultural yield : an assemblage and analyses of 430 prior observations. *Agronomy Journal* **75**, 779-788.
- Kimball BA., Kobayashi K., Bindi M.** 2002. Responses of agricultural crops to free-air CO₂ enrichment. *Advances in Agronomy* **77**, 293-368.
- Klemetsson L., Svensson B. H., Rosswall T.** 1987: Dinitrogen and nitrous oxide produced by denitrification and nitrification in soil with and without barley plants. *Plant and soil* **99**, 303-319.
- Koch KE.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiological Plant Molecular Biology* **47**: 509–540.
- Kozdroj J., van Elsas JD.** 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J Microbiol Methods*. **43(3)**, 197-212.
- Krafczyk I., Trolldenier G., Beringer H.** 1984. Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* **16**, 315–322.
- Kudeyarov VN.** 1999. The nitrogen and carbon balance in soil. *Eurasian Soil Science* **32**, 61-69.
- Kuzyakov Y., Kretschmar A., Stahr K.** 1999. Contribution of *Lolium perenne* rhizodeposition to carbon turnover of pasture soil. *Plant and soil* **213**, 127-136.

- Kuzyakov Y., Domanski G.** 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **163**, 421–431.
- Kuzyakov Y.** 2001. Tracer studies of carbon translocation by plants from the atmosphere into the soil (a review). *Eurasian Soil Science*, **34** (1): 28-42.
- Lawlor DW., Kontturi M., Young AT.** 1989. Photosynthesis by flag leaves of wheat in relation to protein, ribulose biphosphate carboxylase activity and nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany* **40**, 43–52.
- Leavitt SW., Paul EA., Kimball BA., Hendrey GR., Mauney JR., Rauschkolb R., Rogers H., Lewin KF., Nagy J., Pinter PJ., Johnson HB.** 1994. Carbon isotope dynamics of free-air CO₂-enriched cotton and soils. *Agric. For. Meteorol.* **70**, 87-101.
- Lee N., Nielsen PH., Andreasen KH., Juretschko S., Nielsen JL., Schleifer KH., Wagner M.** 1999. Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (3), 1289-1297.
- Lekkerkerk LJA., Van de Geijn SC., Van Veen JA.** 1990. Effects of elevated atmospheric CO₂-levels on the carbon economy of a soil planted with wheat. Pp. 423-429 in: *Soils and the greenhouse effect*, Bowman A. F. ed. Chichester, John Wiley.
- Lemanceau P., Corberand T., Gardan L., Latour X., Laguerre G., Boeufgras JM., Alabouvette C.** 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1004-1012.
- Leveau JHJ., Lindow SE.** 2002. Bioreporters in microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 259-265.
- Loiseau P., Soussana JF.** 1999. Elevated CO₂, temperature increase and N supply effects on the accumulation of belowground carbon in temperate grassland ecosystem. *Plant and Soil* **210**, 233-247.
- Long SP., Jones MB., Roberts MJ.** 1992. *Primary Productivity of Grass Ecosystems of the Tropics and Sub-Tropics*. Chapman & Hall, London.
- Lueders T., Pommerenke B., Friedrich MW.** 2004. Stable-Isotope Probing of microorganisms Thriving at Thermodynamic Limits: Syntrophic Propionate Oxidation in Flooded Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10), 5778-5786.

- Luo Y., Field CB., Mooney HA.** 1994. Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated CO₂: Interaction among carbon, nitrogen and growth. *Plant, Cell and Environment* **17**, 1195-1204.
- Lynch JM.** 1991. Developments in rhizosphere microbiology. *Australian Microbiologist* **13**, 99-100.
- Lynch JM., Whipps JM.** 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* **129**, 1-10.
- Macduff JH., Jarvis SC., Mosquera A.** 1989. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. II. Assimilation of NO₃⁻ and short-term effects on NO₃⁻ uptake. *Journal of Experimental Botany* **40**, 977-984.
- Mackie-Dawson LA.** 1999. Nitrogen uptake and root morphological responses of defoliated *Lolium perenne* (L.) to a heterogeneous nitrogen supply. *Plant and Soil* **209**, 111-118.
- Marilley L., Aragno M.** 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology* **13**, 127-136.
- Marchand AL.** 2003. Etude de la rhizodéposition chez le maïs : influence de la distribution des photoassimilats aux racines et de la morphologie racinaire. Thèse INPL/ENSAIA.
- Marchand AL., Robin C., Nguyen C.** 2005. Is root-released C correlated with the shoot C-supply to the roots? Soumis à *Journal of Plant Science*.
- Marschner H.** 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. Academic Press, London.
- Marschner H., Kirkby EA., Cakmak I.** 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* **47**, 1255-1263.
- Mary B., Fresneau C., Morel JL., Mariotti A.** 1993. C and N cycling during decomposition of root mucilage, roots and glucose in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 1147-1156.
- Matthew C., Kemball WD.** 1997. Allocation of carbon-14 to roots of different ages in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Proceedings XVIII International Grasslands Congress, Canada, Section 7. pp1-2.
- Mawdsley JL., Bardgett RD.** 1997. Continuous defoliation of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) and associated changes in the microbial population of an upland grassland soil. *Biology and Fertility of Soils* **2**, 52-58.
- Meharg AA.** 1994. A critical review of labeling techniques used to quantify rhizosphere carbon flow. *Plant and Soil* **166**, 55-62.
- Meharg AA., Killham K.** 1988. A comparison of carbon flow from prelabelled and pulse labelled plants. *Plant and Soil* **112**, 225-231.

- Meharg AA., Killham K.** 1990. Carbon distribution within the plant and rhizosphere in laboratory and field grown *Lolium perenne* at different stages of developpement. *Soil Biology and Biochemistry* **22**, 471-477.
- Merbach W., Mirus E., Knof G., Remus R., Ruppel S., Russow R., Gransee A., Schulz J.** 1999. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **162**, 373-383.
- Mikola J., Setälä H.** 1998. No evidence of trophic cascades in an experimental microbial-based soil food web. *Ecology* **79**, 153-164.
- Mikola J., Yeates GW., Wardle DA., Barker GM., Bonner KI.** 2001. Response of soil food-web structure to defoliation of different plant species combinations in an experimental grassland community. *Soil Biology and Biochemistry* **33 (2)**, 205-214.
- Mikola J., Kytoviita MM.** 2002. Defoliation and the availability of currently assimilated carbon in the *Phleum pratense* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **34(12)**, 1869-1874.
- Mikola J., Ilmarinen K., Nieminen M., Vestberg, M.** 2005. Long-term soil feedback on plant N allocation in defoliated grassland miniecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, in press.
- Miller RF., Rose JA.** 1992. Growth and carbon allocation of *Agropyron desertorum* following autumn defoliation. *Oecologia* **89**, 482-486.
- Minchin PEH., Thorpe MR.** 2003. Using the short lived isotope ^{11}C in mechanistic of photosynthate transport. *Functionnal Plant Biology* **30**, 831-841.
- Mohammad F., Khan T., Afridi RM., Fatma A.** 1997. Effect of nitrogen on carbonic anhydrase activity, stomatal conductance, net photosynthetic rate and yield of mustard. *Photosynthetica* **34(4)**, 595-598.
- Montealegre CM, Van Kessel C, Blumenthal JM., Hur HG., Hartwig UA., Sadowsky MJ.** 2000. Elevated atmospheric CO_2 alters microbial population structure in a pasture ecosystem. *Global Change Biology* **6**, 475-482.
- Montealegre CM., Van Kessel C., Russelle MP., Sadowsky MJ.** 2002. Changes in microbial activity and composition in a pasture ecosystem exposed to elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant and Soil* **243**, 197-207.
- Morris SA., Radajewski S., Willison TW., Murrell JC.** 2002. Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Applied Environmental Microbiology* **68**, 1446-1453.
- Morvan-Bertrand A., Pavis N., Boucaud J., Prud'homme MP.** 1999. Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after

- defoliation : assessment by ^{13}C steady-state labelling and carbohydrate analysis. *Plant, Cell and Environment* **22**, 1097-1108.
- Morvan-Bertrand A., Boucaud J., Prud'homme MP.** 1999. Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen, and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv. Bravo following defoliation. *Journal of Experimental Botany* **341**, 1817-1826.
- Mott KA.** 1990. Sensing of atmospheric CO_2 by plants. *Plant, Cell and environnement* **3**, 731-737.
- Mulhing KH., Schubert S., Mengel K.** 1993. Role of plasmalemma H^+ ATPase in sugar retention by roots of intact maize and field bean plants. *Z Pfanzenahrung Bodenkunde* **156**, 155-161.
- Murray PJ., Ostle N., Kenny C., Grant H.** 2004. Effect of defoliation on patterns of carbon exudation from *Agrostis capillaris*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **167 (4)**, 487-493.
- Neumann G., Römhild V.** 2000. The release of root exudates as affected by the plants physiological status. In: *The Rhizosphere; Biochemic and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Hrsg.: Pinton R., Varani Z., Nannipieri P.. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc, S. 41-93.
- Nguyen C.** 2003. Rhizodeposition of organic C by plant : mechanisms and controls. *Agronomie* **23**, 375-396.
- Nguyen C., Guckert A.** 2001. Short-term utilisation of ^{14}C -[U]glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. *Soil Biology and Biochemistry* **33(1)**, 53-60.
- Nguyen C., Henry, F.** 2002. A carbon-14 glucose assay to compare microbial activity between rhizosphere samples. *Biology and Fertility of Soils* **35**, 270-276.
- Nielsen PH., Andreasen K., Lee N., Wagner M.** 1999. Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge. *Water Science and Technology* **39 (1)**, 1-9.
- Niklaus PA.** 1998. Effects of elevated CO_2 in soil microbiota in calcareous grassland. *Global Change Biology* **4**, 451-458.
- Niklaus PA., Stocker R., Körner C., Leadley PW.** 2000. CO_2 flux estimates tend to overestimate ecosystem C sequestration at elevated CO_2 . *Functional Ecology* **14**, 546-559.
- Norby RJ., O'Neill EG., Hood WG., Luxmoore RJ.** 1987. Carbon allocation, root exudation and mycorrhizal colonization of *Pinus echinata* seedlings grown under CO_2 enrichment. *Tree Physiology* **3**, 203-210.
- Norton JM., Firestone MK.** 1996. N dynamics in the rhizosphere of *Pinus ponderosa* seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* **28 (3)**, 351-362.

- Oosterheld M., McNaughton S.J.** 1988. Intraspecific variation in the response of *Themeda triandra* to defoliation: the effect of time of recovery and growth rates on compensatory growth. *Oecologia* **77**, 181-186
- O'Neill EG.** 1994. Responses of soil biota to elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant and Soil* **165**(1), 55-65.
- Ouverney CC., Fuhrman JA.** 1999. Combined Microautoradiography-16S rRNA Probe Technique for Determination of Radioisotope Uptake by Specific Microbial Cell Types In Situ. *Applied Environmental Microbiology* **65**, 1746-1752
- Painter EL., Delting J.** 1981. Effects of defoliation on net photosynthesis and regrowth of western wheat grass. *Journal of range management* **34** (1), 68-71.
- Paterson E., Hodge A., Thornton B., Millard P., Killham K.** 1999. Carbon partitioning and rhizosphere C flow in *Lolium perenne* as affected by CO₂ concentration, irradiance and below ground conditions. *Global Change Biology* **5**, 669-678.
- Paterson E., Sim A.** 1999. Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant and soil* **216**, 155-164.
- Paterson E., Sim A.** 2000. Effect of nitrogen supply and defoliation on loss of organic compounds from roots of *Festuca rubra*. *Journal of Experimental Botany* **51**(349), 1449-1457.
- Paterson E., Sim A., Pratt S.** 2003. Effects of defoliation and atmospheric CO₂ depletion on nitrate acquisition, and exudation of organic compounds by roots of *Festuca rubra*. *Plant and soil* **250**, 293-305.
- Paynel F., Murray P.J., Cliquet J.B.** 2001. Root exudates : a pathway for short term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and Soil*, **229**, 235-243.
- Pendall E., Leavitt S.W., Brooks T., Kimball B.A., Pinter P.J., Wall G.W., LaMorte R.L., Wechsung G., Wechsung F., Adamsen F., Mathias A.D., Thompson T.L.** 2001. Elevated CO₂ stimulates soil respiration in a FACE wheat field. *Basic Applied Ecology* **2**, 193-201.
- Pennanen T., Fritze H., Vanhala P., Kiikkilä O., Neuvonen S., Bååth E.** 1998. Structure of a Microbial Community in Soil after Prolonged Addition of Low Levels of Simulated Acid Rain. *Applied Environmental Microbiology* **64** (6), 2173-2180.
- Powell CE., Ryle G.J.A.** 1978. Effect of nitrogen deficiency on photosynthesis and the partitioning of ¹⁴C-labelled leaf assimilate in unshaded and partially shaded plants of *Lolium temulentum*. *Annal of Applied Biology* **90**, 241-248.

- Preston-Mafham J., Boddy J., Randerson L., Peter F.** 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiology Ecology* **42**(1), 1-14.
- Priha O., Hallantie T., Smolander A.** 1999. Comparing microbial biomass, denitrification enzyme activity, and number of nitrifiers in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings by microscale methods. *Biology and Fertility of Soils* **30**, 14-19.
- Qian JH., Doran JW.** 1996 Available carbon released from crop roots during growth as determined by carbon 13 natural abundance. *Soil Science Society of America Journal* **60**, 828-834.
- Radajewski S., Ineson P., Parekh NR., Murrell JC.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**, 646-649
- Radajewski S., Webster G., Reay DS., Morris SA., Ineson P., Nedwell DB., Prosser JL., Murrell JC.** 2002. Identification of active methyloph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. *Microbiology* **148**(8), 2331-2342.
- Ranjard L., Poly F., Nazaret S.** 2000a. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology* **151**, 167-177.
- Ranjard L., Brothier E., Nazaret S.** 2000b. Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints for Characterization and Microscale Distribution of Soil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(12), 5334-5339.
- Ranjard L., Poly F., Lata JC., Mougél C., Thioulouse J., Nazaret S.** 2001. Characterisation of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied Environmental Microbiology* **67**, 4479-4487.
- Ratray EAS., Paterson E., Killham K.** 1995. Characterisation of the dynamics of C partitioning within *Lolium perenne* and to the rhizosphere microbial biomass using ^{14}C pulse chase. *Biology and Fertility of Soil* **19**, 280-286.
- Richards JH.** 1993. Physiology of plants recovering from defoliation. *Proceeding of the XVII International Grassland Congress*, 85-94.
- Richards JH., Caldwell MM.** 1985. Soluble carbohydrates, concurrent photosynthesis and efficiency in regrowth following defoliation: A field study with *Agropyron* species. *Journal of Applied Ecology* **22**, 907-920.

- Robert M., Saugier B.** 2003. Contribution des écosystèmes continentaux à la sequestration du carbone: Contribution of terrestrial ecosystems to carbon sequestration. *Comptes Rendus Geosciences* **335**(6-7), 577-595.
- Robin C., Choné T., Guckert A.** 1987. Rôle de la position de la feuille dans l'assimilation et le transport du carbone chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). *Agronomie* **7**, 191-201.
- Rochette P., Flanagan LB.** 1997. Quantifying rhizosphere respiration in a corn crop under field conditions. *Soil Science Society of America Journal* **61**(2), 446-474.
- Rochette P., Flanagan LB., Gregorich EG.** 1999. Separating soil respiration into plant and soil components using analyses of the natural abundance of carbon 13. *Soil Science Society of America Journal* **63**(5), 1207-1213.
- Rogers A., Fischer BU., Bryant J., Frehner M., Blum H., Raines CA., Long SP.** 1998. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilisation. Perennial ryegrass under Free-Air CO₂ Enrichment. *Plant Physiology* **118**, 683-689.
- Ross DJ., Sagggar S., Tate KR., Newton PCD.** 1995. Elevated CO₂ and temperature effects on soil carbon and nitrogen cycling in rye grass/white clover turves of an Endoaquept soil. *Plant and Soil* **176**, 37-49.
- Ross DJ., Newton PCD., Tate KR.** 2004. Elevated CO₂ effects on herbage production and soil carbon and nitrogen pools and mineralization in a species-rich, grazed pasture on a seasonally dry sand. *Plant and Soil* **260**, 183-196.
- Rovira AD.** 1969. Plant root exudate. *Botany Revue* **35**, 35-57.
- Rovira AD.** 1979. Biology of the soil-root interface. In: Harley, J.L.; Russel, R.S. (Ed.) *The soil root interface*. New York: Academic Press, 145-160.
- Rovira AD., Foster RC., Martin JK.** 1979. Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In: *The Soil-Root Interface* (J. C. Harley & R. Scott-Russell eds.). Academic Press, London.
- Ryle GJ., Powell CE., Tewson V.** 1992. Effect of elevated CO₂ on photosynthesis, respiration and growth of perennial ryegrass. *Journal of Experimental. Botany* **43**, 811-818.
- Sadowsky MJ., Schortemeyer M.** 1997. Soil microbial responses to increased concentrations of atmospheric CO₂. *Global Change Biology* **3**(3), 217-224.
- Schapendonk AHCM., Dijkstra P., Groenwold J., Pot CS., Van de Geijn SC.** 1997. Carbon balance and water use efficiency of frequently cut *Lolium perenne* L. swards at elevated carbon dioxide. *Global Change Biology* **3**, 207-216.

- Scharpenseel HW.** 1993: Major carbon reservoirs of the pedosphere; source-sink relations; potential of $\delta^{14}\text{C}$ and $\delta^{13}\text{C}$ as supporting methodologies. *Water Air and Soil Pollution* **70**, 431-442.
- Schneider M.** 2003. Mobilisation of soil N and turnover rates of residual biomass: key factors in the response of *Lolium perenne* L. swards to CO_2 enrichment. PhD Thesis, ETH Zurich.
- Schnyder H.** 1992. Long term steady state labelling of wheat plants by use of natural $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ mixtures in an open, rapidly turned over system. *Planta* **187**, 128-135.
- Schortemeyer M., Hartwig UA., Hendrey G., Sadowsky M.** 1996. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (FACE). *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1717-1724.
- Schortemeyer M., Hartwig UA., Hendrey GR., Sadowsky MJ.** 1997. Influence of free air dioxide enrichment (FACE) on microbial communities in the rhizosphere of white clover and perennial ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1717-1724.
- Schortemeyer M., Dijkstra P., Johnson DW., Drake BG.** 2000. Effects of elevated atmospheric CO_2 concentration on C and N pools and rhizosphere processes in a Florida scrub oak community. *Global Change Biology* **6**, 383-391.
- Seastedt TR.** 1985. Maximization of primary and secondary productivity by grazers. *American Naturalist* **126**, 559-564.
- Seastedt TR., Ramundo RA., Haye DC.** 1988. Maximization of densities of soil animals by foliage herbivory: empirical evidence, graphical and conceptual models. *Oikos* **51**, 243-248.
- Shamoot S., McDonald L., Batholomew W.** 1968. Rhizodeposition of organic debris in soil. *Soil Science Society of America Proceeding* **32**, 817-820.
- Sheen J.** 1994. Feedback control of gene expression. *Photosynthesis Research* **39**, 427-438.
- Sheen J., Zhou L., Jang JC.** 1999. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 410-418.
- Sohlenius B.** (1979) A carbon budget for nematodes, rotifers and tardigrades in a Swedish coniferous forest soil. *Holarctic Ecology* **2**, 30-40.
- Soussana JF., Casella E., Loiseau P.** 1996. Long term effects of CO_2 enrichment and temperature increase on a temperate grass sward. II. Plant nitrogen budgets and root fraction. *Plant and Soil* **182**, 101-114.
- Sowerby A., Ball AS., Gray TRG., Newton PCD., Clark H.** 2000. Elevated atmospheric $[\text{CO}_2]$ from a natural soda spring affects the initial mineralization rates of naturally senesced C3 and C4 leaf litter. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1323-1327

- Sparling G., Vojvodić-Vuković M., Schipper L.A.** 1998. Hot-water-soluble C as a simple measure of labile soil organic matter: the relationship with microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 1469-1472.
- Stanton NL.** 1983. The effect of clipping and phytophagous nematodes on net primary production of blue grama, *Bouteloua gracilis*. *Oikos* **40**, 249-257.
- Stemmer M., Gerzabek MH., Kandeler E.** 1999. Invertase and xylanase activity of bulk soil and particle-size fractions during maize-straw decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 9-18.
- Stitt M.** 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell and Environment* **14**, 741-762.
- Stitt M.** 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 178-186.
- Strauss SY., Agrawal AA.** 1999. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends Ecol. Evol.* **14**, 179-185.
- Subba Rao NS.** 1999. Soil Microbiology (Fourth Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth). Science Publishers, Inc. USA.
- Suter D., Frehner M., Fischer BU., Nösberger J., Lüscher A.** 2002. Elevated CO₂ increases carbon allocation to the roots of *Lolium perenne* under free-air CO₂ enrichment but not in a controlled environment. *New Phytologist* **154**, 65-75.
- Swinnen J., Van Veen JA., Merckx R.** 1994a. ¹⁴C pulse-labelling of field-grown spring wheat: An evaluation of its use in rhizosphere carbon budget estimations. *Soil Biology and Biochemistry* **26(2)**, 161-170.
- Swinnen J., Van Veen JA., Merckx R.** 1994b. Rhizosphere carbon fluxes in field-grown spring wheat: Model calculations based on ¹⁴C partitioning after pulse-labelling. *Soil Biology and Biochemistry* **26(2)**, 171-182.
- Tabourel-Tayot F.** 1997. Modélisation de la répartition des assimilats C et N d'une graminée pérenne (*Festuca arundinacea* Schreb.) pour différentes conditions de rayonnement et d'alimentation azotée. Thèse, Université Paris XI, Orsay.
- Thornton B., Paterson E., Midwood AJ., Sim A., Pratt SM.** 2004. Contribution of current carbon assimilation in supplying root exudates of *Lolium perenne* measured using steady-state ¹³C labelling. *Physiologia Plantarum*, **120(3)**, 434-441.
- Toal ME., Yeomans C., Killham K., Meherg AA.** 2000. A review of rhizosphere carbon flow modelling. *Plant and Soil* **222**, 263-281.

- Todd TC.** 1996. Effects of management practices on nematode community structure in tallgrass prairie. *Applied Soil Ecology* **3**, 235-246.
- Todd TC., James SW., Seastedt TR.** 1992. Soil invertebrate and plant responses to mowing and carbofuran application in a North American tallgrass prairie. *Plant and Soil* **144**, 117-124.
- Todorovic C.** 2000. Dynamique d'utilisation des assimilats carbonés dans la rhizosphère du maïs : étude de la respiration rhizosphérique, Thèse INPL/ENSAIA.
- Todorovic C., Nguyen C., Robin C., Guckert A.** 1999. ^{14}C -assimilate partitioning within white clover plant-soil system: effects of photoperiod/temperature treatments and defoliation. *European Journal of Agronomy* **11(1)**, 13-21.
- Torsvik V., Goksoyr J., Daae FL.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 782-787.
- Treonis AM., Ostle NJ., Stott A., Primrose R., Grayston, SJ., Ineson P.,** 2004. Identification of metabolically-active rhizosphere microbes by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 533-537.
- Vance ED., Brookes PC., Jenkinson DS.** 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **19**, 703-708.
- Van de Geijn SC., Van Veen JA.** 1993. Implications of increased carbon dioxide levels for carbon input and turnover in soils. *Vegetatio* **104/105**, 283-292.
- Van der Krift AJ., Kuikman PJ., Moller F.** 2001. Plant species and nutritional-mediated control over rhizodeposition and root decomposition. *Plant and Soil* **228**, 191–200.
- Van Ginkel JH., Gorissen A., Van Veen JA.** 1996. Long-term decomposition of grass roots as affected by elevated atmospheric carbon dioxide. *Journal of Environmental Quality* **25**, 1122-1128.
- Van Ginkel JH., Gorissen A., Van Veen JA.** 1997. Carbon and nitrogen allocation in *Lolium perenne* in response to elevated atmospheric CO_2 with emphasis on soil carbon dynamics. *Plant and Soil* **188**, 299-308.
- Van Groenigen KJ., Harris D., Horwarth WR., Hartwig UA., Van Kessel C.** 2002. Linking sequestration of ^{13}C and ^{15}N in aggregates in a pasture soil following 8 years of elevated atmospheric CO_2 . *Global Change Biology* **8**, 1094-1108.
- Van Groenigen KJ., Gorissen A., Six J., Harris D., Kuikman PJ., Van Groenigen JW., Van Kessel C.** 2005. Decomposition of ^{14}C -labeled roots in a pasture soil exposed to 10 years of elevated CO_2 . *Soil Biology and Biochemistry* **37(3)**, 497-506.

- Van Kessel C., Nitschelm J., Horwath WR., Harris D., Walley F., Lüscher A., Hartwig UA.** 2000 a. Carbon-13 input and turnover in a pasture soil exposed to long term elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology* **6**, 123-135.
- Van Kessel C., Horwath WR., Hartwig UA., Harris D., Lüscher A.** 2000 b. Net soil carbon input under ambient and elevated CO₂ concentrations: isotopic evidence after four years. *Global Change Biology* **6**, 435-444.
- Van Veen JA., Liljeroth E., Lekkerkerk LJA.** 1991. Carbon fluxes in plants soil systems at elevated atmospheric CO₂ levels. *Ecological applications* **1** 175-181.
- Wallace LL., Macko SA.** 1993. Nutrient acquisition by clipped plants as a measure of competitive success: the effects of compensation. *Functional Ecology* **7**, 326-331.
- Warembourg FR., Paul EA.** 1977. Seasonal transfers of assimilated ¹⁴C in grassland: plant production and turnover and soil and plant respiration. *Soil Biology and Biochemistry* **9**, 295-301.
- Warembourg FR., Billes G.** 1979. Estimating carbon transfers in the plant rhizosphere. In *The Soil-Root Interface*. Eds. J L Harley and R Scott Russel. pp 183-196. Academic Press, London.
- Warembourg FR., Estelrich HD.** 2001. Plant phenology and soil fertility effects on belowground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1291-1303.
- Welker, JM., Rykiel, EJ., Briske, DD., Goeschl, JD.** 1985. Carbon import among vegetative tillers within two bunchgrasses: assessment with carbon-11 labelling. *Oecologia* **67**, 209-212.
- Whipps JM.** 1987. Effect of media on growth and interaction between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist* **107**, 127-142.
- Whipps JM.** 1990. Carbon economy. p. 59-97. in J.M. Lynch (ed.), *The rhizosphere*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Whipps JM., Lynch JM.** 1985. Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Annual Process Phytochem Soc Europe* **26**, 59-71.
- Williams MA., Rice CW., Owensby CE.** 2000. Carbon dynamics and microbial activity in tallgrass prairie exposed to elevated CO₂ for 8 years. *Plant and soil* **227**, 127-131
- Wullschlegel SD., Oosterhuis DM.** 1990. Photosynthesis of individual field-grown cotton leaves during ontogeny. *Photosynth. Res.* **23**, 163-170.
- Yeates GW., Wardle DA., Watson RN.** 1993. Relationships between nematodes, soil microbial biomass and weed-management strategies in maize and asparagus cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 869-876.

- Yeomans CV., Porteous F., Paterson E., Meharg AA., Killham K.** 1999. Assessment of lux marked *Pseudomonas fluorescens* for reporting on organic carbon compounds. *Fems Microbiology Letters* **176**, 79-83.
- Zagal E.** 1994. Carbon distribution and nitrogen partitioning in a plant soil system with barley (*Hordeum vulgare L*), ryegrass (*Lolium perenne L*) and rape (*Brassica napus L*) grown in a ¹⁴CO₂ atmosphere. *Plant and Soil* **166**, 63-74.
- Zak DR., Tilman D., Parmenter RR., Rice CW., Fisher FM., Vose J., Milchunas D., Martin CW.** 1994. Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology* **75**, 2333-2347.
- Zak DR., Pregitzer K., King J., Holmes W.** 2000. Elevated atmospheric CO₂, fine roots, and the response of soil microorganisms: a review and hypothesis, *New Phytologist* **147**, 201-222.

FIGURES

Figure 1 : Flux annuels et stocks de carbone en giga tonnes (milliards de tonnes de carbone) (Figure tirée de "L'Avenir Climatique", d'après GIEC, 1996).

Figure 2 : Représentation schématique de l'allocation et de la répartition du carbone dans la plante (d'après Tabourel-Tayot, 1997).

Figure 3: Modèle simplifié présentant le carbone issu de la photosynthèse importé jusqu'aux racines puis transféré dans le sol (d'après Dilkes *et al.*, 2004). Ce schéma vient en complément du schéma précédent (Figure 2) caractérisant la répartition du carbone dans la plante. La rhizodéposition est en continuité avec la plante.

Figure 4: Représentation schématique des effets positifs et négatifs directs et indirects des exsudats racinaires sur la croissance de la plante (d'après Jones *et al.*, 2003).

Figure 5: Schéma récapitulatif des effets de l'élévation du CO₂, de la défoliation et de la fertilisation azotée sur les transferts de C dans la plante.

Figure 6 : Schéma conceptuel récapitulant nos objectifs de travail

Figure 7: Dispositif de marquage des parties aériennes des plantes au ¹⁴CO₂, ¹³CO₂. c : chaux sodée, dm : débitmètre massique, f : filtre de 0,2µm, o : ordinateur, pp : pompe péristaltique ; pa : pompe aquarium ; pe : piège à eau.

Figure 8 : Activité spécifique de la chambre pendant le marquage (exemple d'un marquage court de 1h). A la fin du marquage, l'activité spécifique dans la chambre de marquage décroît rapidement grâce au fonctionnement d'une pompe forçant l'air de l'enceinte à traverser un piège à chaux sodée piégeant le ¹⁴CO₂ encore présent dans l'enceinte de marquage.

Figure 9 : Evolution de la concentration en CO₂ dans l'enceinte de marquage, avant, pendant le marquage et après le marquage. Grâce au système informatique, la concentration en CO₂ dans l'enceinte de marquage reste constante tout au long de l'expérience.

Figure 10 : Dispositif de marquage des plantes au ¹⁵NH₃. Les plantes assimilent le ¹⁵N par leurs parties aériennes. dm : débitmètre massique, o : ordinateur, pp : pompe péristaltique ; pa : pompe aquarium ; pe : piège à eau.

Figure 11 : Protocole de récolte des plantes après la période de culture

Figure 12 : Représentation schématique de la pré-extraction, fumigation extraction (Vance *et al.*, 1987).

Figure 13 : Schéma des pots de culture. Ces pots sont composés de deux cylindres de PVC s'emboîtant l'un dans l'autre grâce à un collier. Il sont séparés par une toile de nylon (maille 1μ). Le tube supérieur est défini comme étant le compartiment « racine », le tube inférieur comme le compartiment « rhizosphère ».

Figure 14 : Chronologie des différentes étapes de l'expérimentation. Pendant les 28 premiers jours les plantes sont placées en phytotron, ensuite 14 plantes sont mises dans l'enceinte de marquage afin de réaliser le marquage.

Figure 15: Production de biomasse (Parties aériennes, racines, biomasse totale exprimées en g . plante⁻¹) et ratio de biomasse PR/PA des plantes récoltées à la fin du premier (récolte 1, ¹⁴C) et à la fin du second marquage (récolte 2, ¹³C).

Figure 16 : Répartition du ¹⁴C à la fin du premier marquage ainsi que du ¹³C et du ¹⁴C à la fin du second marquage dans la plante et le sol. Les résultats sont exprimés en % total retrouvé.

Figure 17 : La figure représente la cinétique de libération du ¹⁴C et du ¹³C dans le sol adhérent du compartiment rhizosphère (exprimé en μg de C marqué par g de sol adhérent) à J3, J6 J8 et J10 après le début du marquage au ¹³C. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance.

Figure 18 : La figure représente la cinétique de l'allocation du ^{14}C et du ^{13}C à la respiration rhizosphérique (exprimé en μg de C marqué par g de sol adhérent) à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les barres verticales représentent les intervalles de confiance.

Figure 19 : Container de marquage renfermant un cylindre de PVC planté d'un ray grass destiné à être marqué au $^{14}\text{CO}_2$. Le couvercle présente une ouverture permettant le passage de la plante. Cette ouverture, une fois la plante mise en place est bouchée avec du silicone liquide. Le couvercle présente également 2 trous permettant le branchement de 2 tuyaux reliés aux pièges à soude utilisés pour piéger le CO_2 issu de la respiration rhizosphérique.

Figure 20 : Biomasse sèche des parties aériennes (a, e), des racines (c, g), biomasse sèche totale (b, f) de la plante en g. plante^{-1} et ratio de matière sèche Parties racinaires PR / Parties aériennes PA (d, h) des plants de *Lolium perenne* récoltés en Juin (printemps, a, b, c, d) et en Septembre (automne, e, f, g, h) dans les anneaux enrichis en CO_2 et ambiants, pour les deux niveaux de fertilisation azotées (56 et 14 g N. m^{-2}). Les différentes lettres représentent les résultats du test de Tukey Kramer, effectué lorsqu'une interaction significative est révélée par l'analyse de variance ; $n=3$.

Figure 21: Répartition du ^{14}C assimilé exprimé en pourcentage de ^{14}C total retrouvé %RTR dans les parties aériennes (a, f), le compartiment souterrain (c, h) (racines b, g; respiration rhizosphérique RR d, i ; et le sol incluant sol adhérent, sol non adhérent et biomasse microbienne e, j), lors des échantillonnages du printemps (a, b, c, d, e) et de l'automne (f, g, h, i, j) au sein des monocultures de ray grass, pour deux niveaux de fertilisation azoté (56 et 14 gN.m^{-2}). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance ($n=3$). Les différentes lettres représentent les résultats du test de Tukey Kramer, effectué lorsqu'une interaction significative est révélée par l'analyse de variance.

Figure 22 : Pourcentage de ^{15}N dérivé de l'atmosphère dans les feuilles (a), les tiges (b), les racines (c) et le sol adhérent (d) pour les échantillonnages du printemps au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère ambiante ou enrichie en CO_2 , sous deux niveaux de fertilisation.. Les barres verticales présentent les intervalles de confiances ($n=3$).

Figure 23 : Pourcentage de ^{15}N dérivé de l'atmosphère dans les feuilles (a), les tiges (b), les racines (c) et le sol adhérent (d) pour les échantillonnages de l'automne au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère ambiante ou enrichie en CO_2 , sous deux niveaux de fertilisation.. Les barres verticales présentent les intervalles de confiances (n=3).

Figure 24: Concentrations en glucide totaux exprimées en mol de glucide par kg d'échantillon en équivalent hexose, dans les feuilles (a, c) et dans les racines (b, d) après les échantillonnages du printemps (a, b) et de l'automne (c, d) au sein des monocultures de ray grass, pour deux niveaux de fertilisation azoté Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 25: C microbien (mg C kg^{-1} de sol) du sol adhérent (SA) et non adhérent (SNA) lors des échantillonnages du printemps (a, c) et de l'automne (b, d) au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère ambiante ou enrichie en CO_2 , sous deux niveaux de fertilisation. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 26a et b: Production de $^{14}\text{CO}_2$ pendant l'incubation de sol adhérent (SA) exprimée en Bq respiré par g de sol adhérent (SA) (26a) et en % de ^{14}C présent au début de l'incubation dans le sol (26b) lors de l'échantillonnage de l'automne au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère enrichie ou ambiante en CO_2 , sous deux niveaux de traitement azoté. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 27: Production de CO_2 pendant l'incubation de sol adhérent (SA) exprimée en mg de C respiré par g de sol adhérent (SA) lors de l'échantillonnage de l'automne au sein des monocultures de ray grass sous atmosphère enrichie ou ambiante en CO_2 sous deux niveaux de traitement azoté. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 28 : Production de biomasse sèche des plantes (g plante^{-1} , biomasse défoliée + biomasse récoltée) et ratio racines parties aériennes, 2 et 4 jours après la coupe dans les parcelles mono spécifiques de ray grass avec (1) ou sans (0) apport d'azote. Les barres verticales correspondent aux intervalles de confiances (n=6).

Figure 29 : Concentrations en carbone et en azote, exprimées en pourcentage de la MS dans les feuilles, les tiges, les racines, 2 et 4 jours après la coupe des plants de ray grass avec (1) ou sans (0) apport d'azote. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 30 : Concentrations en glucides totaux dans les racines, exprimée en mol. kg⁻¹ de carbone en équivalent hexose pour les différents traitements (0 : sans apport d'azote, 1 : avec apport d'azote), 2 (a) et 4 (b) jours après la coupe. Les barres verticales correspondent aux intervalles de confiance (n=3).

Figure 31 : Pourcentage de carbone (a, d) et d'azote total (b,e) ; concentration en carbone soluble (mg.kg⁻¹ de sol sec ; c, f) dans le sol adhérent (SA) des plantes coupées et des plantes non coupées issues des parcelles fertilisées (1) et non fertilisées (0) après la première (a, b, c) et la seconde récolte (d, e, f). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 32 : Carbone et azote microbien (mg C et N par kg de sol sec) pour le sol adhérent (SA); mesure de l'activité microbienne (test glucose ¹⁴C) ¹⁴CO₂ : ¹⁴C respiré (¹⁴CO₂), ¹⁴C_{FE} : ¹⁴C de la biomasse microbienne et ¹⁴CO₂/¹⁴C_{FE} : activité microbienne exprimée proportionnellement à la biomasse microbienne dans le sol adhérent, Nombre de bactéries cultivables à stratégie r (2 jours de développement) exprimée en log de CFU (Colonies formant unités) par gramme de sol adhérent sec et indice de Shannon correspondant à la diversité d'utilisation des substrats carbonés par les micro-organismes du sol adhérent des plantes coupées et des plantes non coupées issues des parcelles fertilisées (1) et non fertilisées (0) après la première et la seconde récolte. Les barres verticales représentent les intervalles de confiance (n=3).

Figure 33 : Nombre de fongivores (a), herbivores (b) et bactérivores (c) par gramme de sol, dans les parcelles coupées et non coupées, fertilisées (1) et non fertilisées (0). Les barres verticales correspondent aux intervalles de confiance. Les différentes lettres montrent des différences significatives au seuil de 5%.

TABLEAUX

Tableau 1 : Effets de quelques facteurs à impact majeur sur l'assimilation et la répartition des assimilats dans la plante. Ces éléments bibliographiques sont tirés d'articles de synthèses et de résultats expérimentaux.

Tableau 2 : les différentes catégories de rhizodépôts (d'après Rovira *et al.*, 1979) selon leur composition biochimique et leur mode de libération.

Tableau 3: Analyses statistiques de la production de biomasse (parties aériennes, racines et totale) et du ratio de biomasse PR/PA des plantes récoltées à la fin du premier (^{14}C) et à la fin du second marquage (^{13}C). Seuil de significativité 5% ; n=7.

Tableau 4: Analyses statistiques de la répartition du ^{14}C à la fin du premier marquage et du ^{13}C à la fin du second marquage dans les parties aériennes, les racines de la plante et le sol (sol adhérent des compartiments racines et rhizosphères, le sol non adhérent du compartiment rhizosphère et la respiration rhizosphérique) Seuil de significativité 5% ; n=7.

Tableau 5: Analyses statistiques de la répartition du ^{13}C et du ^{14}C dans les parties aériennes, les racines de la plante et le sol (sol adhérent des compartiments racines et rhizosphères, le sol non adhérent du compartiment rhizosphère et la respiration rhizosphérique) à la fin du second marquage (histogramme (2) et (3)). Seuil de significativité 5% ; n=7.

Tableau 6 : Le tableau présente les valeurs statistiques issus de la comparaison des masses de ^{14}C et de ^{13}C libérée par les racines à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les différences sont significatives à 5 %, n=7.

Tableau 7 : Le tableau présente les valeurs statistiques issus de la comparaison des masses de ^{14}C et de ^{13}C allouées à la respiration rhizosphérique à J3, J6, J8 et J10 après le début du marquage au ^{13}C . Les différences sont significatives à 5 %, n=7.

Tableau 8 : Carbone microbien du sol adhérent (SA, 5 premiers mm de sol) et du sol non adhérent (SNA, 45mm de sol suivant) dans le compartiment rhizosphère 0, 3, 6, 8, 10 jours après le début du marquage au ^{13}C . La différence significative de biomasse entre SA et SNA correspond à l'effet rhizosphère. Il est significatif au seuil de 5% (n=7).

Tableau 9 : Excès isotopique dans les différents compartiments de notre dispositif de culture (Parties aériennes des plantes, racines, sol adhérent (SA) du compartiment racine, sol rhizosphérique (SR) du compartiment rhizosphère) après 10 jours de marquage au carbone 13 avec un excès isotopique de 5 atom %.

Tableau 10 : Résultats des analyses statistiques des différents paramètres : production de biomasse, répartition du ^{14}C , du ^{15}N . et carbone microbien du sol adhérent et du sol non adhérent. Les effets CO_2 , azote (N) et les interactions $\text{CO}_2 \times \text{N}$ sont testés et considérés comme significative au seuil de 5%.

Tableau 11 : Flux spécifiques nets d'entrée de ^{14}C dans le système plante-sol exprimés en KBq retrouvé par g^{-1} de parties aériennes, après l'échantillonnage d'automne pour les deux niveaux de CO_2 (CO_2+ : enrichi, CO_2 : ambiant) et les deux niveaux de fertilisation (56 et 14 g. m^{-2}). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux intervalles de confiance, n=3.

Tableau 12 : Résultats des analyses statistiques pour les différents paramètres analysés : Production de biomasse, concentration en C et en N et ratio C/N dans les différents organes de la plante, Concentration en carbone, azote total et carbone soluble du sol adhérent, C et N microbien, activité microbienne (test glucose ^{14}C), étalement bactérien et test Biolog[®] (indice de Shannon). Les effets défoliation, azote et date de récolte sont testés, ainsi que les interactions Défoliation $\times$ Azote, Défoliation $\times$ Récolte et Azote $\times$ Récolte. Les effets sont considérés comme significative au seuil de 5%.

PHOTOGRAPHIES

Photographie 1 : Pièges à soude contenant 200ml de NaOH 1M permettant de mesurer la respiration rhizosphérique. Il y a un piège à soude par pot.

Photographie 2 : Enceinte de marquage contenant les plantes. Ici ce sont les 24 plantes utilisées pour l'expérimentation décrite dans le chapitre E.

Photographie 3 : Plantes cultivées pendant 28 jours en phytotron et placées dans l'enceinte de marquage.

Photographie 4 : Le pot a été retourné et la toile de nylon découpée afin d'observer le tapis de racine formé sur la toile de nylon à l'interface entre le compartiment racine et le compartiment rhizosphère.

Photographies 5 et 6 : Vue d'un anneau enrichi du dispositif FACE Suisse. On peut distinguer la présence de buse permettant la diffusion du CO₂ au-dessus de la parcelle ainsi que la présence d'un capteur de la concentration en CO₂, de la vitesse du vent et de la température.

Photographies 7 et 8 : Parcelle d'expérimentation à l'INRA-SAD de Mirecourt (88). Les photographies ont été prises après la seconde coupe. Les piquets délimitent les parcelles et permettent de repérer plus facilement les cylindres de PVC. La parcelle est régulièrement nettoyée de toutes mauvaises herbes.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Au jour de la soutenance, ce travail de thèse a permis la rédaction de deux articles scientifiques :

Bazot S., Ulff L., Blum H., Nguyen C., Robin C. (2005). Effects of elevated CO₂ concentration on rhizodeposition of *Lolium perenne* grown on soil exposed to 9 years of CO₂ enrichment. *Soil Biology and Biochemistry*, sous presse;

Bazot S., Mikola J., Nguyen C., Robin C. (2005). Do defoliation-induced changes in C allocation of field-grown *Lolium perenne* affect C availability, microbes and microbial feeders in soil? *Functional Ecology*, 19 (5), 886-896.

Ce travail a également permis la présentation de 5 communications et posters présentés dans des réunions et colloques internationaux:

Bazot S., Ulff L., Blum H., Nguyen Ch., Robin Ch. (2003). Présentation de la problématique de thèse : transferts de carbone dans le système-plante-sol-micro-organismes. **Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E**, 23 janvier 2003, Nancy (France).

Bazot S., Ulff L., Blum H., Nguyen Ch., Robin Ch. (2003). Effet de l'augmentation de la concentration en CO₂ de l'atmosphère sur la libération de carbone dans la rhizosphère d'une graminée prairiale : le ray grass (*Lolium perenne*). **Cinquièmes Journées d'Ecologie Fonctionnelle**, 12-14 mars, Nancy (France).

Bazot S., Ulff L., Blum H., Nguyen Ch., Robin Ch. (2004). Carbon partitioning into rye grass (*Lolium perenne*) plant soil micro organisms system after 9 years of Free-air CO₂ enrichment. **International FACE Workshop** 20 - 25 March 2004, Ascona (Suisse).

Bazot S., Tavernier J., Plantureux S., Robin Ch. (2004). Carbon partitioning into plant soil system of rye grass (*Lolium perenne*) sward after defoliation. **EGF 2004 General Meeting, Land use systems in grassland-dominated regions**. 21-24 June 2004, Luzern (Suisse).

Bazot S., Tavernier J., Mikola J., Robin Ch. (2004). Pattern of carbon allocation in the rhizosphere of rye grass (*Lolium perenne*) plant after defoliation. Proceedings **4^{eme} colloque Rhizosphère**, 12-17 Septembre 2004, Munich (Allemagne). A. Hartmann, M. Schmid, W. Wenzel, Ph. Hinsinger (Eds), p 201.

ANNEXE 2 : Calcul de l'analyse *a posteriori* de l'abondance isotopique en ^{13}C de l'atmosphère dans l'enceinte de marquage des plantes :

Afin de déterminer l'excès isotopique de l'air de la chambre de marquage, un circuit fermé permet, pendant le marquage, de piéger l'air de la chambre dans 100ml de NaOH 1M pendant 30 min. Cette opération est répétée 3 fois chaque fois que le marquage au ^{13}C est réinitialisé.

$\delta^{13}\text{C}$ atmosphère moyen (moyenne de 6 échantillons) = 3488 (donnée de l'analyse au spectromètre de masse (analyse effectuée par le laboratoire Isotope de l'université de Davis (USA)).

R atmosphère = 0,050434 (1)

A% atmosphère = 4,80 (atom %) (2)

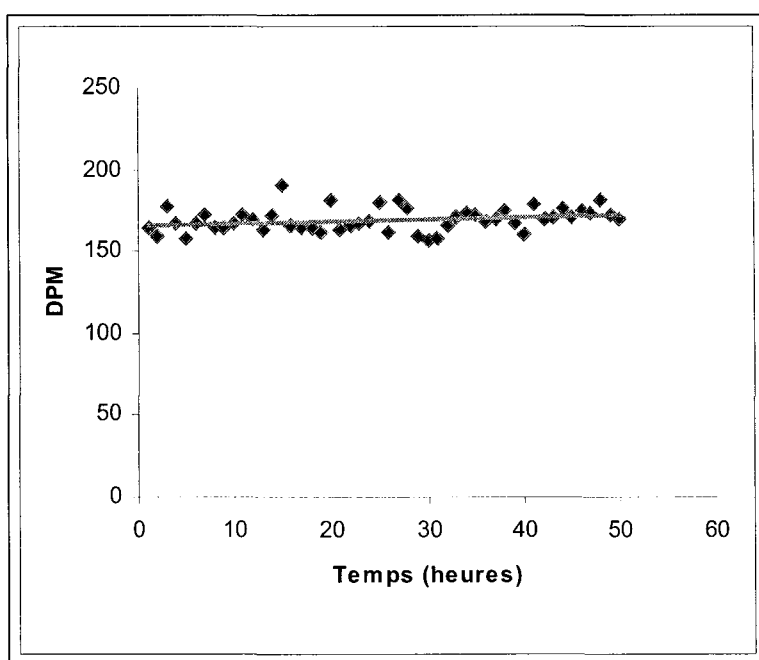
Formules utilisées :

$$(1) R = \left(\left(\frac{\delta^{13}\text{C échantillon}}{1000} \right) + 1 \right) \times 0,0112372$$

$$(2) A\% = \left(\frac{R \text{ échantillon}}{R \text{ échantillon} + 1} \right) \times 100$$

ANNEXE 3 : Test de validation de l'utilisation du liquide scintillant ULTIMA-FLO (Packard, USA).

Nous avons observé lors du passage au compteur à scintillation liquide du mélange K_2SO_4 (issue de l'extraction-fumigation) liquide scintillant de type Ultima Gold (Packard, USA) une séparation rapide du mélange en deux phases, le K_2SO_4 se retrouvant en dépôt au fond du tube de comptage. La mesure de la radioactivité est alors faussée. Par conséquent nous avons testé différent liquide scintillant dont l'Ultima Flo (Packard, USA). Le K_2SO_4 reste en suspension dans le liquide scintillant ce qui permet une stabilité de la mesure de radioactivité dans le temps (60h).



ANNEXE 4 : Calculs préliminaires permettant d'évaluer la pertinence d'un double marquage en abondance naturelle de plantes avec deux atmosphères ayant une signature isotopique différente :

Durée du marquage : 10 jours

$\delta^{13}\text{C}$ du sol de culture choisi : -12‰

$\delta^{13}\text{C}$ atmosphère 1 : -45‰

$\delta^{13}\text{C}$ atmosphère 2 : +200‰

$\delta^{13}\text{C}$ théorique des exsudats issus des plantes évoluant dans l'atmosphère 1 : -45-20=-65‰

Masse de sol : 20g

Masse théorique totale d'exsudat produit : 0,014g soit 0,0014 mg d'exsudat produit par jour.

Base du calcul 70µg de C. g⁻¹ de sol sont libérés chaque jour et 20g de sol adhérent par plante.

Marquage atmosphère 1 pendant 10 jours

R sol = 0,011102 (1)

Abondance isotopique du sol A% = 1,098044 (2)

R exsudats = 0,010506 (1)

A% exsudats = 1,039753 (2)

Masse ^{13}C sol (mg) = 219,6088 (3)

Masse ^{13}C exsudats (mg) = 0,143337 (3)

Quantité ^{13}C exsudats + sol (mg) = 219,7522

$A\% \text{ exsudats} + \text{sol} = 1,098020$ (4)

Marquage atmosphère 2 pendant 10 jours

$\delta^{13}\text{C}$ sol = $\delta^{13}\text{C}$ exsudats + sol en fin du marquage 1 = -12,022268 ‰ (5) (6)

$\delta^{13}\text{C}$ des exsudats = 200-20= 180 ‰

R sol = 0,011102

$$A\% \text{ sol} = 1,098020$$

$$R \text{ exsudats} = 0,013259$$

$$A\% \text{ exsudats} = 1,30863721$$

$$\text{Masse } ^{13}\text{C sol (mg)} = 219,6040$$

$$\text{Masse } ^{13}\text{C exsudats (mg)} = 0,176666$$

$$\text{Quantité } ^{13}\text{C exsudats + sol (mg)} = 219,7806$$

$$\mathbf{A\% \text{ exsudats + sol} = 1,098162}$$

Au vu de ces résultats il apparaît très clairement qu'il est difficile de discriminer le carbone issu des deux atmosphères tellement la variation de l'abondance isotopique du mélange exsudats + sol est faible.

Formules utilisées :

$$(1) R = \left(\left(\frac{\delta^{13}\text{C échantillon}}{1000} \right) + 1 \right) \times 0,0112372$$

$$(2) A\% = \left(\frac{R \text{ échantillon}}{R \text{ échantillon} + 1} \right) \times 100$$

$$(3) \text{Masse } ^{13}\text{C} = \frac{\text{Masse échantillon} \times A\%}{100}$$

$$(4) A\% = \frac{\text{Masse de } ^{13}\text{C échantillon} \times 100}{\text{Masse de l'échantillon}}$$

$$(5) R = \frac{A\%}{(100-A\%)}$$

$$(6) \delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R}{R_{\text{PDB}}} - 1 \right) \times 1000$$

ANNEXE 5 : Définition et mesure de la capacité au champ

La capacité au champ correspond à l'eau retenue par le sol après une période de pluie et un ressuyage de deux jours, le sol étant protégé contre l'évaporation, elle comprend donc l'eau capillaire augmentée d'une fraction variable d'eau de gravité à écoulement lent (Duchaufour, 1997).

Un pot contenant une masse connue de sol frais est saturé d'eau par immersion dans un bac. Après 24 heures, de l'eau s'écoule lorsque le pot est retiré du bac. Le pot est alors mis à ressuyer. Après 48 heures l'écoulement d'eau s'est arrêté. Le sol a atteint son point de ressuyage, il est à 100% de la capacité au champ. Il est ainsi possible d'estimer le pourcentage d'humidité de ce sol à 100% de la capacité et champ, et de calculer ensuite le pourcentage d'humidité du sol et donc la masse de sol à 60% de la capacité au champ.

Calcul :

a. Compartiment racine :

Volume pot : 237 L

Densité du sol : 1,3 kg de sol sec. L⁻¹

Masse de sol sec dans le pot : 308 g

A 100% de la capacité au champ on a 20% d'humidité soit une masse de sol de 370g.

A 60% de la capacité au champ on a alors 12% d'humidité soit une masse de sol de 345 g.

b. Compartiment rhizosphère :

Volume pot : 118 L

Densité : 1,3 kg de sol sec. L⁻¹

Masse de sol sec dans le pot : 154g

A 100% de la capacité au champ on a 20% d'humidité soit une masse de sol de 185g.

A 60% de la capacité au champ on a alors 12% d'humidité soit une masse de sol de 172g.

ANNEXE 6: Publications issues du travail de thèse à la date de la soutenance



Soil Biology & Biochemistry xx (2005) 1–8

Soil Biology &
Biochemistry

www.elsevier.com/locate/soilbio

Effects of elevated CO₂ concentration on rhizodeposition from *Lolium perenne* grown on soil exposed to 9 years of CO₂ enrichment

S. Bazot^a, L. Ulff^b, H. Blum^c, C. Nguyen^a, C. Robin^{a,*}

^aRhizosphere group, UMR INPL-INRA Agronomie et Environnement ENSAIA, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

^bDepartment of Soil Sciences, Division of Plant Nutrition and Soil Fertility, Swedish University of Agricultural Sciences, S-75007 Uppsala, Sweden

^cInstitute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), 8092 Zürich, Switzerland

Received 9 February 2005; received in revised form 22 June 2005; accepted 22 June 2005

Abstract

The effects of enriched CO₂ atmosphere on partitioning of recently assimilated carbon were investigated in a plant-soil-microorganism system in which *Lolium perenne* seedlings were planted into cores inserted into the resident soil within a sward that had been treated with elevated CO₂ for 9 consecutive years, under two N fertilisation levels (Swiss FACE experiment). The planted cores were excavated from the ambient (35 Pa pCO₂) and enriched (60 Pa pCO₂) rings at two dates, in spring and autumn, during the growing season. The cores were brought back to the laboratory for ¹⁴C labelling of shoots in order to trace the transfer of recently assimilated C both within the plant and to the soil and microbial biomass. At the spring sampling, high N supply stimulated shoot and total dry matter production. Consistently, high N enhanced the allocation of recently fixed C to shoots, and reduced it to belowground compartments. Elevated CO₂ had no consequences for DM or the pattern of C allocation. At the autumn sampling, at high N plot, yield of *L. perenne* was stimulated by elevated CO₂. Consistently, ¹⁴C was preferentially allocated aboveground and, consequently belowground recent C allocation was depressed and rhizodeposition reduced. At both experimental periods, total soil C content was similar in all treatments, providing no evidence for soil carbon sequestration in the Swiss Free Air CO₂ Enrichment experiment (FACE) after 9 years of enrichment. Recently assimilated C and soil C were mineralised faster in soils from enriched rings, suggesting a CO₂-induced shift in the microbial biomass characteristics (structure, diversity, activity) and/or in the quality of the root-released organic compounds.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Carbon sequestration; Elevated CO₂; Microbial biomass; Mineralisation; Nitrogen fertilisation; Rhizodeposition; Rhizosphere respiration

1. Introduction

Living roots continually release organic carbon into the rhizosphere, the soil volume in the vicinity of roots (Rovira, 1969), with the amount representing a significant part of the total plant C budget. This process, referred to as rhizodeposition (Whipps and Lynch, 1983), is affected qualitatively and quantitatively by a wide range of factors including plant species, phenology and environmental conditions (Rovira, 1959; Hale and Moore, 1979; Curl and Truelove, 1986; Grayston et al., 1996). Within the global change context, the predicted rise of atmospheric CO₂

concentration is an important environmental change with crucial implications for terrestrial ecosystems. Therefore, the responses of plants and rhizosphere micro-organisms to rising atmospheric CO₂ are particularly important to quantify if the consequences of rising atmospheric CO₂ for soil C dynamics and nutrient cycling are to be predicted.

Most studies aiming to quantify the consequences of elevated CO₂ on C fluxes from plants to the rhizosphere and various soil compartments have been conducted under controlled conditions that usually optimize plant growth. Few field studies have been reported, despite their obvious relevance for C dynamics. A survey of the literature shows that for both controlled environment and field conditions, elevated CO₂ frequently increases dry matter yield (Kimball, 1983; Ross et al., 1995, 1996; Hebeisen et al., 1997; Daeppe et al., 2000; Suter et al., 2002), in the absence of limiting factors such as the availability of nitrogen. This CO₂-induced yield increase is attributed to a stimulation of net CO₂

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 58 56; fax: +33 3 83 59 57 99.

E-mail address: christophe.robin@ensaia.inpl-nancy.fr (C. Robin).

assimilation (Long and Drake, 1991; Rogers et al., 1998; Ainsworth et al., 2003), but the consequences for the patterns of C allocation belowground, under field conditions, are more controversial. Indeed, field studies either demonstrate no influence of elevated CO₂ on soil C content even after long-term CO₂ enrichment, irrespective the nutrient status of the soil (Ross et al., 1996; Niklaus, 1998; Niklaus et al., 2000; 2001; Gill et al., 2002; Horwath et al., 2001; Van Kessel et al., 2000a,b; Van Groenigen et al., 2002; Ross et al., 2004), or an increase of soil C pools (Williams et al., 2000). None of those studies have measured either rhizodeposition or the contribution of rhizodeposits to the soil carbon pool. In those studies, the contribution of carbon of plant origin (i.e. C from litter fall, rhizodeposition or root turnover) to the soil carbon pool was assessed collectively and the studies involved long-time scales (months and years); thus individual fluxes were not determined. Quantification of rhizodeposition at elevated CO₂ is required, because in the main root-released organic compounds stimulate the growth and activity of microbes as the availability of carbon in the soil usually limits microbe activity. Additionally, rhizodeposition is a major fraction of soil C input in natural ecosystems (Stanton, 1988). Very few studies have investigated rhizodeposition under elevated CO₂ in undisturbed soil; elevated CO₂ stimulated rhizodeposition in a native C3–C4 grassland ecosystem (Pendall et al., 2004). Under intensively managed grassland Free Air CO₂ Enrichment (FACE) system as the Swiss FACE, there are no results available on the contribution of rhizodeposition to total soil C pool.

The Swiss FACE offers a unique opportunity for quantifying plant-soil carbon fluxes within an intensively managed rye grass sward under two distinct N fertilisation levels and long-term CO₂ enrichment under 9 consecutive years.

In this context, the aims of this study were to assess (i) the influence of elevated CO₂ on the partitioning of recently assimilated carbon within the *Lolium perenne* plant and to the belowground compartments and (ii) whether the responses to elevated CO₂ are mediated by the availability of N in the soil. Additionally, two indicators of the fate of carbon in the soil were assessed: the decomposition rate of root-released organic carbon in the rhizosphere soil and the C concentration in the soil after a 9 year CO₂ enrichment.

Pulse labelling of shoots with ¹⁴C as a tracer was used to study the allocation of recently fixed carbon within all compartments of the plant-soil-micro-organism ecosystem. In our study, plants were labelled in the laboratory in order to control and regulate the climatic and labelling parameters during labelling.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

The FACE experiment is located at the Swiss Federal Institute of Technology (ETH) at the field station of

Eschikon, Switzerland. The first CO₂ enrichment on this system started the 31st May 1993. Thus, plants and soil of elevated CO₂ plots had been enriching for 9 years when the experiment started in 2002. The clay loam soil contained a mean of 28% clay, 33% silt and 36% sand. The soil pH value ranged between 6.5 and 7.6 (Hebeisen et al., 1997).

Three blocks were established. Within each block were a ring at ambient CO₂ concentration (at about 35 Pa pCO₂) and a ring at elevated CO₂ concentration (at about 60 Pa pCO₂ during daylight hours, during the growing period from March to October). Monoculture plots (2.8×1.9 m) of *L. perenne* cv. Bastion had been established within each ring in 1993. These plots received either a low or high fertilisation level of NH₄NO₃ fertiliser. The low N plots received 14 g m⁻² y⁻¹, whereas high N plots received 42 g m⁻² y⁻¹ in 1993 and 56 g m⁻² y⁻¹ thereafter. The amount of the fertiliser was split into portions of 30, 20, 20, 15, 15% after the first to the fifth defoliation (5 cm cutting height), respectively.

Seeds of *L. perenne* cv. Bastion for this experiment were germinated in a greenhouse at ambient CO₂. Bare rooted seedlings were transplanted 35 d after sowing into undisturbed soil cores (April 19 for the spring sampling and July 10 for the autumn sampling; one plant per soil core) in enriched and ambient CO₂ rings. Soil cores were formed by pushing PVC tubes (diameter = 8 cm, height = 20 cm) into the soil. The mineral horizon (H2) was found below 20 cm. Therefore most of the rye-grass roots are found in the first 20 cm of soil. As the plant density of the previously established *L. perenne* plants was not high after 9 years, it allowed the PVC tubes to be randomly positioned in gaps between plants. Therefore, the test plants were grown in undisturbed soil cores and were subjected during their development to competition for light from the other resident plants in the plots. Sixteen soil cores were installed in each block. Forty eight cores (4×2 (N levels) ×2 (CO₂ concentration) ×3 (blocks)), each with a young ryegrass plant, were excavated both on June 14 (spring sampling) and on September 27 (autumn sampling). Plants of spring sampling were exposed to elevated CO₂ for 56 d. They were defoliated and fertilised once (30% of the total annual amount, i.e. 4.2 g m⁻² under low N and 16.8 g m⁻² under high N). Plants of the autumn sampling were exposed to elevated CO₂ for 79 d. They were defoliated three times and the soil monoliths fertilised four times (85% of the annual input, i.e. 11.9 g m⁻² under low N and 47.6 g m⁻² under high N). Immediately after excavation from the rings, the cylinders were brought back to the laboratory for ¹⁴C labelling in order to precisely regulate the climatic and labelling parameters during labelling.

2.2. ¹⁴C–CO₂ pulse labelling of plant soil cores

The soil cores were set into air tight PVC pipes (diameter = 10 cm, height = 35 cm) for ¹⁴CO₂ pulse labelling. Aboveground was separated from belowground

compartments for the measurement of the rhizosphere respiration. PVC stopper and liquid silicon (Rhodorsil® RTV 3428, Rhone Poulenc, France) ensured total air tightness between the aboveground and belowground compartments. Two 5 mm diameter holes in the stopper served as the inlet/outlet for flushing of the belowground compartment by a stream of CO₂ free air.

For the 24 h prior to labelling, the PVC pipes, with the plants, were set within the assimilation chamber for acclimation to climatic conditions of the chamber. Climatic conditions were maintained as follows: photon flux density of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the top of the PVC pipes, 22 °C day/night temperature. CO₂ partial pressure in the chamber was continuously regulated at 36 ± 0.7 Pa for the cores coming from ambient rings and at 60 ± 1.3 Pa for the cores coming from enriched rings. A flow scintillation analyser Radiomatic A500TR (Packard Instruments Co. Inc., CT, USA), equipped with a 15 ml plastic scintillation cell (Packard Instruments), was coupled with an Infra Red Gas Analyser (IRGA; ADC 225 MK3, Hoddesdon, United Kingdom) and computers in order to monitor both ¹⁴C activity and CO₂ concentration within the chamber. The ¹⁴CO₂ was generated by addition of lactic acid (1 M) to NaH¹⁴CO₃. The specific activity within the chamber (ratio ¹⁴C/¹²C) was maintained constant for 90 min at 40 kBq mg C⁻¹ for the labelling of the spring sampling and at 55 kBq mg C⁻¹ for the autumn sampling. An aquarium pump was used to rapidly inject the ¹⁴CO₂ into the chamber. A fan ensured homogenisation of the atmosphere within the chamber. At the end of the labelling, air from the chamber was forced to pass through a soda lime cartridge that trapped the remaining radioactivity and the chamber was flushed with ¹²CO₂ to maintain constant CO₂ concentration. From the end of the labelling until the end of the chase period, i.e. 48 h, the soil compartment of the PVC pipe was continuously flushed with CO₂ free air and the CO₂ released from belowground (rhizosphere respiration, RR) was trapped by bubbling into a glass tube containing 200 ml of 1N NaOH.

2.3. Harvest

Plants were sampled 48 h after labelling and were divided into laminae, sheaths and roots, carefully removed from the soil by hand picking. Soil adhering to roots was collected with a brush and sieved at 2 mm. Roots were then washed with 0.5 M CaCl₂ (isotonic solution). Bulk soil was sieved at 2 mm and considered as non-adhering soil. At harvest, all samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -30 °C until further analyses.

2.4. Analyses

Plant organs, aliquots of adhering soil and non-adhering soil were lyophilised, weighed and ground to a fine powder.

Carbon content were determined by dry combustion using a C auto-analyser (Flash EA 1112 series, Thermo Finnigan).

Fourteen C in plant material was counted with a ¹⁴C analyser (Radiomatic series Flo-one A 500, Packard, USA) on-line at the outflow of the C and N auto-analyser (Benoit et al., 1994), without the use of a scintillation cocktail compounds and therefore, this method generates no waste. As soil ¹⁴C activity was too low to be analysed with the previous method, a sample oxidizer (Model 307, Packard, USA) was used and the CO₂ in the combustion products was trapped in a liquid scintillation cocktail (Carbosorb and Permafluor, Packard, USA) and counted with a liquid scintillation counter (Tri-Carb 2100 Tr, Packard).

The microbial biomass of adhering and non-adhering soil was estimated immediately after harvest on fresh samples by chloroform fumigation-extraction (Vance et al., 1987). Radioactivity of the microbial biomass was determined by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2100 Tr, Packard) on 1 ml aliquot of K₂SO₄ extraction solution (0.5 M) added to 10 ml Packard Ultima-Flo Cocktail. Carbon dioxide radioactivity, captured from the rhizosphere respiration in NaOH traps, was counted with Packard Ultima-Gold Cocktail.

For the autumn sampling mineralisation of ¹⁴C root released organic compounds and of organic matter was assessed on 20 g of adhering soil incubated for 30 d at 22 °C (the same temperature as for the rhizosphere respiration) in the dark in glass jars. Total CO₂ and ¹⁴CO₂ mineralised by microbial biomass was trapped in 20 ml of 1 M NaOH. NaOH traps were counted regularly during the 30 d incubation in order to establish the kinetics of mineralisation. Fourteen C content of NaOH was counted in liquid scintillation (Tri-Carb 2100 Tr, Packard) with the Packard Ultima Gold Cocktail. The C and N content of liquid solution (K₂SO₄ from extraction fumigation and NaOH from rhizosphere respiration traps and incubation) was analysed by a Total Organic Carbon analyser (TOC-VCSH, Shimadzu, Japan) coupled on line with a N analyser (TNM-1, Shimadzu, Japan).

Carbon 14 activity of a compartment was expressed as a percentage of the activity recovered in the compartment from total radioactivity recovered (%TRR) in the plant soil system (plant, soil, C microbial biomass and belowground respiration). The %TRR of a given compartment indicates ¹⁴C distribution as a result of both size and metabolic activity of the compartment. It corresponds to the relative sink strength of the compartment (Cralle and Heichel, 1985; Robin et al., 1987).

2.5. Statistical analyses

The entire data set consists of 96 cores harvested destructively (2 CO₂ × 2 N levels × 3 blocks × 2 dates × 4 cores per plot). The experiment was analysed as a split plot design with CO₂ as the main-plot factor, N fertilization the sub-plot and three replications (3 blocks; Hebeisen et al.,

1997). The data was statistically analysed by ANOVA and Tukey-Kramer test in order to compare all pairs of means in case of interaction between effects (JMPin, SAS Institute 1989–1997®). All tests were carried out at the 95% confidence level.

3. Results

3.1. Plant productivity

No significant stimulation of total dry matter (DM) production under elevated CO₂ was observed at spring sampling (Table 1). However, at autumn sampling, there was a significant interaction between CO₂ and N effects. Under high N treatment, elevated CO₂ increased DM production ($P < 0.001$; Tukey Kramer test). At both sampling dates, high N supply increased total DM (Table 1). The root to shoot biomass ratio was not significantly affected by CO₂ at either sampling date, but was significantly decreased by high N treatment at the spring sampling.

3.2. Belowground ¹⁴C partitioning

3.2.1. Spring

Under elevated CO₂ and ambient CO₂ the ¹⁴C-assimilates allocated belowground were 46 and 50%

(mean of both N treatments), respectively (Table 2). A total of 33 and 36% of ¹⁴C in the elevated and ambient CO₂ treatments, respectively, was released from roots (¹⁴C in rhizosphere respiration, soil and microbial biomass) (Table 2). These values were not significantly different.

The belowground ¹⁴C allocation was lower in the high than in the low N treatment (39 vs. 57% TRR); proportionally less ¹⁴C was released from high than from low N plants (27 vs. 42% TRR in rhizosphere respiration, soil and microbial biomass; Table 2).

3.2.2. Autumn

At the autumn sampling, there was an indication of an interaction between CO₂ and N (Table 2) for ¹⁴C allocation aboveground ($P = 0.057$) and belowground ($P = 0.059$). Under high N, a lower proportion of ¹⁴C was allocated belowground ($P < 0.001$; Tukey Kramer test; sum of the ¹⁴C allocated to microbial biomass, adhering and non-adhering soils).

Nitrogen had no significant effect on the pattern of ¹⁴C allocation in the plant-soil system other than reducing rhizosphere respiration at elevated CO₂ (Table 2).

3.3. Microbial C

A higher microbial biomass was found in adhering soil than in non-adhering soil under ambient CO₂ (Table 3). Microbial biomass (mgC kg⁻¹ soil) in

Table 1

Plant dry matter (g plant⁻¹) and Root to Shoot biomass ratio (R/S) at the spring and at the autumn samplings of rye grass monoculture plots at ambient (CO₂ –) or enriched (CO₂ +) CO₂, under two N treatments

Spring sampling	N supply (g.m ⁻²)	Shoots (g)		Roots (g)		Total (g)		R/S	
CO ₂ +	56	2.8 (0.98)		1.2 (0.25)		4.0 (1.05)		0.43 (0.171)	
	14	1.2 (0.29)		1.7 (0.61)		2.9 (0.76)		1.41 (0.678)	
CO ₂ -	56	2.5 (0.63)		1.2 (0.38)		3.7 (0.92)		0.48 (0.073)	
	14	1.5 (0.34)		1.6 (0.55)		3.1 (0.85)		1.07 (0.221)	
Statistics		<i>Fvalue</i>	<i>P</i>	<i>Fvalue</i>	<i>P</i>	<i>Fvalue</i>	<i>P</i>	<i>Fvalue</i>	<i>P</i>
	CO ₂	0.011	NS	0.015	NS	0.001	NS	3.421	NS
	N	20.31	**	4.836	*	4.183	*	16.13	**
	N X CO ₂	0.821	NS	0.001	NS	0.394	NS	1.373	NS
Autumn sampling	N supply (g.m ⁻²)	Shoots (g)		Roots (g)		Total (g)		R/S	
CO ₂ +	56	2.9 (0.64) a		1.3 (0.39)		4.2 (0.81)		0.45 (0.213)	
	14	1.1 (0.21) b		0.8 (0.35)		1.9 (0.44)		0.73 (0.320)	
CO ₂ -	56	1.5 (0.68) b		1.1 (0.48)		2.6 (1.02)		0.73 (0.328)	
	14	0.7 (0.20) b		0.6 (0.14)		1.3 (0.26)		0.86 (0.243)	
Statistics		<i>Fvalue</i>	<i>P</i>	<i>Fvalue</i>	<i>P</i>	<i>Fvalue</i>	<i>P</i>	<i>Fvalue</i>	<i>P</i>
	CO ₂	3.331	NS	1.625	NS	3.246	NS	2.162	NS
	N	23.24	**	3.691	*	15.76	**	1.062	NS
	N X CO ₂	5.942	*	0.003	NS	2.372	NS	1.435	NS

Numbers given in parentheses represent standard deviation ($n = 3$). Letters represent the results of the Tukey Kramer test when the interaction N X CO₂ is significant. Means followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ whatever the treatments, for a given compartment. NS, *, ** for P values > 0.05 , < 0.05 , < 0.01 , respectively.

Table 2

^{14}C assimilate partitioning expressed as a percentage of total ^{14}C recovered (%TRR) in shoots, belowground (roots; rhizosphere CO_2 , RR; and soil including adhering soil, non adhering soil and microbial biomass), at the spring and at the autumn samplings in rye grass monoculture at ambient (CO_2 –) or enriched (CO_2 +) CO_2 , under two N treatments. Numbers given in parentheses represent standard deviation ($n=3$)

Spring sampling	N supply (g.m^{-2})	Shoots (%)		Below ground (%)		Roots (%)		RR (%)		Soil (%)	
CO_2 +	56	62.0 (7.24)		38.0 (7.20)		11.2 (2.14)		12.1 (2.21)		14.7 (4.82)	
	14	45.0 (7.57)		54.0 (7.82)		15.0 (4.14)		16.5 (4.32)		22.5 (5.31)	
CO_2 –	56	60.0 (7.49)		40.0 (7.49)		13.0 (2.95)		11.0 (3.05)		16.0 (5.68)	
	14	40.0 (7.95)		60.0 (7.95)		14.6 (4.11)		15.4 (2.93)		30.0 (10.86)	
Statistics		<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>
CO_2		0.307	NS	0.275	NS	1.991	NS	0.091	NS	0.247	NS
N		20.86	**	20.74	**	3.057	NS	7.151	*	6.622	*
N X CO_2		0.068	NS	0.073	NS	0.093	NS	0.035	NS	0.117	NS
Autumn sampling	N supply (g.m^{-2})	Shoots (%)		Below ground (%)		Roots (%)		RR (%)		Soil (%)	
CO_2 +	56	75.0 (4.24) a		25.0 (4.56) a		11.6 (2.12)		7.2 (2.21)		6.2 (1.08)	
	14	64.0 (5.98) ab		36.0 (5.71) ab		12.5 (2.93)		12.9 (3.44)		10.6 (1.98)	
CO_2 –	56	57.1 (7.21) b		42.9 (8.24) b		9.3 (4.12)		10.8 (1.99)		22.8 (3.89)	
	14	56.4 (9.32) b		43.6 (8.33) b		8.7 (2.32)		13.0 (1.60)		21.9 (7.58)	
Statistics		<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>	<i>F</i> value	<i>P</i>
CO_2		6.534	NS	6.851	NS	0.784	NS	4.492	NS	7.98	*
N		2.885	NS	2.806	S	0.141	NS	5.403	*	1.475	NS
N X CO_2		3.821	NS	3.775	NS	0.755	NS	2.341	NS	1.28	NS

Letters represent the results of the Tukey Kramer test when the interaction N X CO_2 is significant. Means followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$ whatever the treatments, for a given compartment. NS, *, ** for P values > 0.05 , < 0.05 , < 0.01 , respectively.

adhering soil was not significantly affected by elevated CO_2 at the spring sampling, whereas it was decreased at the autumn sampling. Microbial biomass in non-adhering soil remained unaffected by all treatments in both experimental periods (Table 3).

3.4. Mineralisation of total carbon and of ^{14}C -organic compounds in adhering soil (rhizodeposits and turn-over of labelled microbial biomass)

In the autumn experiment, total CO_2 (unlabelled and labelled carbon) and $^{14}\text{CO}_2$ effluxes from adhering soil (expressed in mgC per gram of adhering soil and in becquerel per gram of adhering soil) were measured for a 30 d incubation period after sampling. The amount of total C and ^{14}C mineralised were significantly higher under elevated than under ambient CO_2 at the end of the 30 d incubation

period ($P < 0.001$; Figs. 1(A) and 2). Thirty % of ^{14}C initially present in adhering soil was mineralised under ambient CO_2 , whereas 44% of ^{14}C initially present in adhering soil was mineralised under elevated CO_2 ($P = 0.002$; Fig. 1(B)).

The flux of C mineralisation, i.e. the amount of total respired C (mgC kg^{-1} adhering soil d^{-1}), was significantly higher ($P = 0.016$) under elevated (0.049 mgC g^{-1} adhering soil d^{-1}) than under ambient CO_2 (0.034 mgC g^{-1} adhering soil d^{-1}).

Fertilisation had no effect on total CO_2 and $^{14}\text{CO}_2$ respiration fluxes (Figs. 1 and 2).

4. Discussion

At the beginning of the Swiss FACE experiment in 1993, harvestable biomass increased only by 10% in response to

Table 3

Microbial C (mgC kg^{-1} soil) from adhering soil (AS) and non-adhering soil (NAS) at the spring and autumn samplings of rye grass monoculture plots at ambient (CO_2 –) or enriched (CO_2 +) CO_2 , under two N treatments ($n=3$)

	N supply (g.m ⁻²)	Spring sampling		Rhizosphere effect		Autumn sampling		Rhizosphere effect		
		mgC. Kg ⁻¹ AS	mgC. Kg ⁻¹ NAS	Fvalue	P	mgC. Kg ⁻¹ AS	mgC. Kg ⁻¹ NAS	Fvalue	P	
CO ₂ +	56	355 (99)	338 (79)	0.995	NS	304 (81)	304 (52)	0.389	NS	
	14	400 (94)	372 (89)	0.326	NS	343 (72)	363 (87)	0.491	NS	
CO ₂ -	56	528 (66)	291 (67)	3.254	*	538 (121)	307 (72)	3.123	*	
	14	471 (109)	263 (66)	4.214	*	646 (59)	311 (41)	4.112	*	
Statistics		Fvalue	P	Fvalue	P	F	value	P	Fvalue	P
	CO ₂	0.908	NS	2.943	NS		42.91	**	0.926	NS
	N	0.851	NS	0.032	NS		3.123	NS	0.483	NS
	N X CO ₂	0.005	NS	0.443	NS		0.721	NS	0.894	NS

NS, *, ** for P values > 0.05 , < 0.05 , < 0.01 , respectively.

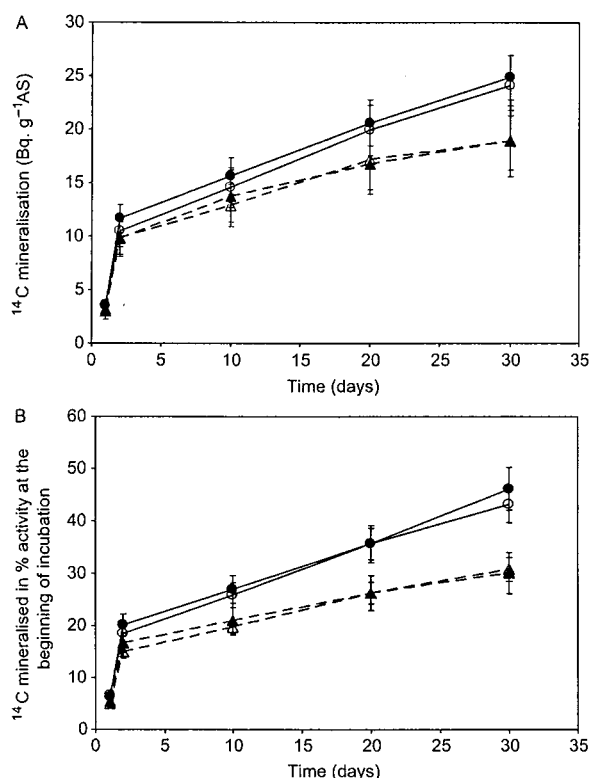


Fig. 1. $^{14}\text{CO}_2$ production during incubation of adhering soil (AS), after the autumn sampling of rye grass monoculture plots at ambient (CO_2-) or enriched (CO_2+) CO_2 , under two N treatments ($n=3$). (A): mineralisation expressed as Bq respired per g of adhering soil. (B): mineralisation expressed as % of the ^{14}C activity in the sample at the beginning of the incubation. Vertical bars indicate standard deviation ($n=3$). ● Enriched and N fertilised 56 g m^{-2} ; ○ enriched and N fertilised 14 g m^{-2} ; ▲ ambient and N fertilised 56 g m^{-2} ; △ ambient and N fertilised 14 g m^{-2} .

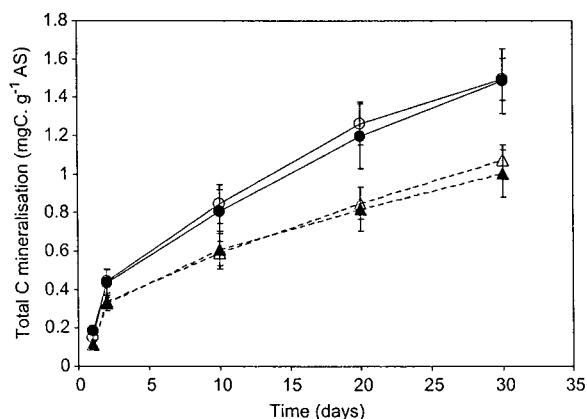


Fig. 2. Total CO_2 production during incubation of adhering soil, expressed as mgC g^{-1} of adhering soil, after the autumn sampling of rye grass monoculture plots at ambient (CO_2-) or enriched (CO_2+) CO_2 , under two N treatments ($n=3$). Vertical bars indicate standard deviation ($n=3$). ● Enriched and N fertilised 56 g m^{-2} ; ○ enriched and N fertilised 14 g m^{-2} ; ▲ ambient and N fertilised 56 g m^{-2} ; △ ambient and N fertilised 14 g m^{-2} .

elevated CO_2 (Hebeisen et al., 1997). In agreement with those previous results, elevated CO_2 had no consequences for DM production in the spring sampling (after 56 d exposure period to elevated CO_2). Fertilisation effects were more pronounced than CO_2 effects (Table 1). Consistently, high N supply stimulated the allocation of recently assimilated C to shoots and reduced allocation belowground, whereas elevated CO_2 had no effect (Table 2). This pattern of C allocation at high N is consistent with those reported in a number of other studies (Johansson, 1992; Marschner et al., 1996; Henry et al., 2005).

Results were quite different in the autumn sampling (exposure to elevated CO_2 for 79 d); there was an interaction between CO_2 and N for shoot DM (Table 1) as there was stimulation of shoot biomass only with high N. Therefore, the response of shoot growth to elevated CO_2 was dependent upon nitrogen availability as has previously been observed at this experimental site in rye grass (Hebeisen et al., 1997; Daepf et al., 2000). Previous studies suggested that this response could be the consequence of defoliation. Indeed, after defoliation, the residual shoot biomass differed between the high and low N treatments presumably because the tiller density was consistently greater under high than under low N (Schneider, 2003). Moreover, the plants harvested in autumn were defoliated three times vs. once for the plants sampled in spring. An influence of the defoliation regime cannot be excluded.

Root biomass and root to shoot ratio ($R: S_{\text{DM}}$) were not affected by elevated CO_2 (Table 1), a result contrasting with those at the same site which show a stimulation of root production leading to a higher root to shoot ratio under elevated CO_2 (Soussana et al., 1996; Daepf et al., 2001; Suter et al., 2002). A possible cause for this difference could be a limitation of root growth induced by the cylinders. However, this was not the case because the whole soil volume of the cores was not explored at harvest and the root density was not high (range $1.6\text{--}5 \text{ mg roots cm}^{-3}$ soil). A more probable cause for the differing results is likely to be the relatively short period of growth of the plants in this experiment (56 or 79 d). For the $R: S_{\text{DM}}$, no effect of elevated CO_2 was observed on 73 d old *L. perenne* grown under controlled conditions; this was attributed to the short exposure of plants to elevated CO_2 (Suter et al., 2002).

At the autumn sampling, under high N, the stimulation of shoot biomass under elevated CO_2 was consistent and recently assimilated C was preferentially allocated aboveground. This meant that allocation to belowground compartments was proportionally lowered (Table 2). As a consequence under high N microbial growth was apparently limited by the availability of C (Table 3), rather than by the availability of N as there was no effect of N fertilisation on microbial C. If it is assumed that microbial biomass is correlated with the fluxes of C released by the roots (Darrah, 1991), especially rhizodeposition, then at the time of the autumn sampling, it can be concluded that the rhizodeposition was reduced under increased CO_2 . As the size of root systems was unaffected by CO_2 exposure it is likely that

the specific exudation from roots (g exudation per g of roots, or per root length or per exudation site) was reduced in the plants exposed to elevated CO₂.

After 9 consecutive years of CO₂ fumigation, no significant change in total soil C was observed (data not shown), in accordance with previous data on the same site (Van Kessel et al., 2000a,b; Horwath et al., 2001; Van Groeningen et al., 2002; De Graaff et al., 2004). A more rapid turnover rate of labile C may explain the unchanged total soil C content of both CO₂ treatments (Horwath et al., 2001). Indeed, FACE increased soil respiration in a spring wheat and sugar beet fields with the rhizosphere respiration representing 65–70% of the soil respiration (Pendall et al., 2001; Soe et al., 2004). Soil from *L. perenne* sward after 9 years of exposure of FACE and low N fertilisation showed significantly higher respiration than the soil under *L. perenne* receiving ambient CO₂ (De Graaff et al., 2004). Our results, obtained after the autumn experimental period, were in agreement with those data under low N but the increased soil respiration after 9 years of elevated CO₂ in the present experiment also under high N. Indeed, easily decomposable rhizodeposited C (Fig. 1) and total C (unlabelled C coming from rhizodeposits and more recalcitrant C, Fig. 2) are mineralised faster in adhering soils from plants of enriched rings despite a lower microbial biomass in those soils. Two main hypotheses can be formulated: (i) that the structure and activity of the microbial communities has been modified during the 9 years of CO₂ enrichment as compared to ambient rings, as shown by Montealegre et al. (2002); Van Groeningen et al. (2005), so that they are able to mineralise labile organic matter faster and (ii) that the composition of rhizodeposits exuded at elevated rather than at ambient CO₂ contain a higher proportion of easily decomposable compounds which are thus mineralised faster than other components. Studies under controlled conditions indicate that the composition of rhizodeposits was influenced by elevated CO₂: lower amounts of phenolic acids and total sugars were exuded at elevated CO₂ (Hodge et al., 1998) and it has been suggested that exuded compounds exhibited a higher C:N ratio under elevated than at ambient CO₂ (Grayston et al., 1998). The changes in exudate composition could explain a shift in the microbial community structure but further experimental work is needed to prove that a CO₂ induced shift in the composition of rhizodeposits could induce higher mineralisation rate under elevated CO₂.

Mineralisation was higher in the elevated as opposed to ambient CO₂ treatment but the amounts of CO₂ were very small (0.032 Bq g⁻¹ adhering soil d⁻¹ and 0.041 Bq g⁻¹ adhering soil d⁻¹ under ambient and elevated CO₂ respectively, measured over 30 d at 22 °C) compared to rhizosphere respiration (17 Bq g⁻¹ adhering soil d⁻¹ and 20 Bq g⁻¹ adhering soil d⁻¹ under elevated and ambient CO₂, respectively, measured over 48 h at 22 °C: Table 2). Therefore, it can be argued from these data that the root respiration represents the major contributor of the

rhizosphere respiration, as shown by Pendall et al. (2001); Andrews et al. (1999). However, it should be mentioned that mineralisation rates were determined in vitro, on adhering soil sampled and, therefore, without the presence of roots. Consequently, it may underestimate the mineralisation rates in the rhizosphere as no additional C input by roots occurred during the incubation.

5. Conclusion

In young rye grass plants growing in the field in soil monoliths enriched with elevated CO₂ for 9 years there was no stimulation of allocation of recently assimilated C to the rhizosphere and no increase in sequestration of C in the soil. In the elevated as compared with the ambient CO₂ treatment there was less allocation of rhizodeposited C belowground at the autumn sampling. Patterns of C allocation in this plant-soil ecosystem are complex because they result from the physiological status of the plant which in turn is determined by multiple interactions with the environment (CO₂, climate) and the management of the plots (N, defoliations). The stimulation of C mineralisation by elevated CO₂ implies a shift in the structure and the activity of microbial communities and/or in the composition of root-released organic compounds.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr P. Montpied (INRA Champenoux, France) for his advice on the statistical analyses, Dr M.J.M. Hay (AgResearch Grasslands, Palmerston-North, New Zealand) for his linguistic help, and the colleagues of the UMR for their participation in the samplings. The technical assistance provided by Mr P. Marchal for the CN and TOC analyses is also gratefully acknowledged.

References

- Ainsworth, E.A., Davey, P.A., Hymus, G.J., Osborne, C.E., Rogers, A., Blum, H., Nösberger, J., Long, S., 2003. Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilization levels under Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant Cell and Environment* 26, 705–714.
- Andrews, J.A., Harrison, K.G., Matamala, R., Schlesinger, W.H., 1999. Sequestration of root respiration from total respiration using carbon-13 labelling during Free Air Carbon Dioxide Enrichment (FACE). *Soil Science Society of American Journal* 63, 1429–1435.
- Benoit, P., Choné, T., Barriuso, E., 1994. On line measurement of total C and ¹⁴C of ¹⁴C labelled organic matter. *Soil Biology & Biochemistry* 26, 407–411.
- Cralle, H.T., Heichel, G.H., 1985. Interorgan photosynthate partitioning in alfalfa. *Plant Physiology* 79, 381–385.
- Curl, E.A., Truelove, B., 1986. *The Rhizosphere*. Springer, Berlin, Germany.
- Daepf, M., Suter, D., Almeida, J.P.F., Isopp, H., Hartwig, U.A., Blum, H., Nösberger, J., Lüscher, A., 2000. Yield response of *Lolium perenne* swards to free air CO₂ enrichment increased over six years in a high-N-input system. *Global Change Biology* 6, 805–816.

- Daepf, M., Nösberger, J., Lüscher, A., 2001. Nitrogen fertilisation and developmental stage alter the response of *Lolium perenne* to elevated CO₂. *New Phytologist* 150, 347–358.
- Darrah, P.R., 1991. Models of rhizosphere. II. A quasithree-dimensional simulation of the microbial population dynamics around a growing root releasing soluble exudates. *Plant and Soil* 138, 147–158.
- De Graaff, M.A., Six, J., Harris, D., Blum, H., Van Kessel, C., 2004. Decomposition of soil and plant carbon from pasture systems after 9 years of exposure to elevated CO₂: impact on C cycling and modeling. *Global Change Biology* 10, 1922–1935.
- Gill, R.A., Polley, H.W., Johnson, H.B., Anderson, L.J., Maherali, H., Jackson, R.B., 2002. Non-linear grassland responses to past and future atmospheric CO₂. *Nature* 417, 279–282.
- Grayston, S.J., Campbell, C.D., Lutze, J.L., Gifford, R.M., 1998. Impact of elevated CO₂ on the metabolic diversity of microbial communities in N-limited grass swards. *Plant and Soil* 203, 289–300.
- Grayston, S.J., Vanghan, D., Jones, D., 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5, 29–56.
- Hale, M.G., Moore, L.D., 1979. Factors affecting root exudation II: 1970–1978. *Advances in Agronomy* 31, 93–124.
- Hebeisen, T., Lüscher, A., Zanetti, S., Fischer, B.U., Hartwig, U.A., Frehner, M., Hendrey, G.R., Blum, H., Nösberger, J., 1997. The different responses of *Trifolium repens* L. and *Lolium perenne* L. grassland to free air CO₂ enrichment and management. *Global Change Biology* 3, 149–160.
- Henry, F., Nguyen, C., Paterson, E., Sim, A., Robin, C., 2005. How does nitrogen availability alter rhizodeposition of *Lolium multiflorum* at vegetative stage. *Plant and Soil* 263, 181–191.
- Hodge, A., Paterson, E., Grayston, S.J., Campbell, C.D., Ord, B.G., Killham, K., 1998. Characterisation and microbial utilisation of exudate material from the rhizosphere of *Lolium perenne* grown under CO₂ enrichment. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1033–1043.
- Horwath, W.R., Van Kessel, C., Hartwig, U.A., Harris, D., 2001. Use of ¹³C isotopes to determine net carbon sequestration in soil under ambient and elevated CO₂. In: Lal, R., Kimble, J.M., Follet, R.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Assessment Methods for Soil Carbon*. CRC Press, Boca Raton, pp. 221–231.
- Johansson, G., 1992. Belowground carbon distribution in barley (*Hordeum vulgare* L.) with and without nitrogen fertilisation. *Plant and Soil* 144, 93–99.
- Kimball, B., 1983. Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analyses of 430 prior observations. *Agronomy Journal* 75, 779–788.
- Long, S., Drake, B.G., 1991. Effect of the long term elevation of CO₂ concentration in the field on the quantum yield of photosynthesis of the C3 sedge *Scirpus olneyi*. *Plant Physiology* 96, 221–226.
- Marschner, H., Kirkby, E.A., Cakmak, I., 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47, 1255–1263.
- Montealegre, C.M., Van Kessel, C., Russelle, M.P., Sadowsky, M.J., 2002. Changes in microbial activity and composition in a pasture ecosystem exposed to elevated atmospheric carbon dioxide. *Plant and Soil* 243, 197–207.
- Niklaus, P.A., 1998. Effects of elevated CO₂ in soil microbiota in calcareous grassland. *Global Change Biology* 4, 451–458.
- Niklaus, P.A., Stocker, R., Körner, C., Leadley, P.W., 2000. CO₂ flux estimates tend to overestimate ecosystem C sequestration at elevated CO₂. *Functional Ecology* 14, 546–559.
- Niklaus, P.A., Wohlfender, M., Siegwolf, R., Körner, C., 2001. Effects of six years atmospheric CO₂ enrichment on plant, soil, and soil microbial C of a calcareous grassland. *Plant and Soil* 233, 189–202.
- Pendall, E., Leavitt, S.W., Brooks, T., Kimball, B.A., Pinter, P.J., Wall, G.W., LaMorte, R.L., Wechsung, G., Wechsung, F., Adamsen, F., Mathias, A.D., Thompson, T.L., 2001. Elevated CO₂ stimulates soil respiration in a FACE wheat field. *Basic Applied Ecology* 2, 193–201.
- Pendall, E., Mosier, A.R., Morgan, J.A., 2004. Rhizodeposition stimulated by elevated CO₂ in a semiarid grassland. *Global Change Biology* 10, 447–468.
- Robin, C., Choné, T., Guckert, A., 1987. Rôle de la position de la feuille dans l'assimilation et le transport du carbone chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). *Agronomie* 7, 191–201.
- Rogers, A., Fischer, B.U., Bryant, J., Frehner, M., Blum, H., Raines, C.A., Long, S.P., 1998. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilisation. *Perennial ryegrass under free-air CO₂ enrichment*. *Plant Physiology* 118, 683–689.
- Ross, D.J., Sagar, S., Tate, K.R., Newton, P.C.D., 1995. Elevated CO₂ and temperature effects on soil carbon and nitrogen cycling in ryegrass/white clover turves of an endoaquept soil. *Plant and Soil* 176, 37–49.
- Ross, D.J., Sagar, S., Tate, K.R., Feltham, C.W., Newton, P.C.D., 1996. Elevated CO₂ effects on carbon and nitrogen cycling in grass/clover turves of a Psammaquept soil. *Plant and Soil* 182, 185–198.
- Ross, D.J., Newton, P.C.D., Tate, K.R., 2004. Elevated CO₂ effects on herbage production and soil carbon and nitrogen pools and mineralization in a species-rich, grazed pasture on a seasonally dry sand. *Plant and Soil* 260, 183–196.
- Rovira, A.D., 1969. Plant root exudate. *Botanical Review* 35, 35–57.
- Rovira, A.D., 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant and Soil* 11, 53–64.
- Schneider, M., 2003. Mobilisation of soil N and turnover rates of residual biomass: key factors in the response of *Lolium perenne* L. swards to CO₂ enrichment. PhD Thesis, ETH Zurich.
- Soe, A.R.B., Giesemann, A., Anderson, T.H., Weigel, H.J., Buchmann, N., 2004. Soil respiration under elevated CO₂ and its partitioning into recently assimilated and older carbon sources. *Plant and Soil* 262, 85–94.
- Soussana, J.F., Casella, E., Loiseau, P., 1996. Long term effects of CO₂ enrichment and temperature increase on a temperate grass sward. II. Plant nitrogen budgets and root fraction. *Plant and Soil* 182, 101–114.
- Stanton, N.L., 1988. The underground in grasslands. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19, 573–589.
- Suter, D., Frehner, M., Fischer, B.U., Nösberger, J., Lüscher, A., 2002. Elevated CO₂ increases carbon allocation to the roots of *Lolium perenne* under free-air CO₂ enrichment but not in a controlled environment. *New Phytologist* 154, 65–75.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 703–708.
- Van Groenigen, K.J., Harris, D., Horwath, W.R., Hartwig, U.A., Van Kessel, C., 2002. Linking sequestration of ¹³C and ¹⁵N in aggregates in a pasture soil following 8 years of elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 8, 1094–1108.
- Van Groenigen, K.J., Gorissen, A., Six, J., Harris, D., Kuikman, P.J., Van Groenigen, J.W., Van Kessel, C., 2005. Decomposition of ¹⁴C-labeled roots in a pasture soil exposed to 10 years of elevated CO₂. *Soil Biology & Biochemistry* 37 (3), 497–506.
- Van Kessel, C., Nitschelm, J., Horwath, W.R., Harris, D., Walley, F., Lüscher, A., Hartwig, U.A., 2000a. Carbon-13 input and turnover in a pasture soil exposed to long term elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology* 6, 123–135.
- Van Kessel, C., Horwath, W.R., Hartwig, U.A., Harris, D., Lüscher, A., 2000b. Net soil carbon input under ambient and elevated CO₂ concentrations: isotopic evidence after four years. *Global Change Biology* 6, 435–444.
- Whipps, J.M., Lynch, J.M., 1983. Substrate flow and utilization in the rhizosphere of cereal. *New Phytologist* 95, 605–623.
- Williams, M.A., Rice, C.W., Owensby, C.E., 2000. Carbon dynamics and microbial activity in tallgrass prairie exposed to elevated CO₂ for 8 years. *Plant and Soil* 227, 127–131.

Defoliation-induced changes in carbon allocation and root soluble carbon concentration in field-grown *Lolium perenne* plants: do they affect carbon availability, microbes and animal trophic groups in soil?

S. BAZOT,^{*†} J. MIKOLA,[‡] C. NGUYEN^{*} and C. ROBIN^{*}

^{*}Rhizosphere Group, UMR INPL-INRA 'Agronomie et Environnement', Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), BP 172, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France, and [‡]Department of Biological and Environmental Science, PO Box 35 (YAC), FIN-40014 University of Jyväskylä, Finland

Summary

1. It is hypothesized that defoliation-induced changes in plant carbon allocation and root soluble C concentration modify rhizosphere C availability and, further, the abundance and activity of soil microbes and their grazers. To test this hypothesis, field-grown *Lolium perenne* swards were defoliated twice during their second growing season at two nitrogen availabilities (added N or no added N). Plant, soil and microbial attributes were measured 2 and 4 days after the last defoliation, and nematode abundance was measured 6 days after the last defoliation.

2. Defoliation decreased shoot production in plots where N was added, but had no significant effect in plots where N was not added. Root biomass and the ratio of root mass to shoot production were not affected.

3. Defoliation increased root soluble C concentration by 26% at the first harvest (2 days after defoliation) and by 18% at the second harvest (4 days after defoliation). Leaf N concentration was 27% lower in defoliated than in non-defoliated swards at the first harvest, while that of stems was 14% higher in defoliated swards at both harvests, and that of roots was not affected. Defoliation increased root C : N ratio, decreased stem C : N ratio, and did not have a statistically significant effect on leaf C : N ratio.

4. Soil attributes (soil soluble C concentration and soil C and N concentrations) were not affected by defoliation. Similarly, microbial attributes such as microbial C and N content, bacterial abundance in rhizosphere soil, and diversity of C sources utilized by the rhizosphere microbial community, did not differ between defoliated and non-defoliated swards.

5. Among nematode trophic groups, defoliation reduced the abundance of fungivorous and herbivorous nematodes by 70 and 47%, respectively, but did not affect the abundance of bacterivorous, omnivorous and predatory nematodes.

6. Although defoliation altered plant C allocation and root soluble C concentration, these changes did not influence C availability, soil microbial growth or the abundance of bacteria-feeding nematodes in the plant rhizosphere. Instead, the effects on root- and fungus-feeding nematodes suggest that the effects of defoliation on soil communities were propagated not through the effects of root-released C on bacteria and bacterial grazers, but through effects of root quality on root-feeders and possibly through effects of mycorrhizal fungi on fungus-feeders.

Key-words: grassland, nematodes, root-released carbon, soil community, soil microbes

Functional Ecology (2005) **19**, 886–896

doi: 10.1111/j.1365-2435.2005.01037.x

Introduction

Removal of photosynthetic shoot tissues (defoliation) by grazing animals may have major effects on the structure and functioning of grassland ecosystems. In addition to affecting the composition, shoot production and root turnover of plant communities (McNaughton 1983; McNaughton *et al.* 1998), defoliation alters photosynthetic rates and carbon allocation within plants: the flow of energy in the plant–soil system (Painter & Detling 1981; Richards 1993; Morvan-Bertrand *et al.* 1999). It is well established that, immediately after defoliation, C is remobilized from reserves to sustain the needs of regrowing shoot biomass, whereas thereafter regrowth mainly relies on current assimilates (Welker *et al.* 1985; Briske & Richards 1995; De Visser *et al.* 1997). Although remobilized C reserves in grasses originate mainly from remaining leaf and stem rather than root tissues (Richards & Caldwell 1985; Briske & Richards 1995), root growth (Davidson & Milthorpe 1966; Richards 1993) and, with some delay, nitrogen uptake (Jarvis & Macduff 1989; Macduff *et al.* 1989) may also be depressed after defoliation due to the decreased availability of photoassimilates in roots.

While defoliation-induced changes in plant ecophysiology and C allocation are well documented, there is no consistent picture of how these changes may further affect C availability and the abundance of soil organisms in the plant rhizosphere. For instance, defoliation has been reported to have positive (Holland *et al.* 1996; Paterson & Sim 1999; Murray *et al.* 2004); neutral (Todorovic *et al.* 1999); and negative (Mikola & Kytöviita 2002; Dilkes *et al.* 2004) effects on the amount of C released from roots to the rhizosphere. These differences may have several reasons: for example, different plant species have different strategies of regrowth and C allocation (Guitian & Bardgett 2000); or different fractions of assimilated C are used to represent root-released C (Mikola & Kytöviita 2002). Defoliation has also been reported to affect organisms living in the plant rhizosphere, such as microbes (Guitian & Bardgett 2000; Hamilton & Frank 2001) and their grazers (Hokka *et al.* 2004), but it is not clear how widely these effects can be explained by changes in root C release. In addition to affecting root C exudation, defoliation can also change root quality (Seastedt 1985; Merrill *et al.* 1994; Hokka *et al.* 2004) and root mortality (Jarvis & Macduff 1989; Mikola *et al.* 2001), but the relative importance of the different mechanisms is not well known. Nevertheless, it is becoming clear that defoliation-induced changes in grassland soils may have wide-ranging consequences in grassland ecosystems as they can feed back to plant growth, plant N uptake and plant N allocation (Hamilton & Frank 2001; Mikola *et al.* 2005a).

To obtain a comprehensive picture of the effects of defoliation on C transfer from plants to soil, we established a field experiment in which *Lolium perenne* swards were either not defoliated, or defoliated twice during their second growing season. We determined

L. perenne growth and C allocation; rhizosphere C availability; and the abundance, activity and C content of the soil microbial community in the *L. perenne* rhizosphere 2 and 4 days after the last defoliation. To examine whether the effects of defoliation would propagate further through upper trophic levels of the soil food web, we also measured the abundance of different nematode trophic groups in the *L. perenne* rhizosphere 6 days after the last defoliation. Moreover, as the availability of nutrients, especially that of N, may affect the release of organic material from roots (Hale *et al.* 1971; Grayston *et al.* 1996), we investigated the effects of defoliation in swards of two different N availabilities. We tested the hypothesis that defoliation-induced changes in plant C allocation (Holland *et al.* 1996) and root soluble C concentration (Paterson & Sim 1999) lead to changes in rhizosphere C availability and, further, to changes in the abundance and activity of soil microbes and their grazers.

Materials and methods

EXPERIMENTAL DESIGN

We established three experimental grass swards (each 4 × 4 m) by sowing *L. perenne* cv. Canasta seeds (25 kg ha⁻¹) into clay-loamy soil at the experimental station of INRA-SAD at Mirecourt, France (6°81' E, 53°6' N) in September 2002. In February 2003 the grass swards were trimmed to 5 cm above the soil surface to even out plant shoot mass in different swards before the beginning of the second growing season. Each sward was then divided into two plots (2 × 4 m), and each plot further split into two subplots (1 × 4 m). To enhance later sampling of plant roots and rhizosphere soil, four *L. perenne* individuals were randomly selected at each subplot and the soil beneath the plants was isolated from surrounding soil using PVC cylinders (area 50 cm², depth 20 cm). The experimental design consisted of two treatments: N addition and defoliation. Nitrogen addition was applied at plot level: one randomly chosen plot at each sward received additional N, while the other received no additional nutrients. Defoliation, in turn, was applied at subplot level: one randomly chosen subplot at each plot was subjected to defoliation, while the other was left intact. The defoliation treatment included two trimmings, on 30 April and 19 May. For measuring total shoot production, trimmed material was collected, lyophilized and weighted. Nitrogen was added immediately after the February and April trimmings: at each sward, one of the main plots received 50 kg N ha⁻¹ as NH₄NO₃ solution after both trimmings, while the other plot received water only.

SAMPLING PROCEDURE

The grass swards were sampled three times, 2, 4 and 6 days after the last trimming in May. At first and second samplings, two PVC cylinders, including growing *L.*

perenne individuals, were removed from each subplot for measuring plant, soil and soil microbial attributes. Timing of these samplings was determined based on earlier findings, suggesting that defoliation-induced changes in root C release last for 4–5 days (Paterson & Sim 1999, 2000). At the third sampling, two soil cores (area 9.6 cm², depth 10 cm) were taken from each subplot beneath two randomly selected *L. perenne* individuals for examination of the nematode community. This sampling combines the responses of nematodes to both April (25 days before sampling) and May (6 days before sampling) trimming, as while some nematode genera can respond to defoliation within a week, others require 3–4 weeks (Mikola *et al.* 2005b). At each sampling, soil cores and the plants attached to them were kept intact until further analysis in the laboratory.

At first and second samplings, plant shoots were first removed and sorted into leaf and stem mass. Roots were then picked from the soil by hand and the rhizosphere soil (soil adhering to roots) was detached using a brush. After washing roots with 0.5 M CaCl₂ isotonic solution, all plant samples were frozen in liquid N and stored at –30 °C. Rhizosphere soil was sieved (2 mm) and one half was frozen in liquid N, stored at –30 °C and later used for analysing soil C and N concentrations, while the other half was used fresh for analysing soluble C and microbial attributes.

PLANT AND SOIL ANALYSES

For measuring plant and soil C and N concentrations, frozen samples were lyophilized, ground to fine powder, and analysed using a C and N auto-analyser (Flash EA 1112 Serie, Thermo Finnigan, Les Ulis, France). Before grinding, lyophilized plant samples were weighted to obtain the dry mass of different plant parts. The concentration of water-soluble carbohydrates in roots (including free sugars, oligosaccharides, polysaccharides and their derivatives) was then measured using the phenol method (Dubois *et al.* 1956). Briefly, 40 mg subsamples of dry roots were extracted with 2 ml 80% ethanol at 80 °C for 15 min. The extract (2 ml), 1 ml 5% phenol and 5 ml of concentrated H₂SO₄ were then mixed and incubated for 20 min at 25 °C. The light absorption of the mixture was measured at 490 nm and the carbohydrate concentration expressed as hexose equivalent (mol kg^{–1} roots).

The concentration of hot-water-extractable C (HWC) in soil, a measure of soluble organic C composed of microbial and other sources of C (Sparling *et al.* 1998), was determined using the method of Haynes & Francis (1993). Subsamples of fresh soil were first dried at 37 °C for 12 h. Of the dried soil, 5 g was mixed with 25 ml distilled water in a vial and left in an 80 °C water bath for 18 h. At the end of the extraction period, the vial was shaken to ensure the HWC released from the soil was fully suspended in water. Suspension was then filtered through Whatman paper no. 42, and total organic C (TOC) was quantified using a TOC analyser.

MICROBIAL ANALYSES

Microbial C and N contents were estimated from fresh soil samples using the chloroform fumigation–extraction method (Vance *et al.* 1987), and the C and N contents of the K₂SO₄ solution were measured using a TOC analyser (TOC-VCSH CSH/CNS, Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) connected online to an N analyser (TNM-1, Shimadzu).

To evaluate the rhizosphere availability of simple C sources, which are typically released by roots into the soil, we measured the response of soil microbes to the addition of microquantities of labelled ¹⁴C-glucose (Nguyen & Guckert 2001). It has been shown that the proportion of assimilated ¹⁴C stored by microbes increases, and the proportion of assimilated ¹⁴C respired by microbes decreases, with decreasing soil C availability (Nguyen & Henry 2002). The ratio of respired to stored ¹⁴C therefore indicates the availability of C in the soil: the higher the ratio, the higher the C availability. Moreover, respired ¹⁴C gives a relative measure of soil microbial activity (Nguyen & Henry 2002). In the measurement, two glass vials were first filled with 4 g fresh soil (one to be fumigated later with chloroform, the other not) and set in a plastic jar containing 25 ml 1 M NaOH to trap evolving ¹⁴CO₂. In each vial, 100 µl ¹⁴C-glucose solution (37 kBq ml^{–1}; 0.038 µg C ml^{–1}, a negligible amount of C compared with the total pool of soluble C in the soil) was spread over the soil surface and the plastic jar was closed immediately. After 6 days' incubation in the dark at 22 °C, the respired ¹⁴C trapped in NaOH was counted by liquid scintillation (Tri-Carb 2100 Tr, Packard, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). Soil from one vial was then fumigated with chloroform vapour and the amount of stored ¹⁴C calculated as a difference of ¹⁴C extracted by 0.5 M K₂SO₄ from the fumigated and the non-fumigated soil.

To measure bacterial abundance and to evaluate the catabolic profile of the microbial community in the rhizosphere soil, a dilution series of microbial suspensions was produced by mixing 5 g fresh soil with 50 ml phosphate buffer (7.2 g NaCl, 2.8 g N₂HPO₄, 0.4 g KH₂PO₄ l^{–1} water, pH 7.2). The mixture was placed on an orbital shaker (40 r.p.m.) for 10 min and centrifuged (750 r.p.m.) for another 10 min, and the supernatant was used to produce a dilution series of 10^{–2}–10^{–5}. Dilutions from 10^{–3} to 10^{–5} were spread onto agar plates (Tryptone Soy Agar, Difco, Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) to estimate the number of culturable bacterial cells, measured as colony-forming units (CFU). Two replicates were prepared for each dilution, the agar plates were incubated in the dark at 27 °C, and the number of CFU was recorded after 2 days' incubation.

The catabolic profile of the microbial community was characterized using Biolog GN microplates with 95 wells of different C sources (Biolog Inc., Hayward, CA, USA). Each microplate well was inoculated with 150 µl 10^{–3} dilution, plates were incubated in the dark at 27 °C, and colour development in wells

was recorded automatically after 1, 2, 6, 24, 48 and 72 h incubation at 550 nm using a microplate reader (MR 7000 Dynatech, Issy Les Moulineaux, France). Absorbance values for the wells with C sources were blanked against the control well, and all negative absorbance values were set to zero. In order to measure the diversity of C sources utilized, the area under the colour development curve was calculated for each C source. The diversity of utilized C sources was then expressed as Shannon's diversity index:

$$H = -\sum_{i=1}^{95} P_i \log_{10} P_i,$$

where P_i is the proportion of the area under the colour development curve in well i to the sum of areas in all 95 wells (Preston-Mafham *et al.* 2002).

NEMATODE COMMUNITY ANALYSIS

To evaluate the response of soil microfauna to the treatments, nematodes were extracted from 30 g (fresh mass) rhizosphere soil using a wet funnel device (Sohlenius 1979). The total number of live individuals was counted; later, using preserved samples, 150 nematodes per sample were identified to genus and allocated into trophic groups according to Yeates *et al.*, 1993).

STATISTICAL ANALYSES

The mean of the two samples from each subplot was calculated for each variable. The effects of defoliation and N addition on the variables measured were then

analysed with the SPSS statistical package (SPSS 2001) using a nested ANOVA modified to engage the two harvests made for plant, soil, and soil microbial attributes. In this mixed-model ANOVA, (1) N addition, defoliation, harvest time and their second- and third-order interactions were treated as fixed effects; (2) the plot effect, nested within N addition, and its interactions with the fixed effects, were treated as random effects; and (3) random effects were used as error terms for the tests of fixed effects. The nematode data with only one harvest were analysed using nested ANOVA. Homogeneity of variances was tested using Levene's test, and to satisfy the assumption of homogeneity of variances a logarithmic transformation was applied to dependent variables whenever necessary. When the mixed-model ANOVA resulted in a significant interaction between harvest time and defoliation, or between harvest time and N addition, the effects of defoliation and N addition were tested separately within each harvest using a nested ANOVA. When a significant interaction was found between N addition and defoliation, the factors were fixed one by one, and effects of the other factor were analysed within the levels of the fixed factor using a mixed-model ANOVA.

Results

PLANT GROWTH

The effects of N addition and defoliation on shoot production were dependent on each other (Table 1; Fig. 1a). Nitrogen addition promoted 3.3-fold plant shoot production in non-defoliated plots ($F = 479$, $P < 0.001$).

Table 1. F statistics from mixed-model ANOVA for the effects of defoliation (no trimming, or trimming twice during second growing season); nitrogen addition (no added N, or N added after trimmings); and harvest time (2 or 4 days after last trimming) on plant attributes in field-grown *Lolium perenne* swards

Dependent variable	Source of variation						
	Defoliation	N addition	Harvest time	D × N	D × H	N × H	D × N × H
Plant growth							
Shoot production	0.05	35.9**	0.09	16.5*	0.14	0.36	<0.01
Root mass	5.24	0.83	3.52	5.06	0.11	1.84	0.16
Ratio root mass : shoot production	2.88	24.4**	0.83	2.64	0.26	1.31	0.64
Plant C concentration							
Leaf C concentration	58.0**	1.32	0.48	0.05	2.77	0.34	0.02
Stem C concentration	9.97*	8.05*	0.16	0.09	7.07	0.02	0.01
Root C concentration	2.50	9.75*	8.50*	<0.01	0.68	0.80	3.66
Root soluble C concentration	31.5**	0.07	1.83	2.66	10.3*	0.55	0.59
Plant N concentration							
Leaf N concentration	9.27*	336***	11.1*	0.05	9.92*	1.19	0.12
Stem N concentration	16.3*	204***	0.78	2.65	0.40	0.31	0.69
Root N concentration	3.25	13.5*	7.81*	0.12	0.06	1.92	0.48
Plant C : N ratio							
Leaf C : N ratio	0.37	152***	17.8*	0.01	10.3*	0.02	2.22
Stem C : N ratio	105***	204***	0.95	4.09	0.62	0.02	0.10
Root C : N ratio	21.2**	10.7*	3.55	<0.01	0.03	1.25	1.14

Degrees of freedom: 1,4 for each source of variation.

*, **, ***, Treatment effect significant at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

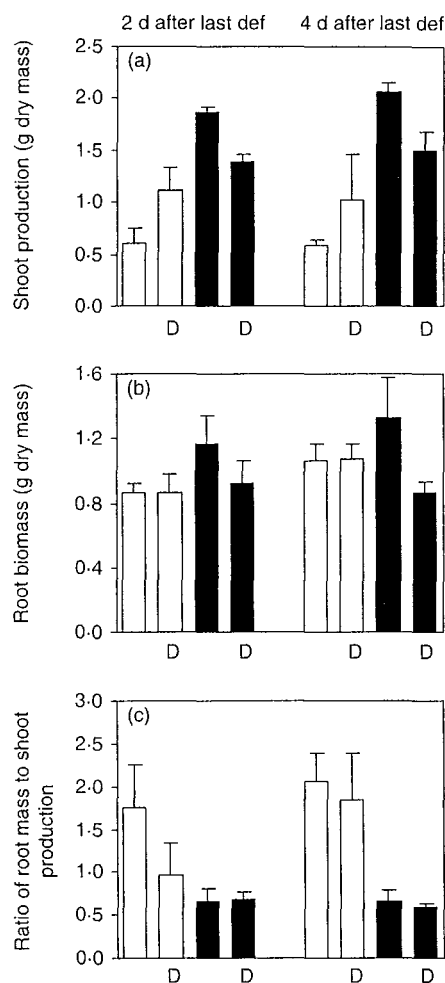


Fig. 1. Plant growth (mean $\pm$ 1 SE, $n = 3$) in field-grown *Lolium perenne* swards in response to defoliation (def) and nitrogen addition 2 and 4 days after the last defoliation: (a) shoot production (defoliated and harvested shoot mass); (b) root biomass; (c) ratio of root biomass to shoot production. Black and white bars represent swards with and without added N, respectively; D, defoliated swards.

but had no effect in defoliated plots ($F = 2.07$, $P = 0.223$). Defoliation, in turn, decreased shoot production by 27% in plots where N was added ($F = 41.8$, $P = 0.023$), but had no statistically significant effect in plots where N was not added ($F = 4.17$, $P = 0.178$) (Fig. 1a). In contrast to shoot production, N addition and defoliation did not affect harvested root biomass (Table 1, Fig. 1b). The ratio of root mass to shoot production was reduced by N addition on average by 61%, but was not affected by defoliation (Table 1; Fig. 1c).

PLANT CARBON AND NITROGEN CONCENTRATIONS

Defoliation reduced leaf and stem C concentrations on average by 12 and 7%, respectively, but did not affect root C concentration, whereas N addition increased root and stem C concentrations on average by 7 and 9%,

respectively, but did not affect leaf C concentration (Table 1; Fig. 2a–c). Nitrogen addition had a clear positive effect on plant N concentrations, with 111, 101 and 38% higher leaf, stem and root N concentrations, respectively, found in plots with N addition (Table 1; Fig. 2d–f). Defoliation reduced leaf N concentration by 27% at the first harvest (2 days after defoliation) ($F = 13.2$, $P = 0.022$), but had no effect at the second harvest (4 days after defoliation) ($F = 0.35$, $P = 0.585$), increased stem N concentration at both harvests on average by 14%, and did not affect root N concentration (Table 1; Fig. 2d–f). The C : N ratios of different plant parts were significantly decreased by N addition, whereas defoliation increased the ratio in roots, decreased the ratio in stems, and had no statistically significant effect on the ratio in leaves (Table 1; Fig. 2g–i).

Defoliation increased root carbohydrate concentration by 26% at the first harvest ($F = 61.5$, $P = 0.001$) and by 18% at the second harvest ($F = 13.8$, $P = 0.021$), while N addition had no effect (Fig. 3).

SOIL CARBON AND NITROGEN CONCENTRATIONS

Soil soluble C concentration (Fig. 4a) and total soil C and N concentrations (data not shown) were not affected by defoliation or N addition (Table 2).

SOIL MICROBES

When we analysed in detail the three-way interaction between the effects of N addition, defoliation and harvest time on microbial C content (Fig. 4b; Table 2), a significant interaction between defoliation and N addition was found at the first harvest ($F = 11.2$, $P = 0.044$), but none of the treatments had statistically significant main effects. Microbial N content was not affected by defoliation or N addition (Table 2).

In the case of short-term utilization of ^{14}C -labelled glucose by soil microbes, the proportion of added ^{14}C respired by microbes was decreased by N addition at first harvest ($F = 15.06$, $P = 0.018$), but no other effects of defoliation or N addition on the amount of respired ^{14}C , stored ^{14}C or their ratio were observed (Fig. 4c–e; Table 2). The number of culturable cells of bacteria in rhizosphere soil (Fig. 4f) and the diversity of C sources utilized by the rhizosphere microbial community (data not shown) were not affected by defoliation or N addition (Table 2).

NEMATODES

Defoliation decreased the abundance of fungivorous and herbivorous nematodes on average by 70 and 47%, respectively, but did not have a statistically significant effect on the abundance of bacterivorous, omnivorous and predatory nematodes (Table 3; Fig. 5). None of the nematode trophic groups was affected by N addition (Table 3; Fig. 5).

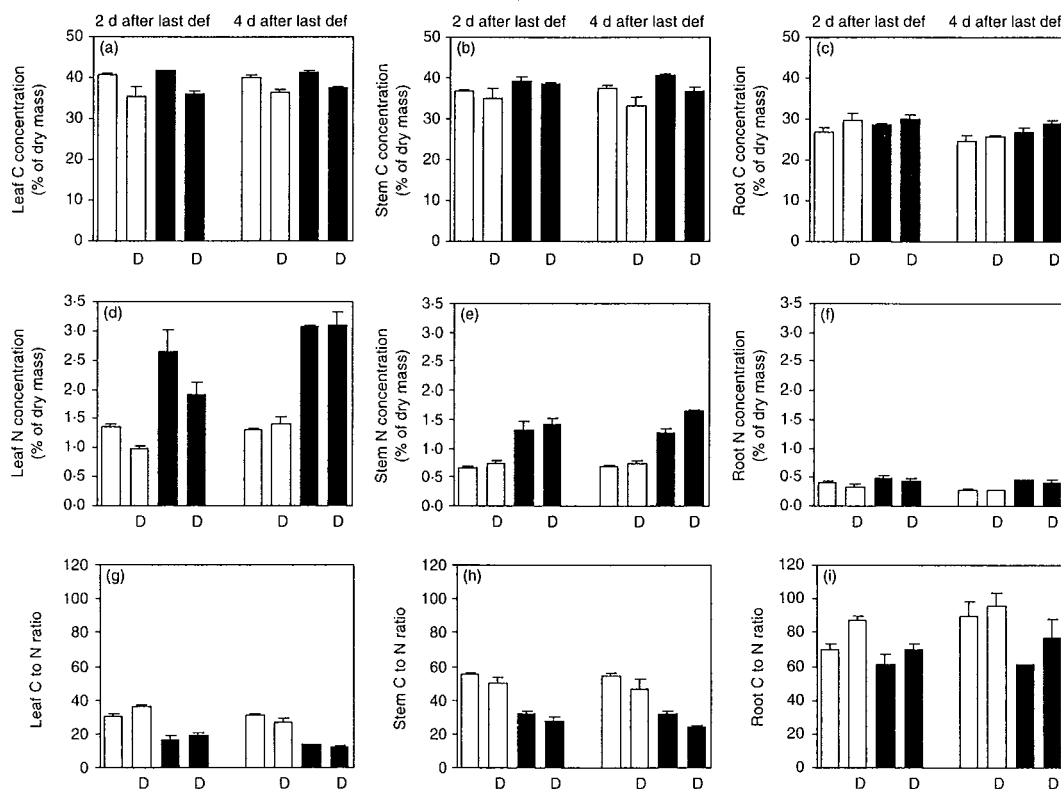


Fig. 2. Plant carbon and nitrogen concentrations (mean $\pm$ 1 SE, $n = 3$) in field-grown *Lolium perenne* swards in response to defoliation (def) and N addition 2 and 4 days after the last defoliation: (a–c) leaf, stem and root C concentration; (d–f) leaf, stem and root N concentration; (g–i) leaf, stem and root C : N ratio. Treatment symbols as for Fig. 1.

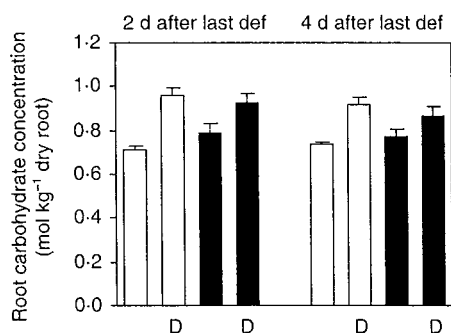


Fig. 3. Root soluble carbon concentration (mean $\pm$ 1 SE, $n = 3$) in field-grown *Lolium perenne* swards in response to defoliation (def) and nitrogen addition 2 and 4 days after the last defoliation. Treatment symbols as for Fig. 1.

Discussion

Our results show that defoliation altered plant C allocation and root soluble C concentrations in *L. perenne* swards. However, against our hypothesis, these changes did not influence C availability, soil microbial growth or the abundance of bacteria-feeding nematodes in the plant rhizosphere. Instead, we found negative effects of defoliation on root-feeding and fungus-feeding nematodes. This suggests that the effects of defoliation were propagated not through the effects of root C release

on bacteria and bacterial grazers, but through effects of root quality on root-feeders and possibly through effects of mycorrhizal fungi on fungus-feeders.

Although defoliation had no effect on biomass allocation in the *L. perenne* swards (the ratio of root biomass to shoot production did not differ between defoliated and non-defoliated plants), C allocation was altered. Defoliation reduced leaf and stem C concentration as well as stem C : N ratio, but increased root C : N ratio and root carbohydrate concentration, which suggests that defoliated plants allocated relatively more C to roots and had more water-soluble C in their roots than non-defoliated plants. This does not support the common view that plants tolerate defoliation by mobilizing C into leaf meristems at the expense of roots after defoliation (Caldwell *et al.* 1981; Miller & Rose 1992; Strauss & Agrawal 1999), but is consistent with the hypothesis that plants increase C allocation to roots after defoliation to create C stores less accessible for above-ground grazers (Dyer *et al.* 1991; Holland *et al.* 1996). It has been suggested that increased allocation of photosynthate to roots after defoliation (Holland *et al.* 1996) and amplified root concentrations of soluble C in defoliated plants (Paterson & Sim 1999) can lead to increased C exudation from roots. Our results do not support these hypotheses: although concentrations of water-soluble C in *L. perenne* roots were increased by defoliation, and relatively more C appeared to be

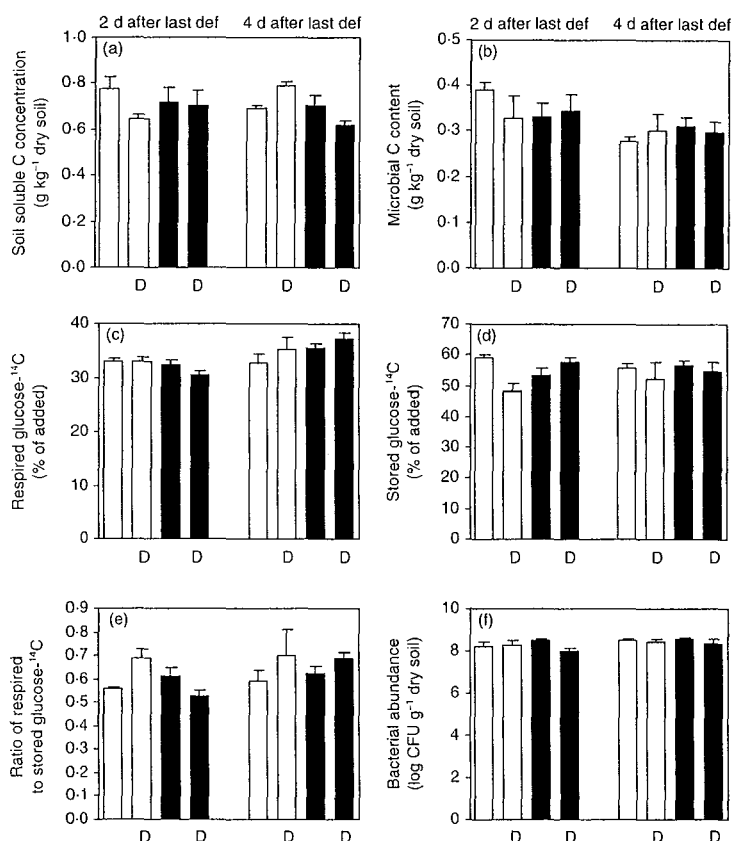


Fig. 4. Soluble carbon concentration and microbial attributes of rhizosphere soil (mean $\pm$ 1 SE, $n = 3$) in field-grown *Lolium perenne* swards in response to defoliation (def) and nitrogen addition 2 and 4 days after the last defoliation: (a) soil soluble C concentration; (b) microbial C content; (c,d) respired and stored proportion of added glucose- ^{14}C ; (e) ratio of respired to stored glucose- ^{14}C ; (f) bacterial abundance, measured as colony-forming units on agar plates. Treatment symbols as for Fig. 1.

allocated below ground in defoliated than in non-defoliated plants, none of the soil, microbial or animal attributes indicated increased C availability in the rhizosphere soil. For instance, defoliation did not affect soluble C concentration or microbial utilization of ^{14}C -labelled glucose in the rhizosphere soil, which suggests that the availability of labile C compounds in the rhizosphere was not affected by defoliation. Similarly, Murray *et al.* (2004) recently reported no effect of defoliation on overall root C exudation in field-grown *Agrostis capillaris* plants. In other studies with graminoids, root C release has been found to increase (Holland *et al.* 1996; Paterson & Sim 1999, 2000; Paterson *et al.* 2003) or decrease (Mikola & Kytöviita 2002; Nguyen & Henry 2002; Dilkes *et al.* 2004; Macdonald *et al.* 2004) after defoliation, suggesting that the influence of defoliation on root C release may be difficult to predict. However, studies differ in terms of the plant species used, type of defoliation and fraction of assimilated C measured in the rhizosphere (Mikola & Kytöviita 2002), and more trials may be needed before predictable patterns emerge. What is noticeable in our study is that we did not find a link between the amount of C available in roots and the amount of C released from roots, which has been recorded in some earlier studies (Mikola & Kytöviita 2002; Dilkes *et al.* 2004; Macdonald *et al.* 2004). A similar discrepancy was reported by Paterson *et al.* (2003), who found that defoliation decreased soluble C concentrations in *Festuca rubra* roots but increased root C exudation.

In accordance with the measurements of rhizosphere C availability, we found no indication of effects of defoliation on soil microbes. Microbial activity –

Table 2. *F* statistics from mixed-model ANOVA for the effects of defoliation (no trimming, or trimming twice during second growing season); nitrogen addition (no added N, or N added after trimmings); and harvest time (2 or 4 days after last trimming) on soil and soil microbial attributes in the rhizosphere of field-grown *Lolium perenne* swards

Dependent variable	Source of variation						
	Defoliation	N addition	Harvest time	D $\times$ N	D $\times$ H	N $\times$ H	D $\times$ N $\times$ H
Soil C and N content							
Soil C concentration	0.65	0.10	12.5*	7.01	0.58	1.91	0.02
Soil soluble C concentration	0.50	0.92	0.01	0.02	1.08	2.42	3.98
Soil N concentration	<0.01	2.38	6.02	1.92	1.48	0.01	0.86
Microbial C and N content							
Microbial C content	0.14	0.01	7.80*	0.14	1.76	0.62	14.3*
Microbial N content	2.64	0.02	18.9**	4.51	1.02	11.9*	1.87
Microbial utilization of added ^{14}C glucose							
Proportion of respired ^{14}C	0.26	0.76	23.9**	0.35	2.51	1.06*	0.13
Proportion of stored ^{14}C	3.33	1.16	0.02	6.00	<0.01	<0.01	1.65
Ratio of respired to stored ^{14}C	2.01	1.36	4.93	2.87	0.46	1.45	0.76
Bacterial abundance							
Number of colony-forming units	2.14	<0.01	7.65	2.31	0.06	<0.01	0.64
Microbial community catabolic profile							
Diversity of utilized C compounds	0.01	0.22	11.4*	0.62	0.04	0.27	1.62

Degrees of freedom: 1,4 for each source of variation.

Treatment effect significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Table 3. *F* statistics from nested ANOVA for the effects of defoliation (no trimming, or trimming twice during second growing season) and nitrogen addition (no added N, or N added after trimmings) on abundance of nematode trophic groups in rhizosphere soil of field-grown *Lolium perenne* swards 6 days after last trimming

Dependent variable	Source of variation		
	Defoliation	N addition	D × N
Bacterivore abundance	0.02	2.74	1.45
Fungivore abundance	11.1*	4.01	0.65
Herbivore abundance	10.5*	0.08	3.22
Omnivore abundance	6.28	0.09	2.12
Predator abundance	1.00	1.18	5.67

Degrees of freedom: 1,4 for each source of variation.

*, **, ***, Treatment effect significant at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

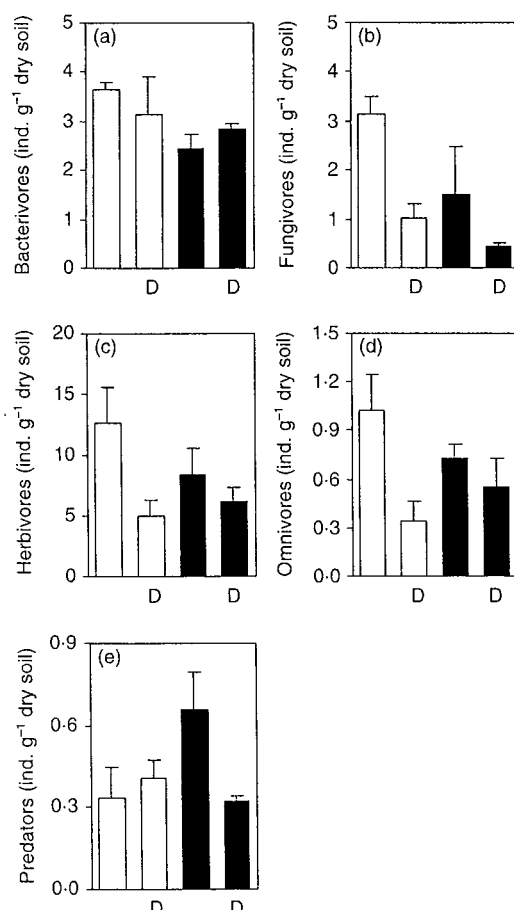


Fig. 5. Nematode abundance in rhizosphere soil (mean $\pm$ 1 SE, $n = 3$) in field-grown *Lolium perenne* swards in response to defoliation and nitrogen addition 6 days after the last defoliation: (a) bacterivores; (b) fungivores; (c) herbivores; (d) omnivores; (e) predators. Treatment symbols as for Fig. 1.

– was not affected by defoliation. Moreover, the unaffected abundance of bacteria-feeding nematodes in defoliated *L. perenne* swards further suggests that bacterial growth was not affected by defoliation. Microbe-feeding nematodes are good indicators of microbial growth in soil (Sohlenius 1990; Christensen *et al.* 1992; Mikola & Setälä 1998), and their response to defoliation has been shown to be most clear a few weeks after defoliation (Mikola *et al.* 2005b). In the present study, we sampled nematodes 6 days after the May trimming and 25 days after the April trimming, suggesting that we should have observed the response of bacteria-feeding nematodes had it occurred. Like the effects of defoliation on root C release, effects on soil microbes (Garcia & Rice 1994; Guitian & Bardgett 2000; Hamilton & Frank 2001) and microbe-feeding animals (Stanton 1983; Todd *et al.* 1992; Todd 1996; Mikola *et al.* 2001) differ from positive to negative in earlier studies. Our finding that bacterial growth and abundance of bacterial grazers do not respond to defoliation when such a response is not observed in root C release suggests that part of this discrepancy may be accounted for by differences in root C release after defoliation.

In grasses, defoliation typically increases N concentration in shoot and root biomass (Wilsey *et al.* 1997; Fahnestock & Detling 1999; Green & Detling 2000; Hokka *et al.* 2004), which has been suggested to result from improved N availability in soil after defoliation (Holland & Detling 1990). Supporting this idea, Hamilton & Frank (2001) recently showed how increased C release from *Poa pratensis* roots after defoliation stimulated soil microbial growth, increased N availability in the plant rhizosphere, and finally led to elevated shoot N concentration in defoliated plants. In our study, defoliation reduced leaf N concentration 2 days after defoliation by 27%, did not affect root N concentration, and increased stem N concentration by 14%. In comparison with 129 and 56% increases in shoot and root N concentrations, respectively, recorded by Hokka *et al.* (2004) in defoliated *Phleum pratense* plants, defoliation appeared to have little impact on plant N uptake in our study. This is in good agreement with our finding that defoliation did not stimulate root C release and the growth of rhizosphere organisms in our grass swards, and suggests that rhizosphere N availability was not enhanced by defoliation in our study.

In contrast to the response of bacteria-feeding nematodes to defoliation, we found that defoliation reduced the abundance of root- and fungus-feeding nematodes. However root biomass was not significantly reduced by defoliation, suggesting that root mass did not determine the abundance of root-feeding nematodes. Instead, the lower quality of roots (higher C : N ratio) appears to account for the decreased abundance of root-feeding nematodes found in the rhizosphere of defoliated plants, suggesting that changes in root quality after defoliation can substantially affect the

measured as the proportion of added ^{14}C -labelled glucose respired by microbes; microbial C content; abundance of bacteria in the rhizosphere soil; and diversity of C sources utilized by the microbial community

abundance of root-feeding animals. Defoliation typically enhances root quality in terms of increasing root N concentration and decreasing root C : N ratio (Seastedt 1985; Seastedt *et al.* 1988; Hokka *et al.* 2004), but the effects may vary from positive to negative depending on the growth phase of defoliated plants (Ilmarinen *et al.* 2005), and our results show, in contrast to earlier observations, that defoliation can also increase the C : N ratio of grass roots. That fungus-feeding nematodes had a similar negative response to defoliation appears unexpected considering we did not find any indication of reduced microbial activity after defoliation. However, we did not separately measure the response of fungi to defoliation, and in bacteria-dominated agricultural soil their response may have gone unnoticed. Also, we did not measure whether defoliation affected the abundance of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi in soil. In earlier studies, negative effects of defoliation on the root colonization rate of AM fungi are most common (reviewed by Gehring & Whitham 1994), although neutral (Ilmarinen *et al.* 2005; Mikola *et al.* 2005a) and positive (Hokka *et al.* 2004) effects in grass roots have also been found. Finally, the classification of root-feeding and fungus-feeding nematodes is problematic, and it is possible that some genera classified as fungus-feeders in this study also feed on roots, and *vice versa* (Yeates *et al.* 1993; Okada *et al.* 2005). On the other hand, earlier studies in which the same classification of nematode genera (Yeates *et al.* 1993) is applied have reported different responses of root-feeding and fungus-feeding nematodes to plant ageing and defoliation (Mikola *et al.* 2001; Ilmarinen *et al.* 2005; Mikola *et al.* 2005b). Nevertheless, our results show clearly that, even though no effects of defoliation on bacteria and their grazers are found, effects on root- and fungus-feeders may still appear. Whether these effects also have significant consequences for further plant growth and nutrient uptake remains to be clarified.

We anticipated that soil N availability affects the response of plants and soil organisms to defoliation, but found evidence of this only in the case of plant shoot production. Defoliation reduced shoot production in plots where N was added, but did not affect plant growth in non-fertilized plots. Defoliation is known to reduce root nutrient uptake (Jarvis & Macduff 1989; Donaghy & Fulkerson 1998) and, as N was added immediately after trimming, the reduced growth of defoliated plants in fertilized plots may result from their reduced capability to utilize the additional N. This is supported by our finding that N addition did not significantly increase shoot production when plants were defoliated, but had a substantial positive effect on the shoot production of non-defoliated plants. That N addition had little direct influence on soil microbes was expected, as microbial growth in soils is usually constrained by C rather than N availability (Schnürer *et al.* 1985; Zak *et al.* 1994). However, nor did N addition appear to have much indirect influence on soil

microbes through altered C availability, despite having positive effects on plant C assimilation (manifested by increased shoot production in non-defoliated plots) and root C concentration. The response of microbes to N addition neither supports results from studies with woody plants which have shown that, due to increased fine root turnover, C input to soil increases when plants are fertilized (King *et al.* 2002).

Acknowledgements

This study is a part of the projects 'Conservation of soil organism diversity under global change' funded by the EU (EU contract EVK2-CT-2002-20112) and 'Linking below-ground food webs, plants and above-ground herbivores in grassland ecosystems' funded by the Academy of Finland. We thank Claude Bazard for assisting with field work, Patrice Marchal for performing C and N analyses, Kari Nissinen for helping with statistical issues and Iuliana Popovici for identifying the nematodes.

References

- Briske, D.D. & Richards, J.H. (1995) Plant responses to defoliation: a physiological, morphological and demographic evaluation. *Wildland Plants: Physiological Ecology and Developmental Morphology* (eds D.J. Bedunah & R.E. Sosebee), pp. 635–710. Society for Range Management, Denver, CO, USA.
- Caldwell, M.M., Richards, J.H., Johnson, D.A., Nowak, R.S. & Dzures, R.S. (1981) Coping with herbivory: photosynthetic capacity and resource allocation in two semi-arid *Agropyron* bunchgrasses. *Oecologia* **50**, 14–24.
- Christensen, H., Griffiths, B. & Christensen, S. (1992) Bacterial incorporation of tritiated thymidine and populations of bacteriophagous fauna in the rhizosphere of wheat. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 703–709.
- Davidson, J.L. & Milthorpe, F.L. (1966) Leaf growth in *Dactylis glomerata* following defoliation. *Annals of Botany* **30**, 173–184.
- De Visser, R., Vianden, H. & Schnyder, H. (1997) Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by ¹³C and ¹⁵N steady-state labeling. *Plant, Cell & Environment* **20**, 37–46.
- Dilkes, N.B., Jones, D.L. & Farrar, J. (2004) Temporal dynamics of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiology* **134**, 706–715.
- Donaghy, D.J. & Fulkerson, W.J. (1998) Priority for allocation of water-soluble carbohydrate reserves during regrowth of *Lolium perenne*. *Grass and Forage Science* **53**, 211–218.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956) Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350–356.
- Dyer, M.I., Acra, M.A., Wang, G.M. *et al.* (1991) Source-sink carbon relations in two *Panicum coloratum* ecotypes in response to herbivory. *Ecology* **72**, 1472–1483.
- Fahnestock, J.T. & Detling, J.K. (1999) Plant responses to defoliation and resource supplementation in the Pryor Mountains. *Journal of Range Management* **52**, 263–270.
- Garcia, F.O. & Rice, C.W. (1994) Microbial biomass dynamics in tallgrass prairie. *Soil Science Society of America Journal* **58**, 816–823.

- Gehring, C.A. & Whitham, T.G. (1994) Interactions between aboveground herbivores and mycorrhizal mutualists of plants. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 251–255.
- Grayston, S.J., Vaughan, D. & Jones, D.A. (1996) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* **5**, 29–56.
- Green, R.A. & Detling, J.K. (2000) Defoliation-induced enhancement of total aboveground nitrogen yield of grasses. *Oikos* **91**, 280–284.
- Guitian, R. & Bardgett, R.D. (2000) Plant and soil microbial responses to defoliation in temperate semi-natural grassland. *Plant and Soil* **220**, 271–277.
- Hale, M.G., Foy, C.L. & Shay, F.J. (1971) Factors affecting root exudation. *Advances in Agronomy* **23**, 89–109.
- Hamilton, E.W. & Frank, D.A. (2001) Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* **82**, 2397–2402.
- Haynes, R.J. & Francis, G.S. (1993) Changes in microbial biomass-C, soil carbohydrate-composition and aggregate stability induced by growth of selected crop and forage species under field conditions. *Journal of Soil Science* **44**, 665–675.
- Hokka, V., Mikola, J., Vestberg, M. & Setälä, H. (2004) Interactive effects of defoliation and an AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume–grass communities. *Oikos* **106**, 73–84.
- Holland, E.A. & Detling, J.K. (1990) Plant response to herbivory and belowground nitrogen cycling. *Ecology* **71**, 1040–1049.
- Holland, J.N., Cheng, W. & Crossley, D.A.J. (1996) Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C fluxes using carbon-14. *Oecologia* **107**, 87–94.
- Ilmarinen, K., Mikola, J., Nieminen, M. & Vestberg, M. (2005) Does plant growth phase determine the response of plants and soil organisms to defoliation? *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 433–443.
- Jarvis, S.C. & Macduff, J.H. (1989) Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. I. Recovery of uptake and growth and their interactions. *Journal of Experimental Botany* **40**, 965–976.
- King, J.S., Albaugh, T.J., Allen, H.L., Buford, M., Strain, B.R. & Dougherty, P. (2002) Below-ground carbon input to soil is controlled by nutrient availability and fine root dynamics in loblolly pine. *New Phytologist* **154**, 389–398.
- Macdonald, L.M., Paterson, E., Dawson, L.A. & McDonald, A.J.S. (2004) Short-term effects of defoliation on the soil microbial community associated with two contrasting *Lolium perenne* cultivars. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 489–498.
- Macduff, J.H., Jarvis, S.C. & Mosquera, A. (1989) Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in flowing solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. II. Assimilation of NO_3^- and short-term effects on NO_3^- uptake. *Journal of Experimental Botany* **40**, 977–984.
- McNaughton, S.J. (1983) Serengeti grassland ecology: the role of composite environmental factors and contingency in community organization. *Ecological Monographs* **53**, 291–320.
- McNaughton, S.J., Banyikwa, F.F. & McNaughton, M.M. (1998) Root biomass and productivity in a grazing ecosystem: the Serengeti. *Ecology* **79**, 587–592.
- Merrill, E.H., Stanton, N.L. & Hak, J.C. (1994) Responses of bluebunch wheatgrass, *Idaho fescue*, and nematodes to ungulate grazing in Yellowstone National Park. *Oikos* **69**, 231–240.
- Mikola, J. & Kytöviita, M.M. (2002) Defoliation and the availability of currently assimilated carbon in the *Phleum pratense* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **34**, 1869–1874.
- Mikola, J. & Setälä, H. (1998) Productivity and trophic-level biomasses in a microbial-based soil food web. *Oikos* **82**, 158–168.
- Mikola, J., Yeates, G.W., Barker, G.M., Wardle, D.A. & Bonner, K.I. (2001) Effects of defoliation intensity on soil food-web properties in an experimental grassland community. *Oikos* **92**, 333–343.
- Mikola, J., Ilmarinen, K., Nieminen, M. & Vestberg, M. (2005a) Long-term soil feedback on plant N allocation in defoliated grassland miniecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 899–904.
- Mikola, J., Nieminen, M., Ilmarinen, K. & Vestberg, M. (2005b) Belowground responses by AM fungi and animal trophic groups to repeated defoliation in an experimental grassland community. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 1630–1639.
- Miller, R.F. & Rose, J.A. (1992) Growth and carbon allocation of *Agropyron desertorum* following autumn defoliation. *Oecologia* **89**, 482–486.
- Morvan-Bertrand, A., Boucaud, J. & Prud'homme, M.P. (1999) Influence of initial levels of carbohydrates, fructans, nitrogen, and soluble proteins on regrowth of *Lolium perenne* L. cv. Bravo following defoliation. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1817–1826.
- Murray, P.J., Ostle, N., Kenny, C. & Grant, H. (2004) Effect of defoliation on patterns of carbon exudation from *Agrostis capillaris*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **167**, 487–493.
- Nguyen, C. & Guckert, A. (2001) Short-term utilisation of ^{14}C -[U]glucose by soil microorganisms in relation to carbon availability. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 53–60.
- Nguyen, C. & Henry, F. (2002) A carbon-14 glucose assay to compare microbial activity between rhizosphere samples. *Biology and Fertility of Soils* **35**, 270–276.
- Okada, H., Harada, H. & Kadota, I. (2005) Fungal-feeding habits of six nematode isolates in the genus *Filenchus*. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 1113–1120.
- Painter, E.L. & Detling, J.K. (1981) Effects of defoliation on net photosynthesis and regrowth of western wheat grass. *Journal of Range Management* **34**, 68–71.
- Paterson, E. & Sim, A. (1999) Rhizodeposition and C-partitioning of *Lolium perenne* in axenic culture affected by nitrogen supply and defoliation. *Plant and Soil* **216**, 155–164.
- Paterson, E. & Sim, A. (2000) Effect of nitrogen supply and defoliation on loss of organic compounds from roots of *Festuca rubra*. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1449–1457.
- Paterson, E., Thornton, B., Sim, A. & Pratt, S. (2003) Effects of defoliation and atmospheric CO_2 depletion on nitrate acquisition, and exudation of organic compounds by roots of *Festuca rubra*. *Plant and Soil* **250**, 293–305.
- Preston-Mafham, J., Boddy, J., Randerson, L. & Peter, F. (2002) Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiology Ecology* **42**, 1–14.
- Richards, J.H. (1993) Physiology of plants recovering from defoliation. *Proceedings of the XVII International Grassland Congress, February 1993, New Zealand*, pp. 85–94. New Zealand Grassland Association, Tropical Grassland Society of Australia, New Zealand Society of Animal Production, Australian Society of Animal Production, New Zealand Institute of Agricultural Science.
- Richards, J.H. & Caldwell, M.M. (1985) Soluble carbohydrates, concurrent photosynthesis and efficiency in regrowth following defoliation: a field study with *Agropyron* species. *Journal of Applied Ecology* **22**, 907–920.
- Schnürer, J., Clarholm, M. & Rosswall, T. (1985) Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different

- organic matter content. *Soil Biology and Biochemistry* **17**, 611–618.
- Seastedt, T.R. (1985) Maximization of primary and secondary productivity by grazers. *American Naturalist* **126**, 559–564.
- Seastedt, T.R., Ramundo, R.A. & Hayes, D.C. (1988) Maximization of densities of soil animals by foliage herbivory: empirical evidence, graphical and conceptual models. *Oikos* **51**, 243–248.
- Sohlenius, B. (1979) A carbon budget for nematodes, rotifers and tardigrades in a Swedish coniferous forest soil. *Holarctic Ecology* **2**, 30–40.
- Sohlenius, B. (1990) Influence of cropping system and nitrogen input on soil fauna and microorganisms in a Swedish arable soil. *Biology and Fertility of Soils* **9**, 168–173.
- Sparling, G., Vojvodiac-Vukovic, M. & Schipper, L.A. (1998) Hot-water-soluble C as a simple measure of labile soil organic matter: the relationship with microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 1469–1472.
- SPSS (2001) *spss for Windows, release 10.1.3*. SPSS, Chicago, IL, USA.
- Stanton, N.L. (1983) The effect of clipping and phytophagous nematodes on net primary production of blue grama, *Bouteloua gracilis*. *Oikos* **40**, 249–257.
- Strauss, S.Y. & Agrawal, A.A. (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 179–185.
- Todd, T.C. (1996) Effects of management practices on nematode community structure in tallgrass prairie. *Applied Soil Ecology* **3**, 235–246.
- Todd, T.C., James, S.W. & Seastedt, T.R. (1992) Soil invertebrate and plant responses to mowing and carbofuran application in a North American tallgrass prairie. *Plant and Soil* **144**, 117–124.
- 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.
- Vance, E.D., Brookes, P.C. & Jenkinson, D.S. (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **19**, 703–708.
- Welker, J.M., Rykiel, E.J., Briske, D.D. & Goeschl, J.D. (1985) Carbon import among vegetative tillers within two bunchgrasses: assessment with carbon-11 labelling. *Oecologia* **67**, 209–212.
- Wilsey, B.J., Coleman, J.S. & McNaughton, S.J. (1997) Effects of elevated CO₂ and defoliation on grasses: a comparative ecosystem approach. *Ecological Applications* **7**, 844–853.
- Yeates, G.W., Bongers, T., de Goede, R.G.M., Freckman, D.W. & Georgieva, S.S. (1993) Feeding habits in soil nematode families and genera – an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* **25**, 315–331.
- Zak, D.R., Tilman, D., Parmenter, R.R. et al. (1994) Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology* **75**, 2333–2347.

Received 23 February 2005; revised 14 June 2005; accepted 15 June 2005

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ooo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Jean-Bernard CLIQUET, Maître de Conférences, Université de Caen, Caen

Monsieur Jean-François SOUSSANA, Directeur de Recherche, INRA, Clermont Ferrand

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur BAZOT Stéphane

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**« Contribution à l'étude de l'allocation des photo-assimilats récents dans la plante et la
rhizosphère chez une graminée pérenne (*Lolium perenne* L.)**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

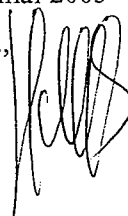
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 20 mai 2005

Le Président de l'I.N.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



RÉSUMÉ

L'objectif de notre travail a été étudié le transfert de C dans la plante et vers la rhizosphère de *Lolium perenne* afin d'explicitier le couplage entre le fonctionnement de la plante et la rhizodéposition.

Nous avons d'abord déterminé la contribution du carbone récemment assimilé par la plante à la rhizodéposition. Nous avons ainsi réalisé un double marquage long des parties aériennes des plantes ($^{14}\text{CO}_2$ et $^{13}\text{CO}_2$) afin d'estimer la répartition dans la plante et les compartiments rhizosphériques du C récent et le C plus anciennement assimilé. Contrairement à ce qui est admis généralement, le C ancien, probablement issu de la remobilisation de composés de réserve, contribue significativement à la rhizodéposition.

Nous avons ensuite évalué sur des dispositifs expérimentaux de terrain l'influence de contraintes subies par les parties aériennes de la plante sur les flux de C récent vers la rhizosphère (augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique et défoliation). La disponibilité en azote dans le sol est un facteur déterminant de la réponse des plantes à l'élévation des concentrations en CO_2 ou à la défoliation. A l'automne, une diminution de la rhizodéposition de C est observée pour les plantes soumises au doublement de CO_2 . Les composés organiques libérés par les racines sont minéralisés plus rapidement sous CO_2 élevé que sous CO_2 ambiant. La défoliation n'induit pas de variations notables de la disponibilité en C dans la rhizosphère, suggérant aucune influence significative de ce facteur sur la rhizodéposition.

Les interactions entre les facteurs de l'environnement et de gestion de la parcelle cultivée déterminent le fonctionnement de la plante et modulent les efflux de C à partir des racines, ce qui rend la rhizodéposition difficile à prédire et à modéliser. Il s'avère que les effets nets du doublement de CO_2 ou de la défoliation sur la rhizodéposition sont beaucoup moins marqués au champ qu'en conditions contrôlées. Au delà de la contribution quantitative de la rhizodéposition au bilan de C dans le sol, les interactions entre la nature biochimique des rhizodépôts et l'activité biologique des sols nécessitent d'être approfondies.

MOTS CLES :

Rhizosphère, rhizodéposition, *Lolium perenne*, carbone, doublement de CO_2 , défoliation, marquages longs, marquages courts, ^{14}C , ^{13}C , ^{15}N , indicateurs de rhizodéposition.

DISCIPLINE :

Sciences Agronomiques

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire Agronomie-Environnement, UMR INPL-INRA, ENSAIA, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France.

SUMMARY

The aim of our work was to study C fluxes in plant and to rhizosphere of *Lolium perenne* in order to explain the relation between plant functioning and rhizodeposition.

In a first part, we have determined the contribution of recently assimilated carbon to rhizodeposition. We have developed a double long-term labelling of plants shoots ($^{14}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$) in order to estimate partitioning of recent C and older assimilated C in plant and rhizosphere compartment. In contrast to previous results, older C, probably coming from remobilisation of reserve compounds, contribute significantly to rhizodeposition.

In a second part, we have evaluated, with field trials, the influence of constraint affecting plants shoots on recently assimilated C fluxes to rhizosphere (elevated CO_2 , defoliation). Soil nitrogen availability is the driving force of plants responses to elevated CO_2 or defoliation. In autumn, a decrease of C rhizodeposition is observed for plants submitted to elevated CO_2 . Organics compounds released by roots are mineralised faster under elevated CO_2 than under ambient CO_2 . Defoliation involved any change in C availability in the rhizosphere, suggesting any significant influence of this factor on rhizodeposition.

Interactions between environmental and management factors determined plant functioning and modulated C fluxes from roots which give rhizodeposition difficult to predict and to model. Net effect of elevated CO_2 or defoliation on rhizodeposition are less significant under field conditions than under controlled conditions. More than quantitative contribution of rhizodeposition to soil C pool, interactions between biochemical composition of rhizodeposits and soil biological activity need to be complete.

KEYS WORDS :

Rhizosphere, rhizodeposition, *Lolium perenne*, carbon, elevated CO_2 , defoliation, long term labelling and pulse labelling, ^{14}C , ^{13}C , ^{15}N , rhizodeposition indicators.