THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivrée par SupAgro Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Et de l'unité de recherche UMR Eco & Sols

Spécialité :
Écologie Fonctionnelle et Sciences Agronomiques

Présentée par Céline Pradier

Rôles fonctionnels des racines fines profondes en plantation d'eucalyptus au Brésil sur sols pauvres en nutriments Réponse à une situation hydrique limitante

Soutenue le 16 décembre 2016 devant le jury composé de

M. Jacques Ranger, DR, INRA, Nancy	Rapporteur
M. Mark Bakker, IR, INRA, Bordeaux	Rapporteur
M. Pierre Barré, CR, CNRS, Paris	Examinateur
Mme Catherine Keller, Pr, Université Aix-Marseille	Examinateur
M. Christophe Jourdan, Chercheur, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse
M. Philippe Hinsinger, DR, INRA, Montpellier	Co-directeur de thèse

RESUME

Face à une demande mondiale en bois en constante augmentation, les forêts plantées sont en rapide expansion, notamment au Brésil où les plantations d'eucalyptus pourraient couvrir 10 millions d'hectares d'ici 2020. Ces plantations hautement productives soulèvent des questions importantes au niveau (i) de leur **durabilité** dans un contexte de changement climatique et (i) de leur **impact sur l'environnement**, en particulier sur les cycles de l'eau, du carbone et des nutriments. La capacité des eucalyptus à développer un système racinaire très profond (jusqu'à 15 m, voire plus) pour atteindre la nappe phréatique, pourrait jouer un rôle clé dans l'adaptation à des disponibilités plus faibles en eau. Cependant, **le rôle de ces racines fines profondes dans la nutrition des plantes a jusque-là été extrêmement peu documenté.**

Dans ce contexte**, l'objectif général de cette thèse était d'évaluer l'influence de la profondeur et de la disponibilité de l'eau sur le fonctionnement des racines fines à travers l'étude de la rhizosphère.** Pour cela, une plantation clonale d'*Eucalyptus grandis* de 5 ans a été étudiée au Brésil sous deux régimes hydriques contrastés : un traitement + W, recevant une pluviométrie normale a été comparé à un traitement –W dans lequel 37% des pluviolessivats sont exclus. Des essais ont été réalisés dans le but d'appliquer une technologie de laboratoire innovante au champ : les optodes, permettant la cartographie du pH rhizosphérique notamment. Les rhizodepôts libérés par les racines fines d'eucalyptus interférant avec le signal du capteur optique, nous n'avons pas pu obtenir de résultats interprétables. Cependant, des tests réalisés sur le pin nous laissent confiants quant à la possibilité d'utiliser ce système, en suivant quelques recommandations. Des analyses destructives ont été réalisées sur du sol rhizosphérique et non-rhizosphérique échantillonnés le long de profils de 2 à 4 m.

Au niveau de la nutrition : une accumulation de potassium et de protons au sein de la rhizosphère a été observée, en particulier en dessous d'1 m (x3,0 et x1,1 pour K et H_3O^+ en + W, respectivement) et en condition de réduction des précipitations (x7,0 et x1,4 pour K et H_3O^+ en –W, respectivement). La répétition de ces mesures pendant la saison des pluies a confirmé l'enrichissement en protons et en K dans la rhizosphère, ce qui suggère que ces processus se produisent tout au long de l'année. Cependant, l'absence d'effet traitement durant la saison des pluies indique une bonne résilience potentielle du système. La quantité de K amenée à la surface des racines fines par flux de masse, estimée à 2 kg de K ha^{-1} an^{-1}, ne permet pas d'expliquer la quantité de potassium absorbée par les arbres, estimée à 17,5 kg de K ha^{-1} an^{-1}, ni l'accumulation observée dans la rhizosphère. Une explication plus probable est l'altération des minéraux potassiques induite par le fonctionnement racinaire, et notamment l'acidification. La mise en évidence d'associations ectomycorhiziennes jusqu'à 4 m de profondeur renforce l'hypothèse d'un rôle clé des racines fines profondes dans la nutrition des plantes. Une concentration élevée en Al^{3+} a aussi été mesurée au sein de la rhizosphère (jusqu'à 12 mg kg^{-1}). **Au niveau du stockage du carbone** : malgré la diminution exponentielle attendue de la concentration en C et N avec la profondeur (de 0,72 à 0,12 ‰ entre 0 et 4 m), nos résultats ont montré que plus de la moitié du stock de carbone contenu dans le sol non rhizosphérique était situé en dessous d'1 m. Une accumulation de C dans la rhizosphère a été mesurée, en particulier en profondeur (x1,4 en dessous d'1 m en + W) et en condition de réduction des pluies (x3,0 à 4 m en –W). Les mêmes tendances ont été observées pour N. L'effet rhizosphérique a été conservé pendant la saison des pluies, mais pas l'effet du traitement. **Ce travail a confirmé que les racines fines profondes jouent un rôle clé, pour la nutrition des plantes et le stockage de carbone, en contexte de changement climatique particulièrement.**

Mots clés : *Eucalyptus grandis*, plantation forestière, rhizosphère, réduction des précipitations, pH.

ABSTRACT

Due to the constant increase of the world demand for wood, the planted forests are in fast expansion notably in tropical countries such as Brazil where plantations of eucalypts, the most productive and spread out planted species, may reach 10 million ha by 2020. The expansion of these plantations on less fertile sites, combined with the context of climate change lead to important **issues about (i) the sustainability of these plantations under more frequent and intense drought events and (i) the impact on the environment of these highly productive plantations** with very short rotations (6 yr), particularly for the nutrient, water and carbon cycles. Eucalypt trees are able to develop very deep root system (down to 15 m or more) to reach the water table, and this may play a key role to cope with decreasing soil water availability. However, the role of these deep fine roots in plant nutrition is dramatically under-documented.

In this context, **the general objective of this study was to evaluate the influence of soil depth combined with water availability on fine root functioning through characterizing rhizosphere properties.** For this purpose, a 5-yr-old clonal *Eucalyptus grandis* plantation was studied in Brazil in two contrasted water regimes: the +W treatment, receiving normal rainfall was compared with the –W treatment where 37% of the throughfall were excluded in order to mimick the future climate forecasted in the region. Exploratory tests were carried out for the introduction of an innovative lab technology under field conditions: the optodes, which allow mapping rhizosphere pH. The rhizodeposits of eucalypt fine roots interfered with the optical sensor signal and prevented us to get interpretable results. However, some tests on pine trees let us confident of the possibility of using our system for field studies at depth, using some recommendations. Destructive analyses of rhizosphere and bulk soil samples collected along 2-m to 4-m deep soil profiles showed an effect of depth and rainfall reduction on rhizosphere pH, potassium concentration, rhizodeposition pattern and carbon storage capacity.

Concerning nutrition issues, we found an accumulation of potassium and protons within the rhizosphere, especially below 1-m depth (x3.0 and x1.1 for K and H_3O^+ in +W, respectively) and in reduced rainfall conditions (x7.0 and x1.4 for K and H_3O^+ in –W, respectively). Repeating these measurements during the rainy season confirmed the enrichment of protons and potassium within the rhizosphere, suggesting that these processes may occur all along the year but no treatment effect was observed anymore, pointing to a potential good resilience of the system. The amount of K brought to fine roots by mass flow was estimated to 2.0 kg K ha^{-1} yr^{-1} and could not explain the amount of K taken up by trees estimated to 17.5 kg K ha^{-1} yr^{-1} and the observed accumulation in the rhizosphere. A more likely explanation was the root-induced weathering of K-bearing minerals, partly related to rhizosphere acidification. Evidence of ectomycorrhizal association down to 4-m depth further supported the hypothesis of a key role of deep fine roots in plant nutrition. High exchangeable Al^{3+} concentration was found within the rhizosphere (up to 12.0 mg kg^{-1}). **Concerning the carbon storage issue**, despite an expected exponential decrease of C and N concentrations in the bulk soil with depth (0.72‰ to 0.12‰ from top soil to 4-m depth), our results showed that more than half of the soil C stock in the bulk soil occurred below the first meter. An accumulation of C was found in the rhizosphere, especially at depth (x1.4 below 1 m in +W) and in reduced rainfall conditions (x3.0 at 4-m depth in –W). The same trends were found for N. The rhizosphere effect was conserved during the rainy season but not the treatment effect. **This work confirmed that deep fine roots play a key role, especially in the context of climate change, for plant nutrition and carbon storage.**

Keywords: *Eucalyptus grandis*, forest plantation, rhizosphere, rainfall reduction, pH.

REMERCIEMENTS

Quand j'étais petite, mon père me disait que les arbres pouvaient nous donner de l'énergie si l'on posait nos mains dessus ; et j'étais alors convaincue que ce grand sapin blanc au milieu de la forêt de fayards m'aidait à chaque fois à arriver au sommet du petit mont de mon village. *Je te remercie papa, de m'avoir transmis ton amour des arbres et de la nature, sans quoi je ne serais pas devenue la même personne aujourd'hui.* Je remercie **mes parents** pour m'avoir permis cette enfance magique, sans barrières ni limites ! Je les remercie aussi pour leur soutien sans faille lorsque l'enfance était bien loin et avait laissé la place aux études… toujours prêt à traverser la France ou l'atlantique pour voler à mon secours ! *Et merci à toi ma super p'tite mère pour avoir toujours réussi à remplir à temps les missions impossibles que je t'ai données pendant toutes ces années !*

Je me suis lancée dans les études un peu comme on se lance dans le vide, sans vraiment savoir où j'allais atterrir …, et je me retrouvais finalement bien perdue : section construction et génie civil en école d'ingénieur à Poitiers. Je me demandais comment l'apprentissage de la composition des bétons pouvait agiter les neurones de mes camarades… jusqu'à un beau jour où la pédologie a fait son entrée ! Ce sont alors eux qui ne s'expliquaient pas ma passion subite pour ces cours de sciences du sol et ces feuillets octaédriques et tétraédriques de la « terre végétale » plutôt « gonflante » dans le monde des fondations ! On fait des tas de rencontres au cours des études, mais certaines marquent notre parcours plus que d'autres. Je remercie **Fabien Hubert**, enseignant chercheur à l'ENSIP, qui m'a fait découvrir la recherche et remis un peu de végétal dans mon horizon. Je remercie également **Bruno Lanson** qui a encadré mon stage de M2 et qui m'a aiguillée dans ma recherche de thèse, période pendant laquelle j'ai compris un truc puissant : toujours viser ce que l'on souhaite et non ce que l'on pense pouvoir obtenir ! Je postulais ainsi pour ma thèse, THE thèse, ça sentait les racines, l'innovation et l'aventure ! Je rencontrais alors Christophe Jourdan et me voilà embarquée pour un relevé de rhizotrons à Chamrousse, suivi d'une fameuse redescente seule avec une banche (une moitié d'arbre plus précisément) et pas sur le bon chemin ! Je remercie cette inconnue à l'arrivée qui a bien voulu nous prendre en stop, ma branche et moi ☺! Un premier défi était relevé ! Mais des défis il y allait en avoir d'autres… pour arriver à ce jour d'écriture des remerciements… ! Il me fallait tout d'abord obtenir la bourse de l'école doctorale, direction Montpellier donc où je faisais la connaissance de Philippe Hinsinger, THE KING of the rhizosphère dont j'avais épluché la littérature potassique en master argiles ! Et, quelques mois plus tard, je partais en direction do Brasiou avec 3 notions d'espagnol, 30 kilos de matos en poche, et HEUREUSEMENT Max, Cricri, et Gabrielle !

Ma thèse a été marquée par de nombreux aller-retour entre la France et le Brésil, des péripéties et des changements de cap, des aux revoirs et des retours chaleureux, *de nombreux flux et intéractions !* Je voudrais remercier de tout cœur tous ces *facilitateurs* qui ont rendu ma *thésardosphère* moins hostile et qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet !

En premier lieu, je tiens à remercier vivement mes encadrants **Christophe Jourdan et Philippe Hinsinger**, tout d'abord, pour m'avoir donné ma chance sur ce sujet, et pour avoir cru en moi, disons à peu près 10 000 fois plus que moi tout au long de ces 3 années.

Christophe, c'est une sacrée rencontre, rempli de joie de vivre et d'énergie, tu m'as aidé à voir la recherche coté OPTIMISME! Je ne savais rien ou presque sur les racines en commençant cette thèse

et j'ai eu le meilleur des professeurs. J'ai été à l'école de l'*in situ* et j'ai adoré ça ! *La formation avait commencé en avant-première à Chamrousse et elle s'est poursuivie au Brésil lors de tes deux missions. Tels des explorateurs des fonds marins, on avait l'impression de découvrir tout un monde, un monde qui me passionne aujourd'hui !* Mais évidemment, Christophe ce n'est pas seulement the root man, c'est aussi the social man! Et même si j'avoue que je ne me suis jamais refrotter aux recettes méthanoliques du japonnais, la découverte du bar du Carlito m'a permis de belles rencontres !

Avant ma thèse, pour moi « Hinsinger » c'était un nom cité sur à peu près tous les papiers que je lisais pour mon projet de master et je m'imaginais ce fameux « Hinsinger P.» avec un look à la Einstein et évidemment totalement inaccessible ! Et bien… j'ai été plutôt surprise quand je l'ai rencontré ! J'ai énormément appris sur le milieu rhizosphérique qui me passionnait déjà avant la thèse et encore plus aujourd'hui. Toujours armé de bons arguments pour me convaincre que ce que je fais n'est finalement pas aussi « nul » que je le pense, toujours attentif à finir par « une touche positive » même quand les nouvelles ne sont pas bonnes... la moindre petite discussion avec Philippe remet sur les rails et éclaircie soudain des problèmes existentiels et les situations les plus désespérées ! Quant à son efficacité pour les corrections et à sa réactivité aux mails, elle en est presque…effrayante !

Je remercie également ici mes rapporteurs **Mark Bakker** et **Jacques Ranger** pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit et pour leurs critiques constructives. Je remercie également **Pierre Barré** et **Catherine Keller** d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci également à **Chrsitina Schreiber**, **Stephan Blossfeld**, **Alain Mollier**, **Catherine Roumet**, **Claude Plassard**, **Agnès Robin, Louis Mareschal** et **Jean Paul Laclau** qui ont fait partie de mes comités de thèse.

Je poursuis ces remerciements en restant du côté français avant de m'envoler remercier le côté brasileiro.

Pour leur accueil et la gestion de la partie administrative, je remercie **Hélène Guillemain, Cassandre De Haese** et **Farid Meddaci** (dont le déménagement récent à l'aile A a bouleversé tout un couloir…) ainsi que **Jean-Luc Chotte** qui prend le temps de suivre chaque doctorant de l'unité. Un remerciement particulièrement fort à **Elodie Civiletti**, gestionnaire du personnel au CIRAD, à qui j'ai mené la vie dure pendant ces 3 ans par mon incompétence légendaire au pointage, je m'excuse sincèrement…

Pour son appui scientifique, ses conseils et ses quantités d'idées pour les expérimentations ainsi que pour son investissement dans les corrections de mon premier article, je remercie **Jean-Paul Laclau**. Et, dans la lignée des gens qui m'impressionnent, par leur efficacité et leur écoute, je remercie également **Claude Plassard**, à fond sur tous les fronts (et pistes de danse !), pour tous ses conseils, notamment sur les exsudats (un jour je les aurai !) et pour les bons moments en Australie ! Et en parlant d'Australie, j'en profite pour faire un saut à Canberra et remercier **John Kirkegaard** qui a été mon tuteur dans le projet des « student ambassadors » au congrès ISRR9 où je me suis retrouvée (bien malgré moi !) à faire un speech lors de la session de fermeture du congrès, un sacré coup de stress, but I did it !

Je remercie aussi vivement **Gabrielle Daudin** avec qui nous avons formé la team optode de l'UMR ainsi que **Daniela Achatz** qui nous a apporté ses précieux conseils ! Une aventure avec des hauts et des bas (au sens figuré comme au sens propre, à 17m de profondeur !) et beaucoup de soutien mutuel. Les optodes finiront par aller au champ et en profondeur, j'en suis convaincue ! *En attendant te voilà ingénieure, encore FELICITATIONS pour avoir combiné ton travail à ta formation au CNAM !*

Je remercie également, **Maxime Duthoit** et **Alain Rocheteau** pour l'aide technique apportée à la team optode, **Jean De Larivière** pour la formation aux mesures CHN, **Patricia Moulin** pour l'aide aux mesures de K_{tot}, évidemment **Didier Arnal,** qui a broyé du sol avec moi *à l'époque ou moi je broyais surtout du noir !* et qui a participé activement à notre petite nurserie d'eucalyptus dont deux rescapés sont précieusement entretenus par mes parents, **Philippe Benezech** pour résoudre tous mes problèmes informatiques et enfin**, Josianne Abadie** pour la future microresp. !

D'une façon plus générale, je remercie toutes les personnes de l'UMR Eco&Sols pour leur accueil et leur gentillesse. Je remercie tout particulièrement les Jeuns' de l'unité, des petites cuvées de 1992 aux crus les plus ancien (mais dont l'âge n'a que bonifié ☺) avec une mention spéciale aux (ex !) joueurs de cartes : champions du monde de la parlante contre champions du monde du mauvais perdant (vous reconnaitrez votre camp tout seul ;)), nos parties de « blottes », truco ou autre tarot ont animé le couloir et CDB ! Je remercie **Esther** qui m'a passé le virus du ukulele, **Damien**, toujours prêt à se couper un bras pour rendre service, **Maxime** (vous avez dit raleur ?) qui « sait » quand il « peut », **Patoche**, ma coloc d'algéco qui m'a fait découvrir la famille kardashian mais surtout la cuisine malgache, **Matthias** et **Amandine** qui ont connu ITATINGA CITY, **Thomas** et sa bonne musique en voiture, **Rémi C**, qui m'a fait découvrir Tiken Jah Fakoly et les Kookaburras, **Rémi V** (je suis passée chez toi ?? me rappelle pas..), **Anne**, **Jenny**, **Agnès, Ade**, les stagiaires de passage à l'unité, **Camille**, **Begum**, **Renaud**... mais aussi **Joannes**, **Kenji** et **Heijin** que j'ai squattés dans la dernière ligne droite de l'écriture… ceux qui partagent le petit café d'après manger… La bonne ambiance ecosolienne est enviée par beaucoup et est sans aucun doute un facteur de réussite, MERCI A VOUS !

Je m'envole maintenant en direction do Brasil pour la suite des remerciements…

Je remercie tout d'abord les membres de la station expérimentale d'Itatinga et notamment **Rildo Moreira, Elaine et Lorival** pour leur accueil, **Jean-Pierre Bouillet** pour son aide notamment pour le remboursement des frais, ainsi que **Eder Araujo da Silva** pour le travail impressionnant qu'il fournit avec les membres de son entreprise Floragro concernant les expérimentations de la station et notamment les fosses de 17m ! Agradeço também muito o Estevão a as meninas, *que tristeza sem vocês …* L'expérience de travail au sein de cette station me laisse aujourd'hui beaucoup plus forte et sans aucun doute moins naïve. "A internet pode ser ruim, a fofoca sempre fica 4G! "

Je remercie **Agnès Robin**, ma petite bouffée d'oxygène qui a débarqué au Brésil beaucoup trop tard à mon gout ☺. La team mycorhize était lancée, à fond entre Itatinga et Piracicaba où les pães de queijos aidaient à faire passer les heures et les doutes. *Parce que tu as cette générosité et humilité de t'être mise dans la peau des étudiants d'Itatinga, en expérimentant les joies des fosses et du laboratório, parce que tu as toute la diplomatie du monde, parce que tu es à l'écoute, tu es une chance immense pour cette station et les étudiants qui y travaillent ! Bien au-delà d'une collaboration mycorhizienne, tu as été un soutien essentiel pour moi pendant cette dernière année de thèse. Encore merci pour* ***TOUT****.*

Je remercie **Irae Amaral Guerrini** et **José Leonardo Moraes Gonçalves** pour m'avoir accueillie comme une étudiante de l'UNESP et de l'ESALQ et pour m'avoir donné accès au labo. Merci à **José Carlos Coelho** et aux techniciens du département des sols de l'UNESP pour leur aide concernant les analyses de sol. Je remercie ma stagiaire **Suzy Leal** et tous ces stagiaires de « tout le monde » qui fournissent un travail ENORME à la station. Pour leurs conseils lors de leurs passages, je remercie également **Yan Nouvellon**, **Gilles Chaix, Juan** et **Verónica**.

Je remercie **Bruno** et ses colocs' qui m'ont logée dans leur « republica » à Piracicaba quand la station devenait moyennement carrossable en béquilles. Je remercie également les étudiants qui m'ont initiée à la vie sur la station, à l'époque où j'étais encore interpellée par les douches électriques, les traversées de l'autoroute… tout ça tout ça … Je remercie particulièrement **Maela** pour m'avoir aidé avec le portugais, pour toutes les heures passées à la « cabana do solo », pour nos soirées vin popcorn finies à 20h30 avec notre petite **Courtney** made in United States ! Para a nossa amizade e tudo esse tempo junto no alojamento, eu agradeço particularmente a **Gleice**, **o Gaúcho, o Tiago**, a **Julia**, a **Karen** e a **Suzy**. Na cidade, eu agradeço o **Carlito**, *que tristeza que seu o bar foi trocado por uma igreja evangelista...* e todos esses corações alternativos de Itatinga que tem a mente aberta, e gostam de curtir um rock o um reggae na luz duma fogueira o na beira duma cachoeira, particularmente, o **Gabriel**, e o **Juninho** que toca violão mais que ninguém.

Eu agradeço o **Jocimar** que me ensinou bastante sobre a vida, a vida real. Com ele eu aprendi relativizar os meus problemas de doutoranda. Ele me fiz ver a sorte que eu tenho de estudar e de ter uma família que me apoia. Ele me ajudou muito, tão no trabalho como na vida. Ele aguentou meu stress e sempre conseguiu me acalmar e me fazer rir, cuidou de mim quando eu estava doente, me ensinou fazer uma fogueira, pescar com um bambo, falar que nem uma itatinguese,...ACREDITAR EM MIM. "Tem pessoas tão pobres que só tem dinheiro, tem pessoas tão incultas que só tem cultura acadêmica" (Augusto Cury).

Enfin, je remercie ceux qui étaient là avant la thèse, qui l'ont été pendant et qui le seront après : mon frère, mes grands-parents, tantes, oncles et cousins qui m'ont suivie de loin en s'efforçant de comprendre un peu ce que je fabriquais de mon éternelle vie d'étudiante et qui se sont même initiés pour certains à Skype (Bravo Mamie !). Je pense également à ces amis d'enfance … ceux que vous trainez toute votre vie ! A mes amis de collège, de lycée (le 14/07/18 s'approche !) et d'études, encore présents dans ma vie pour mon plus grand bonheur. Vous étiez à ma despedida, à mes retours ou sur skype ! Tout particulièrement, merci à **Fan**, **Nath**, **Souad**, **Didi**, **Spid** et **Paco** qui ont suivi mes péripéties de près pendant ces 3 années !

Cette thèse, plus qu'un projet d'étude a été pour moi, et de loin, ma plus grande expérience de vie ! Il parait qu'il faut sortir de sa zone de confort pour vivre pleinement, apprendre et s'épanouir, et bien je crois comprendre un peu mieux cette théorie aujourd'hui. Ces trois années n'ont pas été simples tous les jours mais elles m'ont permis, en plus d'apprendre sur le fonctionnement racinaire, de m'initier à une autre culture et de me confronter à des difficultés qui m'ont fait énormément grandir et apprendre sur moi-même. Et, même si j'avoue que j'ai parfois partagé l'avis de Gandhi lorsqu'il dit que « la vie est un mystère à vivre et non un problème à résoudre », et que dans ces moments-là, l'envie de tout plaquer pour élever des chèvres m'a légèrement effleurée, la CURIOSITE, la PERSEVERANCE et par-dessus tout le SOUTIEN des personnes qui m'ont entourée m'ont permis de mener à bien ce projet PASSIONNANT.

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar" (Cora Coralina).

AVANT- PROPOS

Cette thèse a été financée sur une durée de 3 ans par le CIRAD (centre de recherche agronomique pour le développement) et a été conduite pour moitié au sein des locaux de l'UMR Eco&Sols à Montpellier et pour moitié au sein de la station expérimentale de recherche en sciences forestières de l'ESALQ-USP à Itatinga au Brésil.

Ce document est rédigé sous forme de thèse sur publications. Une partie d'introduction générale suivie d'un chapitre portant sur les essais réalisés pendant cette tèse pour l'étude *in situ* du fonctionnement racinaire par la technique optode (chapitre 1) ont cependant été rédigés en français. Ils sont suivis par 3 chapitres de résultats, rédigés en anglais sous format d'articles scientifiques (Chapitres 2-4). Les chapitres s'ouvriront cependant sur une courte introduction en français. Enfin, la thèse se termine par une partie de discussion générale et perspectives, rédigé en français.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE *1*

1. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE **2**

2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ROLES FONCTIONNELS DES RACINES FINES **8**

Introduction 8

I. Les racines fines : fonction d'absorption de l'eau et des nutriments 8

II. Absorption et mobilisation des ressources facilement disponibles 13

A. Absorption de l'eau et flux de masse : transport des nutriments de la solution du sol 13

B. Absorption des nutriments et mobilisation du complexe d'échange par diffusion ionique 15

III. Secrétions et mobilisation des ressources non disponibles 18

A. Le rôle central du pH dans la libération des éléments non disponibles 18

B. La rhizodéposition : rôles directs et indirects dans l'acquisition des nutriments 22

IV. Les alliés des racines fines 28

A. Actions des mycorhizes 28

B. Actions des bactéries « PGPR » 31

Références 36

3. HYPOTHESES, DEMARCHE EXPERIMENTALE ET PRESENTATION DU SITE **43**

I. Hypothèses et démarche expérimentale 43

A. Hypothèses principales et objectif central 44

B. Démarche expérimentale 45

C. Présentations des résultats de la thèse 46

II. Présentation du site d'étude 47

A. Géologie et climat de la région 47

B. Caractéristiques géologique et pédologique du site d'étude 47

C. Dispositif expérimental 48

CHAPITRE 1 DEVELOPPEMENT METHODOLOGIQUE 50

INTRODUCTION DU CHAPITRE 51

1. COMMENT ETUDIER LE FONCTIONNEMENT DES RACINES FINES ? 52

La Rhizosphère : the place to be! 52

Deux approches pour l'étude de la rhizosphère 53

A. Approche 1 : Echantillonnage puis analyse destructive 53

B. Approche 2 : Méthodes non invasives - visualisation 2D 56

Les optodes : la solution pour un suivi spatiale ET temporel 57

A. Fonctionnement 57

B. Paramètres généraux concernant la mesure optode 60

C. Analyse de la littérature existante 64

Références 69

2. ESSAIS POUR L'UTILISATION IN SITU ET EN PROFONDEUR DES OPTODES PH 73

Dispositif expérimental 74

A. Fosses & Rhizotrons 74

B. Les optodes 76

Calibration 77

A. Obtention de la relation pH - ratio 77

B. Phase d'équilibration 78

C. Recalibration des optodes 79

Mesures, limites 81

Conclusion – Perspectives 84

Références 85

CHAPITRE 2 NUTRITION MINÉRALE ET ALTÉRATION 86

INTRODUCTION DU CHAPITRE 88

ARTICLE 1 90

LA REDUCTION DES PRECIPITATIONS AFFECTE LES PROPRIETES GEOCHIMIQUES DE LA RHIZOSPHERE EN PLANTATION D'EUCALYPTUS SUR SOLS FERRALITIQUES PROFONDS AU BRESIL

Abstract....91
Introduction....92
1.2. Material & Methods....94
1.2.1. Study site and soil properties....94
1.2.2. Experimental set up....94
1.2.3. Soil sampling and analyses....95
1.2.4. Root sampling and measurements....97
1.2.5. Statistical analyses....97
Results....98
1.3.1. Bulk soil chemical properties....98
1.3.2. Rhizosphere chemical properties....99
1.3.3. Influence of soil depth on the difference between rhizosphere and bulk soil chemical properties....101
1.3.4. Relationship between soil pH and K availability....105
Discussion....105
1.4.1. Acidification of the rhizosphere....105
1.4.2. Accumulation of K in the rhizosphere....106
References....110
Supplementary materials....115

ARTICLE 2 117

LA REDUCTION DES PLUIES N'AFFECTE PAS LA DISPONIBILITE EN ALUMINIUM ET EN NUTRIMENTS PENDANT LA SAISON DES PLUIES DANS DES PLANTATIONS D'EUCALYPTUS SOUS CLIMAT SUBTROPICAL HUMIDE

Abstract....118
[redacted] Introduction....119
[redacted] Material & Methods....120
2.2.1. Study site and soil properties....120
2.2.2. Experimental set up....120
2.2.3. Soil analyses....121
2.2.4. Statistical analyses....122
[redacted] Results....123
2.3.1. Biogeochemical properties within each of the two compartments....123
2.3.2. Rhizosphere effect....126
2.3.3. pH effect on soil biogeochemical properties....128
[redacted] Discussion....129
[redacted] References....131
[redacted] Supplementary materials....134

CHAPITRE 3 SYMBIOSES MYCORHIZIENNES 135

INTRODUCTION DU CHAPITRE 136

ARTICLE 3 137

PREMIERE PREUVE D'ASSOCIATION ECTOMYCORHIZIENNE SUR DES RACINES FINES PROFONDES DANS UNE PLANTATION D'EUCALYPTUS AU BRESIL.

Abstract 138

Introduction 139

3.1.1. Vertical distribution of AMF and EMF 139

3.1.2. Vertical distribution *vs* depth 141

3.2. Materials & methods 142

3.2.1. Study site and soil properties 142

3.2.2. Root sampling 143

3.2.3. Morphological observations of the ectomycorrhizae 143

3.2.4. Fine root coloration for arbuscular mycorrhiza investigation 143

3.3. Results 144

3.3.1. Ectomycorrhizae morphotypes and mantle color description (*pictures 1-13*) 144

3.3.2. Mantle texture variability (Photos *14-24*) 145

3.3.3. Rhizomorphs and Hyphae 146

3.3.4. Unknown mycorrhizae morphotype (Photos 38-42) 146

3.3.5. Fruiting bodies (Photos 43-52) 147

3.3.6. Arbuscular mycorrhizae (Photos 53-56) 148

3.4. Discussion 148

3.4.1. First evidence of ectomycorrhizal symbiosis at great depth 148

3.4.2. Complementary observations 149

3.4.3. Traits' differences between the 3 hypothetical EMF of the plantation 149

3.4.4. AMF: observations with time needed to confirm an AMF to EMF succession 150

3.4.5. DNA analysis and diversity characterization 150

3.4.6. Deep rooting and deep mycorrhizal symbiosis: a multidisciplinary challenge: 151

References 152

3.6. Supplementary materials 157

CHAPITRE 4 CARBONE RHIIZOSPHERIQUE 159

INTRODUCTION DU CHAPITRE 160

ARTICLE 4 162

LA REDUCTION DES PRECIPITATIONS AUGMENTE LA CAPACITE DE STOCKAGE DU CARBONE DANS LE SOL A GRANDE PROFONDEUR EN PLANTATION D'EUCALYPTUS GRANDIS AU BRESIL.

Abstract....163
Introduction....164
4.2. Materials & Methods....165
4.2.1. Study site and soil properties....165
4.2.2. Experimental set up....165
4.2.3. Sampling....166
4.2.4. CHN analyses....167
4.2.5. Statistical analyses....168
4.2.6. Graphical representation of the results....169
4.3. Results of collect 1....169
4.3.1. Statistical analyses....169
4.3.2. Organic C and total N contents within both compartments....169
4.3.3. Rhizosphere effect on organic C and total N contents....170
4.3.4. C/N ratios....172
4.4. Results of Collect 2....173
4.4.1. Statistical analyses....173
4.4.2. Organic C and total N contents within both compartments....173
4.4.3. Rhizosphere effect on organic C and total N contents....174
4.4.4. C/N ratios....175
4.5. Discussion....176
4.5.1. More than a half of the bulk soil organic C is stored below 1 m-depth....176
4.5.2. Up to three times more organic C within the deep rhizosphere under water stress..177
4.5.3. Turnover and fate of the fresh organic compounds injected within the rhizosphere 178
4.5.4. A main root origin for the organic C and total N in the bulk soil?....179
References....180
Supplementary materials....183

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 185

INTRODUCTION 186

DISCUSSION DES RESULTATS 187

Effet de la profondeur sur le fonctionnement racinaire 187

A. Implication de ces résultats en termes de nutrition minérale 187

B. Implication de ces résultats en termes de stockage du carbone dans le sol 189

II. Effet d'une réduction des précipitations 190

A. Implication de ces résultats en termes de nutrition minérale 191

B. Implication de ces résultats en termes de stockage du carbone dans le sol 191

PERSPECTIVES 196

PERSP 1 : Analyse moléculaire des mycorhizes 196

PERSP 2 : Etude des communautés microbiennes 197

PERSP 3 : Vers l'identification des exsudats racinaires 197

PERSP 4 : Vers une étude approfondie de la minéralogie 198

PERSP 5 : Devenir du carbone issu de la rhizodéposition 198

CONCLUSION 199

RÉFÉRENCES 200

ANNEXES 204

Introduction générale

1. Contexte Général de l'étude

2. Synthèse bibliographique : rôles fonctionnels des racines fines

3. Hypothèses et démarche expérimentale

1. Contexte général de l'étude

La croissance démographique, la consommation d'énergie et la demande en matières premières sont indissociablement liées (Zabel et al. 2009). Or, la population mondiale ne cesse d'augmenter et devrait atteindre 9.7 milliards d'individus en 2050 (ESA, 2015). Par ailleurs, la nécessité de substituer des énergies fossiles par de l'énergie renouvelable, concourt à accroitre les besoins mondiaux en bois. La demande mondiale de granulés comme source d'énergie « verte » a ainsi augmenté de 16% entre 2013 et 2014, en réponse notamment aux objectifs fixés par les politiques environnementales des pays européens et du Japon ainsi qu'à l'augmentation de la demande des pays émergents, notamment d'Asie. La production pour les panneaux de bois, à destination de l'ameublement, par ailleurs, a augmenté de 108% depuis 2000. Enfin, même si la demande mondiale est plus stable concernant la pâte à papier, ce sont tout de même plus de 330 millions tonnes de papier et carton qui sont produites chaque année (http://www.fao.org/forestry/fr/).

Le rôle des forêts pour l'humanité, la biodiversité et la régulation du climat, est aujourd'hui largement reconnu (Saleska et al. 2007). Un tournant dans les politiques de protection des forêts natives a été le sommet de Rio en 1992 qui avait retenti comme une sonnette d'alarme concernant la déforestation de la forêt amazonienne notamment. L'exploitation des forêts par les industries est aujourd'hui plus contrôlée. Par exemple, le groupe IKEA a passé l'an dernier un accord de coopération avec la FAO « visant à surveiller à la fois la durabilité de la gestion forestière et la traçabilité du bois afin de s'assurer qu'ils ont été produits et manipulés de manière responsable et conformément aux lois en vigueur » (http://www.fao.org/news/story/fr/item/289577/icode/). **La réduction des pressions sur les forêts naturelles face au besoin croissant en bois implique une alternative qui passe par les plantations industrielles**. La surface de ces dernières a augmenté à un rythme d'environ 2,8 millions d'hectares par an, pendant la période 2000-2005 (FAO, 2006). Elles représentent aujourd'hui 7% des zones forestières mondiales et fournissaient 39% du bois exploités en 2011 (FAO, 2011), avec une prévision d'atteindre 69 % en 2030 si l'augmentation des surfaces plantées est associée à une augmentation de la productivité (Carle & Holmgren, 2009).

Avec le pin, l'eucalyptus est l'une des espèces les plus plantées sous les tropiques, en raison de sa grande adaptabilité. Le Brésil a quadruplé sa production de cellulose en 25 ans (Carvalho, 2012) et se place aujourd'hui quatrième pays producteur de pâte à fibres après les Etats-Unis, la Chine et le Japon et devant le Canada. Une augmentation de 41 % des zones plantées d'eucalyptus a été observée entre 2005 et 2011 (ABRAF, 2012) ; elles devraient couvrir plus de 8 millions d'hectares en 2020 (ABRAF, 2013). Bien différents de leurs descendants natifs d'Australie (Figure 1), les eucalyptus plantés

aujourd'hui sont soumis à des programmes d'amélioration génétique et de clonage travaillant à la création de nouveaux hybrides plus productifs et capables de s'adapter aux différentes régions du Brésil. Depuis les années 1960, la productivité des plantations a été multipliée par quatre pour atteindre en moyenne aujourd'hui 40 m^3 ha^{-1} an^{-1}. Cependant, la production de bois d'eucalyptus est généralement limitée par la contrainte nutritionnelle (Gonçalves et al. 2008). Ainsi, l'augmentation de la productivité passe également par l'application de grandes quantités de fertilisants afin de compenser l'exportation d'éléments minéraux avec la biomasse aérienne sur des rotations successives et courtes (5-7 ans). Ces plantations en monocultures hautement productives sont sujettes à de nombreuses controverses concernant leur impact sur la biodiversité, le cycle de l'eau et des nutriments (http://www.ecolnews.com.br, http://reporterbrasil.org.br). L'augmentation des surfaces forestières plantées alimente la compétition croissante entre les modes d'usage des terres en milieu tropical, et devrait également accroitre la demande mondiale en fertilisants, notamment NPK, d'autant que l'expansion des plantations forestières est reléguée sur des sols de plus en plus pauvres. Cependant, l'établissement de plantations d'eucalyptus sur des pâturages dégradés, semble avoir un impact favorable sur le stockage de carbone dans le sol (Lima et al. 2006, Maquère et al. 2008).

Figure 1. Gauche : Forêt native d'eucalyptus, Australie. Droite : Plantation clonale d'eucalyptus, Brésil.

L'intérêt économique de ces plantations pour le Brésil (5 % du PIB national, ABRAF, 2012) poussent certaines organisations à diffuser des informations plutôt… surprenantes. Dans un rapport du CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia) datant de 2008, on peut lire, accompagné d'un schéma explicatif (Figure 2) que « des recherches ont prouvé que les racines d'eucalyptus atteignent en moyenne 2.5 m de profondeur ». Des travaux ont au contraire montré une symétrie de croissance entre partie aérienne et racinaire permettant aux racines fines d'eucalyptus de puiser dans les nappes à plus de 15 mètres de profondeur (Christina et al. 2011).

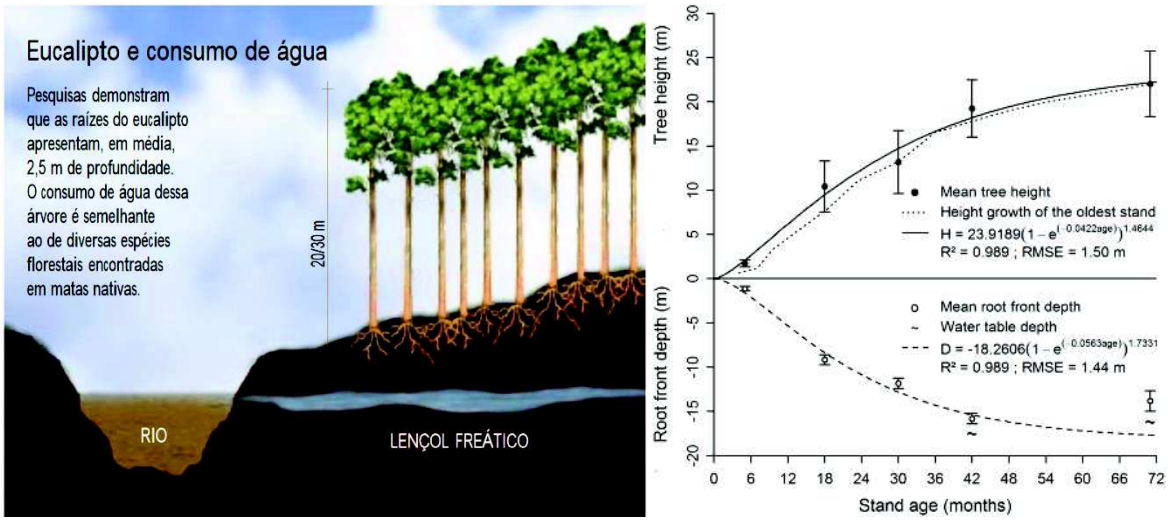


Figure 2. Gauche : données publiées en 2008 par le CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia). Droite : figure issue de l'article de Christina et al. (2011) montrant une symétrie entre la croissance des parties aériennes (Tree Height) et celle des parties racinaires (Root front depth) en fonction de l'âge de la plantation (Stand age).

Toutefois, les industries, notamment de la cellulose et du papier, sont très réceptives et demandeuses d'évaluations environnementales. La conscience de la nécessité de mieux comprendre le fonctionnement des cycles de l'eau et des nutriments pour maintenir la production et contrer la vulnérabilité des plantations hautement productives face aux changements globaux, incite en effet les industriels à investir dans des programmes de recherche. Les plantations devront en effet faire face aux sécheresses plus intenses et fréquentes prédites par les modèles climatiques (Solomon et al. 2009). La vulnérabilité des plantations d'eucalyptus s'est illustrée en 2014, une année marquée par une des plus fortes sécheresses ayant frappé le Brésil depuis 84 ans (Peixoto et Pitombo 2015, Whately et Lerer 2015). Les états du Nordeste et du Minas Gerais ont été particulièrement affectés, près de 100 000 ha de plantation d'eucalyptus auraient été détruits (Painel florestal 2015).

Le maintien de la productivité des forêts tropicales plantées, au cours des rotations successives et face au changement climatique, est nécessaire pour répondre à la demande croissante en bois. Cet objectif nécessite d'améliorer notre compréhension des flux d'eau et d'éléments nutritifs dans les écosystèmes forestiers, afin d'adapter les méthodes de sylvicultures (fertilisation, durée des rotations, sélection des clones) aux conditions pédoclimatiques et d'évaluer au mieux les impacts environnementaux. La contribution des racines fines profondes dans le cycle de l'eau a été modélisée récemment : les racines fines très profondes sont capables de puiser dans les ressources de la nappe et permettent ainsi la survie des arbres en période de sécheresse (Christina et al. 2015). Une fertilisation limitée en potassium pourrait permettre de réduire la consommation en eau de la plante (Battie-Laclau et al. 2014). Les cycles des nutriments et la dynamique racinaire ont également été étudiés (Laclau 2012). Cependant le rôle des racines fines profondes dans la nutrition minérale reste encore très peu documenté alors qu'une étude démontrait en 2011 leur potentiel d'absorption de

nutriments, supérieur à celui des racines de surface dans le cas des cations (da Silva et al. 2011). Une quantité non négligeable de racines fines colonise le sol jusqu'à 10 m (Laclau et al. 2013), y compris les zones peu alimentées par l'eau des précipitations et non atteinte par la remontée par capillarité de l'eau de la nappe. Pourquoi alors, la plante investirait-elle dans le développement de biomasse racinaire dans ces zones intermédiaires représentant plusieurs mètres de sol et sans intérêt majeur pour la ressource en eau ? Les sols tropicaux sont souvent pauvres en nutriments, en terme de concentration volumique, cependant leur épaisseur en font des réservoirs finalement important, en terme de stock total. **Nous supposons que les racines fines profondes jouent un rôle essentiel dans la nutrition minérale pouvant expliquer leur relativement forte densité jusqu'à plusieurs mètres de profondeur. D'autre part, en fonctionnant, les racines fines libèrent une quantité importante de carbone. Nous soupçonnons ce phénomène appelé rhizodéposition d'impacter le stockage de carbone dans le sol et notamment le sol profond.**

Dans ce contexte, **l'objectif de la thèse est de caractériser l'effet de la profondeur couplé à l'effet d'une réduction des précipitations sur le fonctionnement des racines fines d'*Eucalyptus grandis* afin d'évaluer les rôles fonctionnels des racines fines profondes, pour la plante, en termes de nutrition minérale et d'association symbiotique, et pour l'écosystème, en termes de séquestration du carbone**. Afin d'appréhender cet objectif, le manuscrit débute par une synthèse bibliographique sur les rôles et stratégies des racines fines pour le prélèvement des nutriments qui aboutira sur la formulation des hypothèses testées dans ma thèse et de la démarche expérimentale poursuivie pour aborder les différents objectifs spécifiques correspondants.

RÉFÉRENCES

ABRAF (2012) Anuário Estatístico da ABRAF. In: *Ano Base 2011*. Brasilia, DF.

ABRAF (2013) Anuário Estatístico da ABRAF. In: *Ano Base 2012*. Brasilia, DF.

Battie-Laclau P, Laclau J-P, Domec J-C, et al. (2014) Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in Eucalyptus grandis plantations. New Phytol 203:401–413. doi: 10.1111/nph.12810

Carvalho KHA de, Silva ML da, Soares NS (2012) Effect of area and productivity in pulp production in Brazil. Rev Árvore 36:1119–1128. doi: 10.1590/S0100-67622012000600012

Carle JB, Holmgren LPJ (2009) Wood from planted forests: global outlook to 2030. In: *Planted forests: uses, impacts and sustainability*, FAO/CABI edn (ed Evans J). Rome (Italy).

Christina M, Laclau JP, Gonçalves JLM, Jourdan C, Nouvellon Y, Bouillet JP (2011) Almost symmetrical vertical growth rates above and below ground in one of the world's most productive forests. *Ecosphere*, **2**, 1–10.

Christina M, Le Maire G, Battie-Laclau P, et al. (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. Glob Change Biol 21:2022–2039. doi: 10.1111/gcb.12817

FAO, (2006). Global Forest Resources Assessment. Rome, Italy.

FAO (2011) State of the World's Forests. Rome, Italy.

Gonçalves, J., Stape, J., Laclau, J.-P., Bouillet, J.-P., and Ranger, J. (2008). Assessing the effects of early silvicultural management on long-term site productivity of fastgrowing eucalypt plantations: the Brazilian experience. South. For. a J. For. Sci. 70: 105–118.

Gonçalves, J.L.D.M. et al. (2013). Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. For. Ecol. Manage. 301:6–27.

Laclau J-P (2012) « Une approche écosystémique du fonctionnement minéral des plantations forestières ». Habilitation à diriger des recherches. Centre INRA de Nancy à Champenoux

Laclau J-P, da Silva EA, Rodrigues Lambais G, et al. (2013) Dynamics of soil exploration by fine roots down to a depth of 10 m throughout the entire rotation in Eucalyptus grandis plantations. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00243

Lima AMN, Silva IR, Neves JCL et al. (2006) Soil organic carbon dynamics following afforestation of degraded pastures with eucalyptus in southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, **235**, 219–231.

Maquère V, Laclau JP, Bernoux M et al. (2008) Influence of land use (savanna, pasture, Eucalyptus plantations) on soil carbon and nitrogen stocks in Brazil. *European Journal of Soil Science*, **59**, 863–877.

Peixoto P, Pitombo JP (2015) Off-Season Drought Makes 93 Brazilian Cities Cut Off Water. Folha de S.Paulo.

Saleska S.R., Didan K., Huete A.R., da Rocha H.R., (2007). Amazon forests green-up during 2005 drought. Science 318, 612.

da Silva E V, Bouillet JP, de Moraes Gonçalves JL et al. (2011) Functional specialization of Eucalyptus fine roots: contrasting potential uptake rates for nitrogen, potassium and calcium tracers at varying soil depths. *Functional Ecology*, **25**, 996–1006.

Solomon S, Plattner G-K, Knutti R, Friedlingstein P (2009) Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **106**, 1704–9.

Whately M, Lerer R (2015) Brazil drought: water rationing alone won't save Sao Paulo. *The* Guardian.

REFERENCES WEB (DANS L'ORDRE D'APPARITION DANS LE TEXTE)

https://esa.un.org/unpd/wpp /publications /files /key_findings_wpp_2015.pdf

http://www.fao.org/forestry/fr/

http://www.fao.org/news/story/fr/item/289577/icode/

http://cib.org.br/wp-content /uploads/2011/10 /Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf

http://www.ecolnews.com.br /eucalipto _monocultura _e_ insustentabilidade _ambiental.htm

http://reporterbrasil.org.br/wp-content/uploads/2015/02/8.-caderno_deserto_verde.pdf

http://www.painelflorestal.com.br/noticias/como-plantar/estiagem-prolongada-destroi-100-mil-hectares-de-florestas-plantadas-no-norte-de-minas-gerais

2. Synthèse bibliographique

Rôles fonctionnels des racines fines

Introduction

Les deux grandes fonctions des racines pour les végétaux sont l'ancrage dans le sol, et l'absorption des nutriments et de l'eau. La première fonction, la plus visible, est assurée par les racines les plus grosses, et implique principalement une interaction physique entre le sol et les racines. Beaucoup plus subtile en revanche, la fonction d'absorption, implique des interactions biogéochimiques, biochimiques et biologiques complexes entre le sol, les microorganismes qui y vivent et les racines les plus fines.

En fonctionnant, ces racines fines, ont en effet la capacité de modifier les propriétés physiques, chimiques (biogéochimiques et biochimiques) et biotiques du sol qui les entoure. On appelle rhizosphère cette portion de sol soumise à l'influence des activités racinaires et définie pour la première fois par Hiltner en 1904. Il est reconnu aujourd'hui que les processus rhizosphériques peuvent avoir des répercutions non seulement à l'échelle de la plante mais également à l'échelle des écosystèmes (Morrissey et al. 2004, Lee et al. 2005), au niveau de la stabilité du climat, en regard notamment aux émissions de gaz à effet de serre et à la séquestration du carbone, ainsi qu'au niveau du maintien de la fertilité des sols et de la sécurité alimentaire (York et al. 2016).

Cette synthèse a pour but de présenter le rôle des racines fines dans l'optimisation de l'absorption des nutriments et de l'eau du sol. Le lecteur peut se référer au schéma conceptuel, Figure 4, représentant les actions racinaires (d'absortion et de sécretion) permettant la mobilisation des nutriments du sol.

I. Les racines fines : fonction d'absorption de l'eau et des nutriments

Les plantes autotrophes se décomposent en deux grandes structures : l'appareil aérien et l'appareil souterrain. L'appareil aérien porte les feuilles qui sont la voie d'entrée principale du carbone en captant le CO_2 de l'atmosphère, par le processus de la photosynthèse. L'appareil souterrain porte les racines fines qui sont la voie d'entrée de l'eau et des nutriments : éléments nutritifs majeurs (N, P, K, Ca, Mg, Na, S) et oligoéléments (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, B, Cl) utilisés pour la croissance et le métabolisme de la plante. Un peu à l'image des feuilles, les racines fines sont des structures éphémères. Leur durée de vie et leur potentiel d'absorption dépendent de leur traits (anatomie, morphologie, ordre topologique), de leur statut mycorhizen (Eissenstat et al. 2000, Guo et al. 2004, Guo et al. 2007, Pregitzer et al. 2002, Wang et al. 2006), c'est-à-dire leur capacité à entretenir des relations symbiotiques avec des champignons, mais également du climat. Une compilation de bases de données

regroupant plus de 180 études a montré que le taux de renouvellement annuel ou turnover augmente entre le climat boréal, tempéré puis tropical : 0.77 ± 0.70, 1.21 ± 1.04 et 1.44 ± 0.76 an^{-1}, respectivement (Finér et al. 2011). Dans les plantations d'eucalyptus au Brésil, il a été mesuré par exemple un turnover de 1.8 an^{-1} dans les premiers centimètres de sol (Jourdan et al. 2008). Un couplage particulièrement intéressant entre la dynamique foliaire et racinaire a été montré en zone arctique, sur huit espèces différentes, allant de la toundra naine aux forêts de bouleaux (Sloan et al. 2013), mettant en avant une stratégie à l'échelle de la plante entière, généralisée sur plusieurs espèces (Figure 1). Ce couplage donne aussi des perspectives de simplification d'évaluation des stocks de carbone racinaire par des mesures indirectes sur les feuilles.

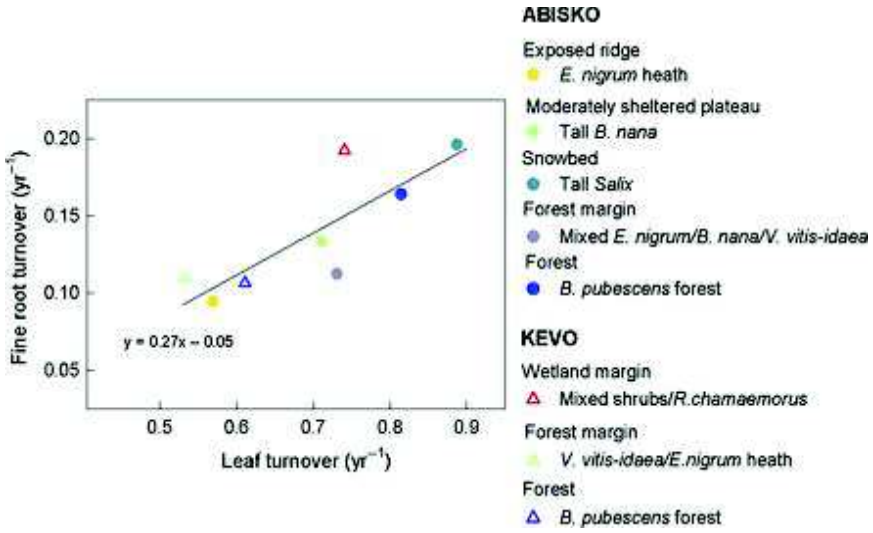


Figure 1. Couplage entre dynamique des racines fines et dynamique foliaire pour 8 espèces en zone arctique (Sloan et al. 2013)

Le processus d'absorption racinaire peut être divisé en trois étapes : le mouvement du nutriment du sol vers la racine (étape 1), le mouvement du nutriment de l'extérieur de la racine vers l'intérieur (étape 2) et la translocation du nutriment depuis l'épiderme racinaire jusqu'au cylindre central et son transfert vers les feuilles (étape 3). Nous nous intéresserons dans cette synthèse à la première étape « mouvement du nutriment du sol vers la racine » et aux conditions favorables pour la seconde « entrée du nutriment dans le milieu racinaire ». Nous pouvons noter que cette seconde étape est spécifiquement permise par l'anatomie particulière des racines fines qui gardent leur structure primaire pendant toute la durée de leur vie, contrairement aux racines d'ancrages et conductrices, qui, i) chez les Dicotylédones, différencient une structure secondaire, croissant en diamètre et produisant du bois, et ii) chez les Monocotylédones, différencient un phelloderme hypodermique subérisé, leur enlevant leur pouvoir absorbant. Les mécanismes membranaires contrôlant l'absorption des nutriments ne seront pas détaillés dans cette synthèse mais nous verrons l'importance de l'équilibre entre l'entrée d'anions et de cations dans le milieu cellulaire. Au niveau de

l'étape 3 « translocation du nutriment depuis l'épiderme racinaire jusqu'au cylindre centrale » nous pouvons rappeler que les très jeunes racines fines autorisent le transport de certains ions comme Ca ou Mg par voie apoplasmique mais que rapidement la paroi de leur cellules endodermiques développent la « bande de Caspari », une couche composée principalement de subérine, un mélange complexe de longues chaînes hydrophobes d'acides gras et d'alcools, obligeant ensuite l'entrée de ces ions dans le cylindre central par voie symplasmique . Cette évolution réduit la capacité d'absorption des racines fines pour les rares ions concernés par le transport apoplasmique (Ca, Mg). Cependant la plupart des éléments utilisent systématiquement la voie symplasmique qui permet un contrôle plus fin des solutés avant leur passage dans la sève brute (« check point » actif avec consommation d'énergie).

Les deux grandes stratégies des racines pour l'absorption des nutriments et de l'eau (étape 1) sont le « foraging » i.e. la prospection des ressources du sol et le « mining » i.e. l'exploitation des ressources sur le lieu où la racine se trouve.

La stratégie de prospection ou « foraging » intervient à deux échelles :

(i) Une prospection à l'échelle du système racinaire. Le volume et l'orientation de l'exploration va dépendre de la stratégie architecturale adoptée par la plante. Si l'architecture racinaire d'une plante est déterminée en partie par sa génétique, la plasticité racinaire autorise une adaptation aux différentes contraintes environnementales (Wang et al. 2006, Logbo et al. 2013). En cas de sécheresse par exemple, la mise en place d'une stratégie de tolérance va produire des racines capables de survivre dans des zones de faible teneur en eau alors que la mise en place d'une stratégie d'évitement va se traduire par un « abandon » des racines en zones sèches au profit du développement de nouvelles racines dans des zones plus humides (Huang et al. 1997). Des différences de profondeur d'enracinement importante apparaissent notamment en fonction du climat, de la texture de sol et des ressources en eau. Ainsi, un enracinement profond est plus susceptible de se produire dans les régions marquées par une saison sèche, un climat semi-aride ou tropical humide, sur des sols grossiers et à texture fine et moins susceptibles de se produire dans les régions plus froides et humides sur un sol à texture moyenne (Schenk et Jackson, 2005). Cependant, d'après Pierret et al. (2016), tous les arbres et arbustes sont capables de développer un enracinement profond, indépendamment du climat, pour autant que cela leur permette d'atteindre les ressources en eau situées en profondeur, voire la nappe phréatique. Schenk et Jackson (2002) insistent également sur le biais de l'évaluation des profondeurs d'enracinement lié à des échantillonnages tronquant fréquemment la partie la plus profonde du système racinaire, notamment en milieu tropical. Un exemple d'enracinement particulièrement profond a été reporté pour un arbre de la famille des fabacées (*Prosopis juliflora*), originaire du

Mexique et des Caraïbes, atteignant une profondeur d'enracinement supérieure à 53 m pour une partie aérienne d'une dizaine de mètre (Phillips, 1963). Parfois, il peut se produire une symétrie de croissance entre parties aériennes et racinaires. Ceci a été montré dans le cas de plantations d'eucalyptus au Brésil, en milieu subtropical (Christina et al. 2011). Ces plantations, développées sur un sol (Ferralsol) profond et homogène sont caractérisées par une exploration rapide et conséquente des racines fines vers la profondeur (Laclau et al. 2013), notamment pour l'accès à l'eau de la nappe situé à 17 m mais également pour compenser la faible concentration en nutriments du sol par un volume exploré plus grand. Cependant, pour la plupart des espèces, il n'existe pas de corrélation entre la hauteur des parties aériennes et racinaires, et ces dernières peuvent parfois représenter la partie immergée de l'iceberg (figure 2) !

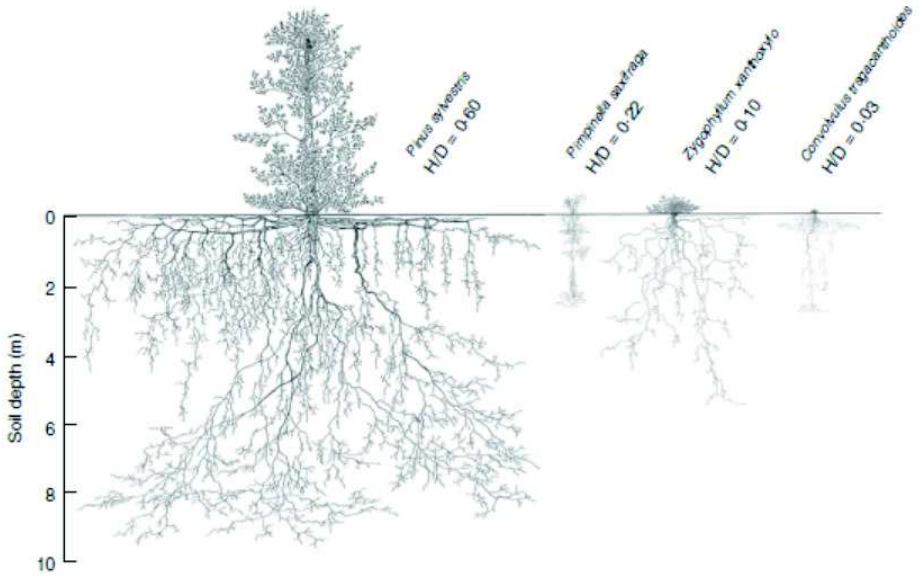


Figure 2. Ration de la hauteur des parties aériennes sur la profondeur maximale d'enracinement (H/D), calculés par Pierret et al. (2016) pour 4 espèces, à partir des schémas de Kutschera et al. (1997).

(ii) Une prospection à l'échelle de la racine. L'anatomie racinaire des racines fines est particulière : leur épiderme est caractérisé par la présence de cellules présentant une excroissance d'environ 0,5-1 mm (parfois jusqu'à 3-5 mm), les poils racinaires, qui permettent (1) une augmentation considérable de la surface d'échange avec le sol et (2) l'accès à des pores plus fins du sol grâce à leur diamètre ne dépassant pas 15 µm.

Le « mining » est la capacité de la racine à exploiter les ressources présentes à l'endroit elle se trouve. Cette stratégie repose sur la notion de disponibilité des nutriments pour la plante, disponibilité en partie liée au réservoir dans lequel se trouvent les éléments nutritifs dans le sol, et sur l'aptitude variable des plantes à modifier cette disponibilité dans l'environnement des racines (Hinsinger 2011). On peut grossièrement distinguer trois réservoirs principaux dans le sol, en fonction de la disponibilité qu'ils offrent aux nutriments qu'ils contiennent : **1. La solution du sol**. Il s'agit du réservoir

directement accessible pour le prélèvement racinaire. Les nutriments y sont présents essentiellement sous forme ionique, chargés positivement pour l'essentiel des éléments (K^+, NH_4^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} et de nombreux micronutriments), ou négativement pour d'autres (NO_3^-, $H_2PO_4^-$, Cl^-, SO_4^{2-}). Un frein à l'affinité des nutriments pour ce compartiment est la faible solubilité de nombreux minéraux du sol, comme c'est le cas pour l'élément phosphore, ainsi que l'affinité des minéraux constitutifs de la phase argileuse des sols et des constituants organiques pour les ions en solution. **2. Le complexe d'échange du sol**. Ce deuxième réservoir est constitué de la surface chargée négativement/positivement des minéraux constitutifs de la phase argileuse des sols (phyllosilicates argileux et oxydes métalliques), ainsi que des constituants organiques. La surface des minéraux argileux ainsi que celle de la matière organique comportent des charges négatives qui sont des lieux d'adsorption non spécifiques pour les cations. Un simple échange cationique permet de rompre les forces électrostatiques maintenant les cations adsorbés à ces charges négatives. Nous verrons qu'une part importante de ce complexe d'échange est constituée par des minéraux argileux particuliers, dits 2:1 (cf p.17). Les oxydes métalliques présentent quant à eux des charges positives pouvant adsorber des ions/ligands chargés négativement (HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$ par exemple). Cependant l'adsorption dans ce dernier cas est spécifique et la mobilisation des nutriments adsorbés sur ces oxydes métalliques doit passer par un échange de ligands. La protonation de ces sites à charges dites variables, également présentes sur les constituants organiques, fait qu'elles deviennent positives lorsque le pH diminue en dessous du point de charge nulle, tandis que ces mêmes sites peuvent être chargés négativement à pH plus élevé. La surface des oxydes métalliques est en ceci plus similaire au troisième compartiment, en termes de disponibilité. **3. Les éléments constitutifs des particules solides du sol**. Les nutriments peuvent se trouver en combinaison moléculaire au sein de la matière organique (dans le cas de N, P et S), au sein des oxydes métalliques (fer inclus dans la goethite par exemple), ou encore intégrés au sein de la structure cristalline des minéraux silicatés notamment (micas et feldspaths pour le potassium par exemple). La libération des nutriments piégés dans ce dernier réservoir oblige la rupture de liaisons fortes (notamment O-cations métalliques) et nécessite donc des processus particuliers : la minéralisation de la matière organique ou l'altération des minéraux.

Le prélèvement par contact direct entre une particule solide, qui expose des cations à sa surface, et l'extrémité des racines en croissance, ne représente qu'une part très faible de la quantité totale de nutriments nécessaires à la plante (Barber et al. 1963). La racine prélève en effet les éléments minéraux pratiquement exclusivement sous forme ionique dissoute dans la solution du sol. Il est donc nécessaire que les nutriments des différents compartiments du sol (1) passent en solution puis (2) se mettent en mouvement pour rejoindre la surface racinaire où ils pourront être absorbés.

Cette synthèse, conformément aux recherches réalisées dans le cadre de cette thèse, se focalisera sur cette stratégie de « mining » plutôt que sur la stratégie de « foraging », même si nous discuterons dans la dernière partie l'influence des communautés microbiennes sur l'efficacité de la prospection du sol.

II. Absorption et mobilisation des ressources facilement disponibles

Les deux grands moteurs du transport des nutriments vers la surface racinaire sont le flux de masse et la diffusion. Nous allons voir que ces deux moteurs se mettent en place en réponse à un mécanisme d'absorption de la racine, absorption de l'eau dans le cas du flux de masse, absorption des nutriments dans le second cas (Figure 4, droite).

A. Absorption de l'eau et flux de masse : transport des nutriments de la solution du sol

a. L'eau : une molécule essentielle …et gaspillée dans la plante ?

La disponibilité de l'eau est le facteur environnemental le plus déterminant dans la répartition des végétaux à la surface de la Terre (Turner et Begg 1981). L'eau constitue en effet 80 à 90% de chaque cellule et a un rôle notamment (i) dans le maintien et la croissance des cellules par le phénomène de turgescence, (ii) dans la diffusion et la translocation de minéraux et de solutés au sein des cellules et entre organes, (iii) dans le métabolisme, dont un exemple majeur est la photolyse de l'eau qui initie la photosynthèse. Les ions hydrogène alors générés permettent, après conversion énergétique, de réduire le CO_2 capté dans l'atmosphère, en sucres (carbohydrates) utilisables par la plante. Par ce métabolisme, l'eau constitue également une source d'oxygène pour l'atmosphère de la planète Terre. En fait, l'essentiel (97-99%) de l'eau absorbée par les racines rejoint directement l'atmosphère par le processus de transpiration initiée par l'ouverture des stomates permettant de capter le CO_2 atmosphérique (Sinha, 2004). La quantité d'eau « perdue » par transpiration dépend de plusieurs facteurs notamment édaphiques, particulièrement pédo-climatiques, et génétiques. L'évapotranspiration est ainsi apparue corrélée à l'humidité en eau du sol dans 6 écosystèmes en région semi-aride en Mongolie (Lu et al. 2011) et à la disponibilité en potassium dans des plantations d'eucalyptus en milieu subtropical (Battie-Laclau et al. 2014). On note que ce dernier exemple montre les limites de la fertilisation potassique qui peut, en excès, avoir la conséquence néfaste de réduire le stockage de l'eau dans les horizons profonds du sol. L'optimisation de l'utilisation de l'eau dépend également fortement de l'itinéraire photosynthétique adopté par les plantes qui sont ainsi classées C4 et C3 ou CAM, en fonction des produits formés dans la première phase de la photosynthèse. Les plantes en C4 (regroupant par exemple la majorité des graminées tropicales) sont souvent plus efficaces que les plantes en C3 (graminées tempérées, légumineuses, et toutes les espèces ligneuses,..). Ainsi, il faudrait à la luzerne 844 dm^3 d'eau pour produire 1 kg de matière sèche quand le sorgho n'en consommerait que 277 dm^3 (Mengel et Kirby, p236, 1987).

b. *La transpiration : moteur du transport des nutriments par flux de masse*

Le potentiel hydrique de l'atmosphère est généralement plus faible que celui du sol. Cette différence de potentiel hydrique est la force motrice qui permet la translocation de l'eau depuis le sol vers l'atmosphère à travers la plante, lorsque les stomates sont ouverts. Ce mécanisme implique un continuum sol-plant-atmosphère permis par les propriétés de cohésion et de capillarité des molécules d'eau : l'eau évaporée au niveau des feuilles est remplacée par l'eau prélevée dans le sol. Ce mécanisme est responsable de la remontée de la sève brute dans le xylème, pouvant représenter une hauteur de plus de 100 m. Les éléments solubles présents dans la solution du sol sont transportés avec ce flux convectif d'eau, du sol jusqu'à la surface de la racine où ils deviennent alors potentiellement absorbables (Figure 4, en haut à droite). Les molécules d'eau pénètrent dans la racine par voie passive via des canaux appelés aquaporines. Les nutriments s'accumulent à la surface racinaire lorsque que leur absorption est plus faible (selon la demande de la plante) que leur ré-approvisionnement et on observe au contraire un appauvrissement (diminution de concentration) lorsque que le ré-approvisionnement ne parvient pas à couvrir la demande de la plante.

c. *Contribution du flux de masse au transport des nutriments vers la racine*

La contribution du flux de masse dans le transport des nutriments du sol vers la surface racinaire dépend (i) du volume que représente ce flux d'eau i.e. de la consommation en eau de la plante, (ii) de la concentration en nutriments de la solution du sol et (iii) de la demande de la plante (besoin en nutriments). Ainsi, seuls les nutriments solubles et présents abondamment dans la solution du sol (tels que le nitrate ou le calcium dans de nombreux sols) sont concernés significativement par ce flux.

La concentration des nutriments en solution dépend du nutriment et du type de sol. Ainsi, Ca^{2+} ou Mg^{2+} se retrouvent parfois en forte concentration dans la solution du sol et une accumulation de ces ions à la surface racinaire peut alors se produire (Lorenz et al. 1994). Si cela peut être un avantage pour la nutrition de la plante, dans le cas de sols calcaires, des précipités de $CaCO_3$ peuvent cependant se former autour des racines, conduisant à une calcification de la rhizosphère, avec des implications dans la chlorose ferrique (Jaillard 1982). Le flux de masse peut également engendrer l'accumulation de Na et Cl à des concentrations néfastes autour des racines en sol salé, alors que le sol n'était pas considéré comme ayant une salinité critique en se fondant sur les propriétés du sol non rhizosphérique (Marschner et al. 1995). Cependant, dans le cas des nutriments essentiels, on observe plus souvent une faible concentration en solution, comme c'est le cas pour K et P, ou pour N sous forme ammoniacale (Hinsinger, 2001). Le prélèvement racinaire de ces éléments peut alors engendrer un appauvrissement de l'élément à la surface racinaire. Cela peut aussi concerner le nitrate, malgré des concentrations plus élevées en solution, du fait de la forte demande en N de la plante (Barber 1995). La diminution de concentration peut atteindre par exemple jusqu'à 2-3 µM dans le cas du potassium

dans la rhizosphère de maïs, dans des sols dont la concentration est de l'ordre de 100-1000 µM dans le sol non rhizosphérique (Claassen et Jungk 1982). La zone d'appauvrissement de P est limitée à environ 1 mm en raison de la faible mobilité de cet élément, tandis qu'elle est d'environ 5 mm pour K et peut atteindre plusieurs dizaines de mm pour les ions nitrate (Hinsinger et al. 2009). Dans le cas des solutions de sol pauvres en éléments nutritifs, comme c'est le cas généralement sous climat tropical et subtropical, le flux de masse est alors caractérisé par une faible concentration en nutriments (Laclau et al. 2010) malgré un large volume d'eau evapotranspiré (Battie-Laclau et al. 2016), limitant l'efficacité de ce mécanisme pour le transfert des nutriments du sol au contact de la racine. Quels que soient le climat et l'espèce végétale, ce mécanisme ne suffit généralement pas à subvenir aux besoins nutritifs de la plante car il mobilise uniquement le compartiment « solution du sol » qui est le plus pauvre en éléments nutritifs.

B. Absorption des nutriments et mobilisation du complexe d'échange par diffusion ionique

La force de diffusion permet de mobiliser un second réservoir de nutriments : les cations et anions adsorbés à la surface chargée négativement et positivement, respectivement, principalement des minéraux argileux, des oxydes métalliques et de la matière organique (Figure 4, en bas à doite).

a. L'absorption des nutriments : moteur du transport des nutriments par diffusion

Si l'absorption des nutriments est une des fonctions majeures des racines, elle est aussi un moteur pour la modification de la disponibilité des éléments nutritifs dans le sol. En effet, le phénomène de diffusion qui en résulte conduit à des modifications de concentration ionique en solution qui induisent in fine d'importants déplacements d'équilibres notamment d'adsorption et de désorption. La diffusion est le passage d'un ion depuis une zone plus concentrée vers une zone moins concentrée selon la loi de Fick (Barber, 1995). Nous avons vu que lorsque la vitesse d'absorption des nutriments est supérieure à la vitesse de réapprovisionnement, le sol rhizosphérique à proximité de la surface racinaire devient une zone d'appauvrissement. La force de diffusion permet alors à la fois (1) la désorption des cations du complexe d'échange et (2) leur transport jusqu'à la surface racinaire. Lorsque l'absorption est inférieure aux apports par flux de masse et que la concentration augmente au voisinage de la racine, la diffusion peut au contraire favoriser l'adsorption des nutriments aux particules du sol. Nous verrons que la réversibilité de ce phénomène a justement l'intérêt d'adapter l'apport et le stockage aux besoins de la plante, notamment concernant le potassium (Barré et al. 2008).

b. Notion de complexe d'échange cationique et cas des minéraux argileux 2:1

L'ensemble des charges négatives exposées par les particules de sol pouvant potentiellement retenir les cations du sol constitue la capacité d'échange cationique du sol (CEC). La désorption des cations du

complexe se produit lorsque les forces électrostatiques les maintenant liés aux charges négatives sont plus faibles que la force de diffusion générée par un appauvrissement au sein de la rhizosphère. On note que la CEC effective diminue généralement avec le pH en raison de l'augmentation de l'occupation des sites par les ions H^+ ou Al^{3+}.

Une partie de ce complexe d'échange cationique est constituée par la zone interfoliaire de certains minéraux argileux, les minéraux dits « 2:1 », qui ont été évoqués rapidement dans l'explication du « mining ». Nous verrons que leur contribution est particulièrement non-négligeable sous climat tempéré, mais nous allons premièrement expliquer la structure de ces minéraux pour mieux comprendre leur implication dans le complexe d'échange. Les minéraux argileux sont des minéraux silicatés structurés en un empilement de deux types de couches : couche T (pour tétraèdres) et couche O (pour octaèdre), formant un feuillet. La succession de ces couches dans l'espace détermine le type de feuillet et ainsi le type de minéral argileux. On parle d'argile 1:1 pour un enchainement TOTOTO… et l'argile est dite 2:1 pour un enchainement TOT-TOT-TOT. Dans ce dernier cas, entre chaque feuillet de type « TOT » viennent s'intercaler des cations pour compenser des déficits de charges permanents au sein de la structure. Il peut s'agir d'ions potassium anhydres (ex : illite/mica), ou d'autres cations hydratés (ex : smectites/vermiculites) ou même d'une couche d'oxyde aluminique (ex : chlorite/VIH). Très fréquemment, un minéral argileux n'est pas composé exclusivement d'un seul type de feuillet, on dit alors qu'il est interstratifié. Par exemple, un interstratifié illite/smectite (I/S) est un empilement à la fois de feuillets type illite et de feuillets type smectite.

Le premier constat est que les minéraux argileux 2:1 de type smectites/vermiculites peuvent adsorber le potassium en excès dans la solution de sol. L'adsorption des cations potassiques par des échantillons d'argile est en effet fonction de la concentration en K de la solution dans laquelle se trouvent les minéraux, suivant une courbe de saturation classique (Barré et al. 2008). Dans l'expérience citée, environ 1 g de potassium pour 100 g d'argiles a pu être adsorbé. Au niveau minéralogique, cet échange de potassium peut conduire à deux types de conséquence. **1. Une modification de la proportion de feuillets type illite au sein notamment des interstratifiés illite/smectite**. Pernes-Debuyser et al. en 2003 ont étudié les conséquences d'une addition de K en comparant la minéralogie d'une parcelle ayant reçu une fertilisation potassique par rapport à une parcelle témoin sans fertilisation. L'ajout de potassium dans les sols a favorisé la formation de feuillets type illite : les cations hydratés en positions interfoliaire des smectites ont été remplacés par du potassium anhydre. Inversement, Velde et Peck en 2002 ont étudié les conséquences d'un épuisement des sols en K induit par des cultures successives en comparant des sols échantillonnés en 1913 avec d'autres prélevés après 42 et 83 années de culture de maïs en continu sans fertilisation. Les résultats montrent une forte diminution de la quantité de feuillets type illite avec le temps. **2. Le passage d'une population d'argile vers une autre**. Une

transition illite–vermiculite a été documentée dans le cas d'un appauvrissement en potassium sous l'effet de l'absorption de K par les plantes (Jaillard et Hinsinger 1993, Velde et Peck 2002, Barré et al. 2007a).

Les minéraux argileux 2:1 peuvent ainsi réversiblement «adapter» leur contenu interfoliaire en fonction de la disponibilité en K du sol et ceci à court terme (Barré et al. 2007a-b, 2008, Turpault et al. 2008). En ce sens ce mécanisme est un moyen de conservation et de promotion de la fertilité à long terme, empêchant notamment la perte par lixiviation du potassium apporté par fertilisation ou libéré après la mort de la plante. Beaucoup de travaux ont été réalisés sur la dynamique de ce réservoir potassique, au cours de cultures successives, suivant le niveau de fertilisation, concluant à un rôle déterminant pour la conservation de la fertilité en climat tempéré.

c. Contribution de la diffusion dans l'apport des nutriments à la surface racinaire

L'efficacité du mécanisme de diffusion pour la nutrition des plantes dépend : **(1) de la taille du complexe d'échange du sol**. Lorsque les sols ont une CEC faible (peu de matière organique et d'argiles 2:1), la désorption des cations par force de diffusion peut ne pas suffire à satisfaire les besoins nutritifs de la plante. Par exemple, les sols très altérés, en milieu tropical notamment, ne contiennent que très peu ou pas de minéraux argileux 2:1 et leur complexe d'échange peut être saturé par l'aluminium si le pH est faible. **(2) des éléments que le complexe d'échange peut contenir.** D'autre part, le mécanisme de diffusion ne s'applique qu'aux ions liés par des forces énergétiques très faibles à la surface chargée des particules de sol. La forte réactivité de ions orthophosphates (PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, HPO_4^{-}), font du P un élément très peu mobile (Hinsinger et al. 2007) et par conséquent très peu mobilisable. De plus, l'essentiel des ressources en P du sol est piégé au sein même de la matière organique et des minéraux.

La racine peut-elle alors mobiliser les éléments piégés dans ce dernier réservoir constitué par la structure cristalline des minéraux et des combinaisons moléculaires de la matière organique ?

La réversibilité du mécanisme de libération du potassium interfoliaire des minéraux 2:1 que nous avons vu, n'est en fait pas la règle absolue. En effet, Hinsinger et al. en 1993 témoignent d'une transformation irréversible par les racines d'un mica trioctaédrique (phlogopite) dans la rhizosphère du colza. Le prélèvement du K interfoliaire est dans ce cas couplé avec la libération d'une partie du Mg structurel (et donc inaccessible par les forces de diffusion) des feuillets du minéral, par dissolution (hydrolyse acide) de ces derniers en lien avec une acidification de la rhizosphère (cf infra). Cet exemple montre qu'un phénomène autre qu'un simple appauvrissement a été provoqué par l'activité racinaire et a permis l'accès à ce dernier réservoir du sol : la structure interne des particules du sol.

III. SECRETIONS ET MOBILISATION DES RESSOURCES NON DISPONIBLES

Nous avons vu dans la partie précédente que la fonction d'absorption de la racine (eau /nutriments) engendre des différences de potentiels au sein de la rhizosphère (potentiel hydrique / concentration) entrainant les nutriments (par flux de masse/diffusion) depuis le compartiment concerné (solution de sol / complexe d'échange) jusqu'à la surface racinaire. Cependant, sur le plan des interactions biogéochimiques avec le sol, les racines ne font pas qu'absorber des nutriments. Nous allons voir que leur fonction d'excrétion est déterminante pour augmenter le stock de nutriments disponibles. En effet, le réservoir contenant le plus de nutriments dans les sols correspond aux éléments encore constitutifs des minéraux du sol et de la matière organique, non mobilisables par le seul jeu de la diffusion. Nous allons voir comment la libération de composés organiques et/ou de protons par la racine, modifie les équilibres dans la rhizosphère et engendre notamment des processus d'hydrolyse ou de dissolution permettant la libération des éléments non immédiatement accessibles du sol (Figure 4, gauche). Outre l'effet direct des composés excrétés sur la libération de ces nutriments du sol, nous allons voir que la fonction d'excrétion participe également à promouvoir un environnement rhizosphérique favorable à l'acquisition par (i) des processus de protection et (ii) en promouvant une communauté microbienne, notamment bactérienne et fongique, collaborative.

A. Le rôle central du pH dans la libération des éléments non disponibles

a. La racine peut agir sur le pH rhizosphérique

Il a été constaté depuis longtemps que la racine pouvait induire une modification très significative (jusqu'à 3 unités) du pH dans la rhizosphère (Marschner 1986a), en milieu contrôlé, mais aussi *in situ*, pour différentes espèces de plantes et différentes méthodes de mesures (Bravin et al. 2012, Blossfeld et al. 2013, Turpault et al. 2007, Rudolph et al. 2013, Jun-Xing et al. 2012). Ces modifications de pH sont principalement dues à l'excrétion de protons (H_30^+) ou d'ions hydroxyles (OH^-) par les racines afin de maintenir l'électro-neutralité dans le milieu intracellulaire suite à un prélèvement excédentaire de cations ou d'anions, respectivement (Marschner 1995, Hinsinger et al. 2003). La variation de pH rhizosphérique est ainsi liée au bilan d'absorption des cations (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+, Na^+ et NH_4^+) et anions (NO_3^-, H_2PO^{4-}, Cl^-, SO_4^{2-}) majeurs. La forme sous laquelle l'azote est assimilé par la plante (ion ammonium NH_4^+ ou nitrate NO_3^-) semble être un paramètre particulièrement déterminant. Une expérimentation menée en 1971 sur une culture de soja en sol fertilisé par NO_3^- ou NH_4^+ met en effet en évidence une alcalinisation dans le premier cas et une acidification dans le second (Riley et Barber, 1971). L'absorption de NH_4^+ est contre-balancée par un rejet de protons (H_30^+) par la racine conduisant ainsi à une diminution du pH rhizosphérique. Au contraire, l'absorption de l'azote sous sa forme de NO_3^- est accompagnée par une excrétion compensatrice d'ions hydroxyles (OH^-), conduisant ainsi à une augmentation du pH rhizosphérique. Il a été montré que d'autres facteurs, tels l'exsudation

d'anions organiques, la respiration et les phénomènes d'oxydo-réduction peuvent également jouer un rôle dans la modification du pH rhizosphérique (Hinsinger 1998, Hinsinger et al. 2003). Les différences de pH entre le sol non rhizosphérique et le sol rhizosphérique peuvent représenter jusqu'à plusieurs unités, notamment en pH alcalin (Bravin et al. 2012). *Nous verrons dans le second chapitre les limites de l'utilisation de l'unité pH pour l'estimation des variations de l'acidité du sol : une variation de +1 unité pH ne mobilisant par exemple pas la même quantité d'ion H_30^+ selon que l'on est en pH plutôt acide ou basique.*

b. *Un changement de pH peut promouvoir l'altération de minéraux contenant des nutriments*

La dissolution de minéraux peut être améliorée par des changements de pH dans la rhizosphère (Marschner, 1995). Dans le cas d'une acidification, l'hydrolyse des minéraux peut conduire à la libération accrue d'éléments nutritifs. On définit de manière générale l'hydrolyse comme le processus par lequel un cation d'un minéral est remplacé par un proton d'une solution acide, modifiant la composition chimique du minéral et perturbant ainsi sa structure atomique. En fonction de son intensité, cette réaction a pour conséquence de détruire le minéral (mise en solution complète) ou de le convertir en une nouvelle entité minérale. Les solutions acides peuvent ainsi agir sur l'altération des différents types de roches et minéraux, carbonatés ou silicatés, ainsi que phosphatés.

- Altération des racines *vs* altération globale

Avant de voir l'impact des excrétions racinaires sur l'altération des minéraux du sol, il faut être conscient que les racines vont agir à une très petite échelle sur un sol ayant déjà subi une altération globale à partir d'une roche mère donnée (magmatique, métamorphique ou sédimentaire). Cette altération engendrée par le climat au cours d'échelles de temps plus ou moins longues a déterminé la constitution minéralogique du sol sur lequel la plante se développe. Concernant l'altération des minéraux silicatés, sous climat tempéré, celle-ci est modérée et l'hydrolyse ne conduit qu'à un lessivage partiel de la silice et des cations (bisiallitisation) ce qui aboutit à la formation de minéraux argileux (silicates en feuillets) de type 2:1 (ex : mica-illite et smectites/vermiculites). Lorsque l'altération est plus poussée, l'hydrolyse conduit à un lessivage total des cations et une perte importante de silice (monosiallitisation) ce qui conduit à la formation des minéraux argileux de type 1:1 (kaolinite) i.e. sans cations dans l'espace interfoliaire. Enfin, lorsque l'altération est très poussée, en climat tropical humide par exemple, l'hydrolyse est totale (allitisation). L'allitisation provoque le lessivage du reste des cations majeurs et de la silice mobile et conduit à la précipitation d'oxydes métalliques (ex : gibbsite = oxyde d'aluminium, goethite = oxyde de fer,…).

L'action racinaire ne conduira donc pas à la formation du même type d'argile ou d'oxyde, ni à la libération des mêmes cations nutritifs en fonction de la minéralogie à laquelle elle a accès. Contrairement au processus de diffusion, on parle ici de processus internes et non réversibles.

- Sécrétion de protons et mobilisation d'éléments nutritifs structurels

Nous avons évoqué à la fin de la partie 1 de ce chapitre le cas de la libération de Mg couplée à celle de de K lors de la transformation irréversible d'un mica trioctaédrique (phlogopite) en vermiculite dans la rhizosphère du colza (Hinsinger et al. 1993). Les auteurs expliquent qu'une excrétion de protons par les racines aurait conduit à la dissolution par hydrolyse acide d'une partie du réseau cristallin de la phlogopite. La perte de K dans la couche interfoliaire aurait alors été compensée par des cations structurels du feuillet, en particulier Al et Mg. L'essentiel de ces cations, initialement structurels, serait donc restés en position interfoliaire, en tant que cations échangeables, ou en tant qu'hydroxy-aluminium précipité dans le cas de Al. Cependant, une partie du Mg structurel ne serait pas resté en position interfoliaire mais aurait diffusée dans la solution de sol et aurait ainsi pu être prélevé par les racines, comme en a témoigné l'analyse de la plante. Cette capacité à mobiliser les cations structurels des minéraux concerne une large variété de plantes et de minéraux. Le K structurel du granit a par exemple également pu être mobilisé par des racines de trèfle et de ray-grass (Coroneos et al. 1996), tandis que le Ca inclus dans des plagioclases a été mobilisé par des racines de pin et de douglas (Bakker et al. 2004).

La dynamique des diverses formes inorganiques de P dans le sol est également fortement dépendante du pH. Par exemple, l'hydroxyapatite ($Ca_5(PO_4)_3OH$) est un minéral particulièrement intéressant pour la nutrition, pouvant libérer du P sous forme $H_2PO_4^-$ lorsque l'équilibre : $Ca_5(PO_4)_3OH + 7H_3O+ \rightarrow 5Ca_2^+ + 3H_2PO_4^- + 8H_2O$ est déplacé sous l'action racinaire, par l'excrétion de protons et/ou par le prélèvement de Ca (Kirk et Nye 1986, Hinsinger et Gilkes 1997). Ainsi, la capacité des plantes à utiliser le P apporté sous forme de roches phosphatées dépend en partie de leur aptitude à excréter des protons. L'excrétion de protons a également été identifiée comme une stratégie adaptative à la carence en Fe (Marschner et al. 1986b). Il est reconnu, de manière générale, que l'acidification augmente la disponibilité des micronutriments (Rengel 2015), notamment grâce à l'augmentation de la solubilité des oxyhydroxides. Une source d'acidité pour la rhizosphère, autre que les protons, sont les anions organiques. Il s'agit d'un type parmi les nombreuses substances organiques pouvant être sécrétées par les racines par le mécanisme de rhizodéposition que nous verrons dans la partie 2B de ce chapitre.

- L'acidification : une solution parfaite ?

Risques de toxicité : L'action des protons sur les minéraux permet la libération d'éléments nutritifs pour les plantes. Cependant, l'altération par hydrolyse acide conduit également à la libération de composés toxiques pour les plantes, comme par exemple l'aluminium, élément abondant des minéraux silicatés. La toxicité aluminique a été particulièrement étudiée et il a été constaté une corrélation forte entre la diminution du pH en solution et l'augmentation de la concentration en Al^{3+}. Or Al^{3+} est un élément hautement rhizotoxique pouvant entrainer l'inhibition de la croissance des racines (Brunner et Sperisen 2013). Le cuivre, qui est un oligoélément, peut également s'avérer toxique lorsqu'il est absorbé en trop grande quantité par les plantes. Sa spéciation dans le sol dépend fortement du pH et une acidification est corrélée à une augmentation de la forme de Cu disponible pour les plantes (Bravin et al. 2012).

Pas toujours le plus efficace pour l'acquisition : Nous avons vu que l'acidification, risquée soit elle, permettait de mobiliser des éléments nutritifs et notamment le P. Cependant, l'amélioration de l'acquisition de P dépend des formes dominantes du P inorganique dans le sol (Gahoonia et al. 92). Ainsi, une alcalinisation est parfois plus appropriée. Par exemple, en sol acide, les ions phosphate sont fortement adsorbés sur les oxyhydroxides de Fe et d'aluminium et un simple échange ionique ne suffit pas à les libérer. La désorption de ces ions phosphates implique des échanges de ligands. Or les ions hydroxyles (ou bicarbonate) sécrétés par les racines dans le cas d'une alcalinisation de la rhizosphère, contribuent à la désorption des ions phosphates par échanges de ligands (Gahoonia et al. 92).

Ainsi la racine doit trouver un compromis. Marschner écrit en 1995 que les racines ne devraient pas acidifier leur rhizosphère lorsqu'elles se développent sur des sols déjà acides pour prévenir les risques de toxicité de Al ou même des protons eux-mêmes. Ainsi certaines plantes poussant, naturellement sur des sols acides ont développé une stratégie d'alcalinisation de leur rhizosphère comme c'est le cas du blé dur (Bravin et al. 2009). Certaines plantes sont également capables de s'adapter au sol, alcalinisant sur sol acide et acidifiant sur sol neutre à alcalin. Ainsi, dans une expérience réalisée en 2002, des racines de tomates et de colza acidifiaient leur rhizosphère dans un sol calcaire alors que celles-ci induisaient une alcalinisation en présence d'un sol acide (Chaignon et al. 2002). Pourtant, il a été rapporté que certaines plantes se développant sur des sols acides acidifient encore plus leur rhizosphère sans présenter de symptômes de toxicité aluminique, c'est le cas par exemple du pin (Turpault et al. 2007). Nous allons voir que la racine met en place des mécanismes de sécrétion de composés organiques pour pallier ces risques de toxicité. Ces sécrétions font partie d'un processus plus large appelé la rhizodéposition, qui intervient également dans le « mining », le « foraging » et la promotion de partenaires rhizosphériques.

B. La rhizodéposition : rôles directs et indirects dans l'acquisition des nutriments

Brimecombe et al. (2007) ont estimé par une expérience de marquage au ^{14}C, que 12 à 40% de la quantité totale des carbohydrates produits par photosynthèse étaient libérés dans la rhizosphère, sous forme organique et sous forme inorganique (HCO_3^-, CO_2). Les formes organiques sont de loin les plus variées et celles qui peuvent avoir la plus grande influence sur les processus biochimiques et l'écologie microbienne de la rhizosphère (Jones et al. 2009). L'ensemble des sources de C libérées par les racines dans la rhizosphère sont appelées rhizodépôts. Ils incluent les **exsudats racinaires** (« Exudates »), le mucilage (« Mucilage »), les **cellules desquamées**, de la coiffe majoritairement (« Sloughed off root cell ») et les **lysats** (« Lysates ») des cellules épidermiques (Figure 3, d'après Dennis et al. 2010). On peut noter également qu'une partie du C est libéré par respiration racinaire sous forme de CO_2. Certains de ces composés ont un rôle direct dans la nutrition, mais l'essentiel a pour rôle de créer un environnement rhizosphérique favorable à l'acquisition sans y participer de manière directe, via la stimulation des activités microbiennes. La rhizodéposition a ainsi un rôle dans la protection des racines et plus généralement de la santé et de la croissance de la plante, via la promotion de communautés bactériennes et fongiques bénéfiques.

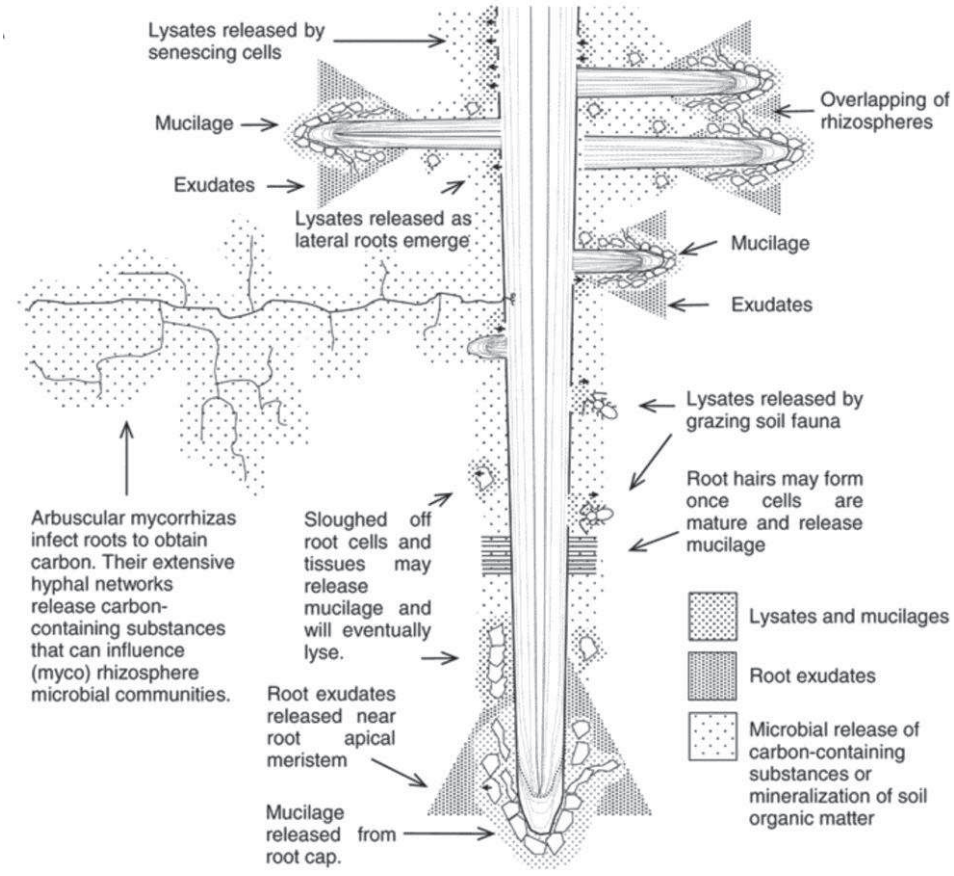


Figure 3. Représentaton des diverses origines des composés rhizodéposés par les racines fines (Dennis et al. 2010)

La rhizodéposition peut être un processus de sécrétion actif ou alors une libération passive liée (i) à des différences osmotiques entre la solution du sol et les compartiments intra-cellulaires ou simplement liée (ii) à la mort cellulaire, comme c'est le cas lors de l'autolyse des cellules épidermiques. Les composés organiques rhizodéposés sont divisés généralement en deux catégories, en fonction de leur poids moléculaires. **Les composés à poids moléculaire élevé** sont des molécules complexes qui ne sont pas facilement utilisables par les microorganismes ; c'est le cas par exemple du mucilage. Si cette première catégorie constitue la majorité du C libéré par la racine, ce sont **les composés de faible poids moléculaire** qui sont les plus diversifiés et qui présentent le plus large éventail de fonctions connues ou potentielles. On y compte notamment des sucres, des acides organiques (carboxyliques notamment), des acides aminés, des protéines, des composés phénoliques et d'autres métabolites secondaires facilement utilisables par les microorganismes.

a. Exsudats et action directe sur le « mining » et le « foraging »

Action sur le « mining ». Une expérience réalisée en 1983 sur le lupin blanc a montré que la quantité de citrate excrétée par les racines en cas de carence en P représentait 12% du poids sec de la plante entière (Gardner et al. 1983). Un constat commun à de nombreuses espèces végétales est en effet l'exsudation de composés organiques à faible poids moléculaire en réponse à une carence en nutriment. Quel est l'impact de ce mécanisme, particulièrement coûteux pour la plante, sur la disponibilité du nutriment concerné ? La réponse dépend des cas et plusieurs exemples sont indiqués ci-après. **1. Une action des acides organiques similaires à celles des protons.** Hoffland en 1992 a montré en effet que le prélèvement de P inorganique contenu dans les roches phosphatées par les racines de colza augmentait grâce à l'acidification du milieu, acidification en partie causée par l'exsudation des acides citrique et malique. **2. En agissant comme ligands d'échange de l'élément ciblé**. Le pois d'Angole est reconnu plus efficace dans l'utilisation du phosphore sous forme de phosphate de fer ($FePO_4$) que d'autres légumineuses ou céréales. Ceci s'expliquerait par sa capacité à exsuder de l'acide piscidique en réponse à une carence en phosphore. Il s'agit cette fois d'un composé phénolique (les acides citrique et malique étant des acides carboxyliques), capable de se substituer aux ions phosphates en se complexant au fer, et en rendant ainsi le P disponible (Ae et al. 1990). **3. En chélatant et transportant directement l'élément ciblé.** Deux stratégies existent chez les plantes pour le prélèvement de Fe (Marschner et al. 1986b). Chez les plantes de stratégie II (poacées), la carence en Fe déclenche la libération de phytosidérophores tels que l'acide muginéique qui est un acide aminé à très haute affinité pour Fe pouvant ainsi le chélater pour ensuite faciliter son transfert vers la surface de la racine par diffusion. La membrane de ces plantes de stratégie II est équipée de transporteurs spécifiques permettant l'entrée du Fe chélaté par le phytosidérophore, alors sous forme oxydée, dans les cellules. **4. En catalysant des réactions de réduction ou de minéralisation.** Chez toutes les autres

plantes (stratégie I), le fer doit être réduit avant son entrée dans les cellules racinaires. Une enzyme particulière est alors produite par les racines (une réductase ferrique) permettant de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+}, ce dernier pouvant être pris en charge par un transporteur membranaire divalent spécifique (Iron-Regulated Transporter IRT) tandis que la plante induit également une libération de protons dans la zone sub-apicale des racines (Robinson et al. 1999). Autre enzyme particulièrement importante, la phosphatase, joue le rôle de catalyseur dans la minéralisation du P organique aboutissant à la production d'ions phosphates, seule forme utilisable par la plante (Hinsinger 2001 Hinsinger et al. 2007).

Action sur le « foraging ». L'extrémité des racines est soumise à une très forte pression lors de la croissance racinaire. Afin de faciliter la progression tout en assurant la protection de l'apex, les cellules de la coiffe sont programmées pour être détachées et remplacées au fur et à mesure de la croissance (Hawes et al. 2000). Entre 1400 et 3200 de ces cellules sont ainsi libérés dans la rhizosphère par jour pour une racine de maïs (Iijima et al. 2008). Les cellules de la coiffe sont également programmées pour sécréter un mucilage, formé de composés organiques de poids moléculaire élevé, visqueux, insoluble, et riche en polysaccharides, qui joue sur les propriétés biophysiques de la rhizosphère. Fait intéressant, les cellules de la coiffe restent capables d'assurer cette fonction d'excrétion encore plusieurs jours après leur séparation de la racine (Hawes et al. 2000). Il a été montré que ces processus biophysiques jouent un rôle essentiel dans la progression des racines dans le sol et, donc, *in fine*, dans la stratégie de foraging.

b. Rhizodéposition et protection

La rhizodeposition intervient à de nombreux niveaux concernant la protection des racines (Huang et al. 2014), comme c'est illustré ci-après au travers de plusieurs exemples. **1. Protection contre les éléments toxiques par excrétion de composés chélatants ou complexants.** Nous avons vu que les actions des racines pour augmenter la disponibilité des nutriments pouvaient également augmenter la disponibilité des éléments toxiques, comme par exemple Al^{3+} en cas d'acidification ou dans des sols naturellement acides (pH<5). Dans une expérience réalisée en 1991 (Miyasaka et al.), deux variétés de haricots, l'une Al-tolérante et la seconde Al-sensible, ont été cultivées en hydroponie avec et sans Al. Les racines de la variété Al-tolérante ont exsudé du citrate dans la rhizosphère à une concentration 70 fois supérieure lorsqu'elles étaient exposées à Al, alors qu'une différence négligeable a été observée dans le cas de la variété Al-sensible. Cette expérience a été la première illustration de l'exsudation de composés organiques complexants en réponse à une augmentation de la concentration en Al dans l'environnement des racines d'une plante Al-tolérante. Ikka et al. (2013) ont montré que certaines plantes tolérantes à Al (*Eucalyptus camaldulensis*) n'exsudent pas de citrate mais augmentent sa concentration au sein du milieu cellulaire en diminuant l'activité de l'enzyme responsable de sa

dégradation. La racine autorise alors la pénétration de Al^{3+} dans le milieu racinaire où elle le détoxifie ensuite, comme en a témoigné la présence de complexes Al-citrate dans le cytosol des racines, lors de cette expérience. On parle de mécanisme de tolérance alors que la première expérience citée fait référence au mécanisme dit d'exclusion (Brunner et Sperisen 2013). **2. Protection contre la dessiccation.** L'exsudation du mucilage par les cellules de la coiffe et de l'épiderme (matériel aux propriétés d'un gel hydrophile) permet de former un pont hydraulique entre la racine et les particules de sol grâce à sa capacité de rétention de l'eau. La surface de la racine reste alors toujours en contact avec la solution de sol malgré la diminution de la quantité d'eau engendrée par le prélèvement (Hawes et al. 2000). **3. Protection contre les pathogènes.** Les stilbènes sont des hydrocarbures aromatiques produits par les plantes et connus pour leur propriétés antimicrobiennes, intervenant dans plusieurs organes notamment de l'arachide en réponse à une exposition à des pathogènes. Or un dérivé de stilbène a été isolé dans le mucilage de l'arachide à une concentration de 250 µg g^{-1} (poids humide) suggérant le rôle du mucilage également dans la régulation des interactions entre les racines et les agents pathogènes du milieu rhizosphérique (Sobolev et al. 2006).

c. Rhizodéposition et recrutement de partenaires rhizosphériques

Il est souvent dit que l'on trouve dans un gramme de sol, plus d'organismes vivants qu'il y a d'Hommes sur Terre. Et bien la quantité de microorganismes dans la rhizosphère est encore au moins 100 fois plus élevée (van Loon 2007), notamment dans les 10 premiers micromètres où la population peut atteindre jusqu'à 10^{12} cellules microbiennes par gramme de sol (Gray et Smith 2005). La rhizosphère représente en effet une niche écologique favorable pour les microorganismes du sol, notamment grâce aux substrats nutritifs et énergétiques fournis par la rhizodéposition. La quantité d'espèces présentes peut cependant varier considérablement, de quelques milliers à plusieurs millions (Nihorember et al. 2011). La communauté microbienne pourrait en effet se façonner en coévolution avec la plante (Morrissey et al. 2004), notamment en fonction de la composition des exsudats racinaires (Carvalhais et al. 2013). La communauté microbienne de la rhizosphère est composée principalement de bactéries (et archées), de champignons, de protozoaires, de nématodes, et éventuellement de microarthropodes et d'algues. Ces microorganismes entrent en compétition, entre eux mais également avec la racine, pour l'espace, l'eau et les nutriments. Si certains adoptent une attitude compétitive pathogène envers la plante, d'autres vont améliorer leur compétitivité en s'associant à la racine, devenant des partenaires potentiels très intéressant pour la plante… encore faut-il les trouver ! La racine peut agir pour la promotion des rencontres et interactions avec ces partenaires, par le biais des molécules de signalisation (Carvalhais et al. 2013). De nombreux processus ont été identifiés, dépendant du partenaire ciblé et de la plante. Un dialogue racine-bactérie particulièrement élaboré a par exemple été identifié dans l'établissement de la symbiose entre les rhizobia et les racines des

légumineuses. Cette symbiose (nous le verrons dans la partie 4B) aboutit à la formation de nodosités racinaires, structures spécialisées dans la fixation de l'azote (N_2). La plante initie le dialogue en libérant un signal chimique (flavonoïde) lorsqu'elle est en situation de carence en N ; celui-ci induit chez rhizobia l'activation des gènes de nodulation (gènes nod). Ces gènes codent pour des molécules servant de réponse chimique à la plante (lipochitooligosaccharide) connue sous le nom de facteurs Nod. Ces facteurs Nod déclenchent chez la racine une cascade de processus de développement qui permettent l'invasion des bactéries et la formation de la nodosité dans laquelle les bactéries seront finalement logées (Ferguson et Mathesius 2014) et réaliseront la fixation symbiotique de N_2 atmosphérique. Les hyphes des champignons mycorhiziens peuvent elles aussi envoyer des signaux chimiques à la plante, favorisant notamment la ramification racinaire, dans le but d'augmenter la probabilité d'interception avec les hyphes fongiques (Bonfante et Requena 2011, Schmitz et Harrison 2014), tandis que la racine produit des strigolactones qui stimulent la germination des spores de champignons mycorhiziens à cette même fin. La plante peut également attirer des partenaires non-symbiotiques ; l'excrétion d'acide malique par la plante joue par exemple un rôle dans le recrutement de « PGPR », bactéries stimulant la croissance racinaire (Yuan et al. 2015). On note que le pH impacte également la régulation des bactéries rhizosphériques, ainsi que l'efficacité des associations plante-microorganismes (Grove et al. 1996).

L'action de rhizodéposition chez la racine a donc un effet direct sur l'acquisition racinaire, notamment sur le « mining », en rendant accessible une partie des nutriments piégés dans la structure interne des minéraux du sol et de la matière organique. D'autre part la rhizodéposition est une stratégie essentielle dans la protection des racines contre des stress biotiques et abiotiques. Nous avons également vu que la plante investissait dans le recrutement de partenaires symbiotiques et non symbiotiques. Nous allons voir l'intérêt de ces associations pour la nutrition et la santé de la plante.

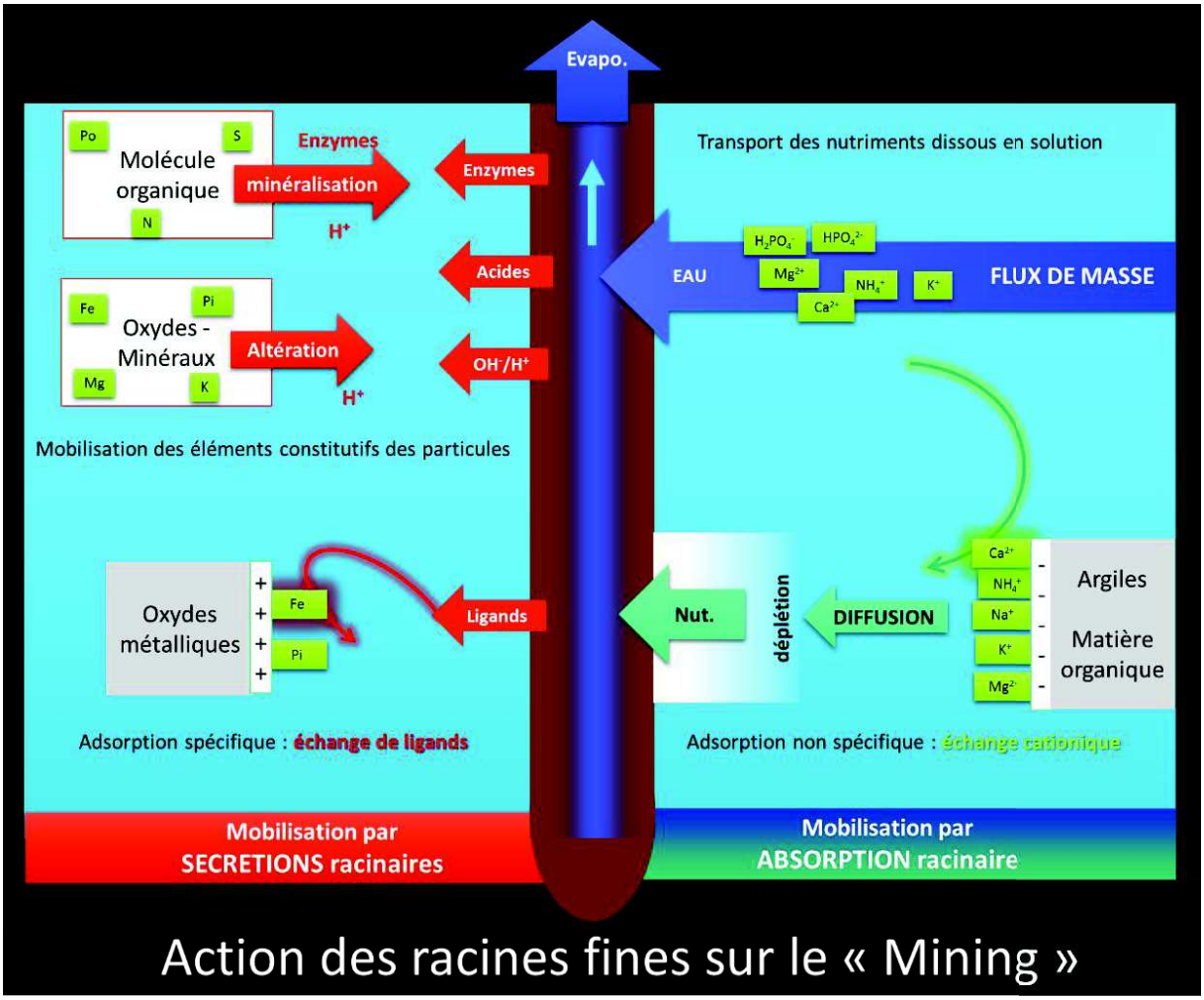


Figure 4: Représentation conceptuelle des actions racinaires permettant la mobilisation des nutriments de la rhizosphère. Droite : mobilisation par absorption (flux de masse et diffusion). Gauche: mobilisation par secrétions (minéralisation, altération, échange de ligands).

IV. LES ALLIES DES RACINES FINES

Les interactions entre les plantes et les microorganismes partenaires ont de nombreux effets bénéfiques sur l'acquisition des nutriments, en agissant sur l'exploration (foraging) et/ou l'exploitation (mining). Ces interactions ont également des effets positifs sur la santé de la plante en augmentant son immunité face aux stress abiotiques (Yang et al. 2009) et biotiques (Zamioudis et Pieterse 2012). On distingue les partenaires agissant sans symbiose et ceux pour qui l'établissement d'une symbiose et en conséquence d'un lien physique étroit doit être créé avec la racine. Les deux associations symbiotiques les plus documentées sont (i) l'association entre les bactéries du genre Rhizobium et les racines des plantes légumineuses (fabacées) formant des structures, les nodosités, permettant de fixer l'azote atmosphérique, et (ii) l'association entre les racines et les champignons mycorhiziens. La symbiose avec rhizobia est une stratégie développée assez récemment dans l'évolution, il y a 60 Ma (Sprent 2007) qui concerne uniquement les fabacées qui représentent moins de 5% des espèces végétales qui couvrent le globe terrestre. En revanche, 80% des espèces végétales seraient concernées par la symbiose mycorhizienne. Il s'agit d'une stratégie apparue au tout début de l'évolution des plantes terrestres (il y a environ 450 Ma), ce qui pourrait expliquer son omniprésence aujourd'hui dans le règne végétal.

A. Actions des mycorhizes

Il existe deux grandes catégories d'associations mycorhiziennes qui se différencient par leur interface physique avec la plante, les ectomycorhizes (EM) et les endomycorhizes (Figure 5). Trois structures caractérisent les EM : le manteau, le réseau de Hartig et les hyphes extracellulaires. Le mycélium des champignons ectomycorhiziens forme un manteau dense qui recouvre l'apex des racines et à partir duquel des hyphes vont se développer au sein de l'espace intercellulaire du cortex, sans pénétrer cependant les parois des cellules, pour former le réseau de Hartig par lequel les transferts plante-champignon ont lieu. Le mycélium externe, partant du manteau, peut être formé d'hyphes seuls ou regroupées au sein de gaines : les rhizomorphes. Dans le cas des endomycorhizes, les hyphes ne forment pas de manteau et pénètrent la paroi des cellules du cortex pour former une structure ramifiée appelée arbuscules, qui reste cependant séparé du cytoplasme par la membrane plasmique. Comme pour les EM, les endomycorhizes développent un mycélium extracellulaire permettant d'aller explorer le sol. Il en existe différents types mais les plus répandues sont appelées simplement endomycorhizes à arbuscules (AM). Les AM sont la forme la plus répandue, toutes mycorhizes confondues, en raison d'une large diversité génétique permettant de s'adapter à un nombre important d'hôtes : environ 300 espèces de champignons formant des AM pour 400000 espèces de plantes qui vivent sur Terre (Garbaye 2013). Les champignons formant des EM ciblent, quant à eux, en particulier les espèces ligneuses. Contrairement aux ectomycorhiziens, les champignons endomycorhiziens sont

des symbiontes obligatoires, ils ne peuvent se développer sans l'association symbiotique avec la racine, ce qui a d'ailleurs pour conséquence de compliquer leur étude, ne pouvant être cultivés indépendamment de leurs hôtes.

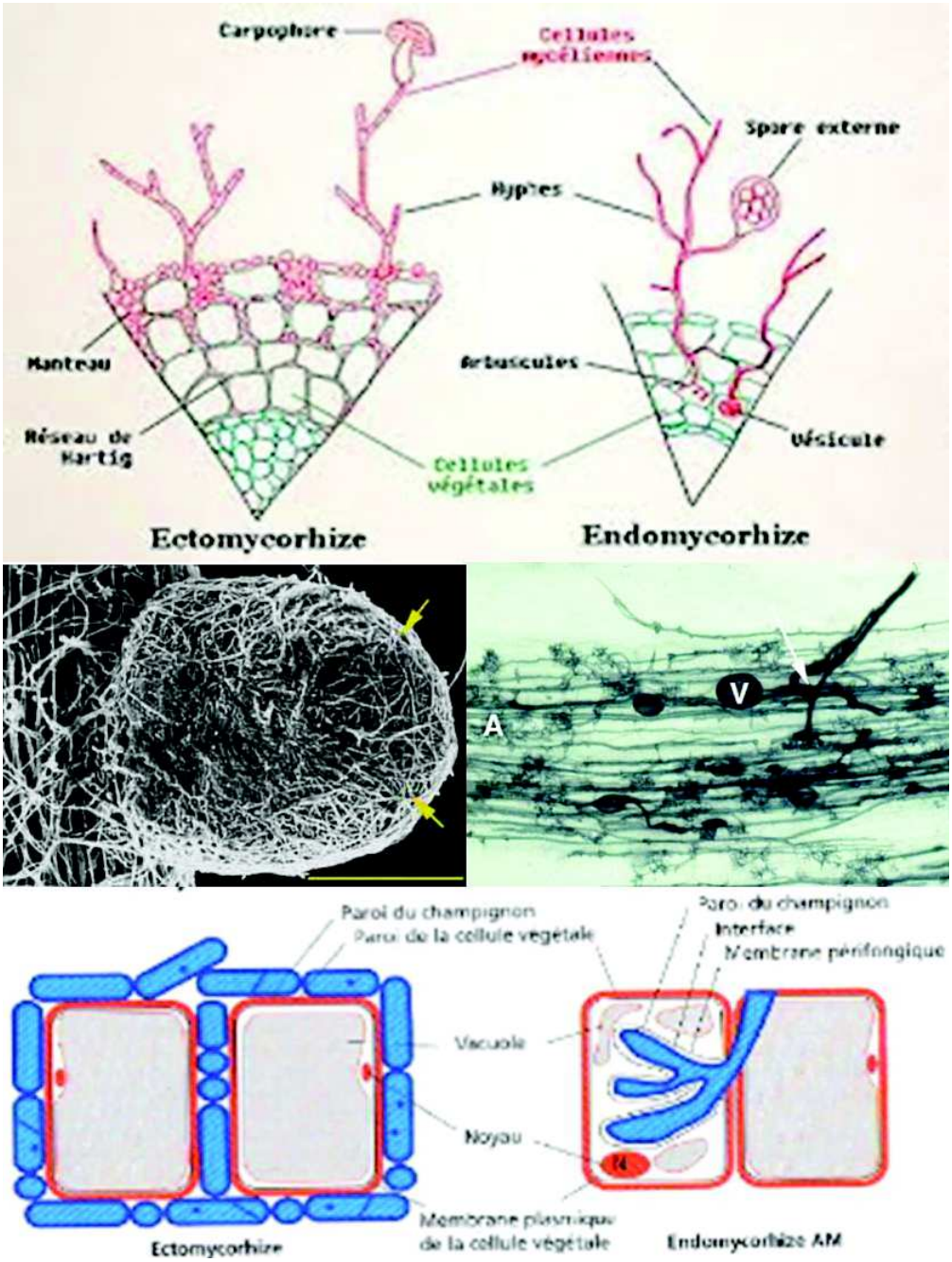


Figure 5. Haut : comparaison de l'interface champignon/racine dans le cas des associations ectomycorhizienne et endomycorhizienne (source inconnue). Milieu gauche : image obtenue au microscope électronique à balayage d'une racine de pin colonisée par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. Les hyphes ont formés un manteau dense autour de la racine. Scale Bar = 100 µm. Photo of Yves Piché & Larry Peterson (http://mycorrhizas.info/ecm.html). Milieu droit : Racine colonisé par un champignon endomycorhizien (*Glomus* sp.). V pour vesicules et A pour arbuscules. Image obtenue au microscope. http://mycorrhizas.info/vam.html. Bas, zoom sur l'interface champignon/racine au niveau des cellules épidermique et corticales de la racine. Le champignon ectomycorhizien ne pénètre pas la paroi cellulaire contrairement au champignon endomycorizien (ce dernier ne pénètre cependant pas le cytoplasme cellulaire). http://mycorrhizas.info/root.html.

a. Les contrats de la symbiose mycorhizienne

La symbiose est par définition une association durable entre deux ou plusieurs organismes et profitable à chacun d'eux. Nous allons donc voir quels sont les termes de cette association champignon-plante.

Constat 1 : les hyphes des mycorhizes sont capables de transférer l'eau du sol à la plante. Khalvati et al. en 2005 ont réalisé une quantification de la contribution des hyphes dans le prélèvement de l'eau chez l'orge en symbiose avec un champignon AM, en condition de stress hydrique. Ils ont pour cela réalisé des cultures en rhizobox comportant un compartiment « racinaire + hyphes » et un compartiment « hyphes seules ». Il s'avère que 4% de l'eau du compartiment « hyphes seules » a été transféré vers le compartiment racines. Les auteurs soulignent la sous-estimation de la contribution des hyphes dans le prélèvement de l'eau en raison du nombre très important d'hyphes dans le compartiment racine. Quoi qu'il en soit, les hyphes permettent le transfert de l'eau du sol vers la racine en condition de stress hydrique.

Constat 2 : les hyphes des mycorhizes sont capables de transférer les nutriments du sol à la plante. Une étude réalisée en 2002 par Plassard et son équipe sur des racines de pins associées à deux espèces ectomycorhiziennes différentes a montré que la symbiose (i) est capable de modifier les flux d'ions entrants et sortant des racines (estimations des flux à l'aide de microélectrodes) et (ii) que l'efficacité de l'association dépend du couple « plante-champignon ». Alors que l'association avec *R. roseolus* augmente radicalement les flux entrant de K^+ et NO_3^- vers l'extrémité de la racine, l'association avec *H. cylindrosporum* n'a que peu d'influence sur K^+ et diminue le flux entrant de NO_3^- (Plassard et al. 2002).

Constat 3 : la plante transfère du carbone d'origine photosynthétique au champignon. En échange de l'acquisition des éléments nutritifs et de l'eau, le champignon reçoit du carbone photosynthétisé par la plante sous forme de carbohydrates, comme l'ont mis en évidence des expériences de marquage au ^{13}C du CO_2 photosynthétisé par les plantes (Gavito et Olsson 2003).

b. Les mycorhizes et le foraging

Une des raisons pour laquelle la plante investit dans l'association mycorhizienne est son impact sur le volume de sol prospecté et sur la finesse de cette prospection. En effet les hyphes ne mesurant en moyenne que 2 à 4 micromètres de diamètre, elles peuvent atteindre des pores plus fins du sol, inaccessibles même pour les poils racinaires dont le diamètre est 5 fois plus gros (Mengel et kirkby 1987). On peut noter que pour les EM, il existe différents types d'exploration (Agerer 2001) : le « short-distance exploration type » est caractérisé par un manteau épais duquel seulement quelques hyphes émanent (ex : *Cenococcum*) alors que le « medium and long-distance exploration type » sont caractérisés par la formation de rhizomorphes.

La plante cède une part du carbone d'origine photosynthétique à son champignon symbionte ; cependant ce carbone est en partie directement alloué à l'expansion des hyphes mycorhiziennes et donc à l'activité de « foraging ». Cette part allouée au foraging dépend, entre autres, de facteurs abiotiques, notamment des ressources nutritives du sol. L'allocation du carbone d'origine photosynthétique à l'activité d'exploration d'un AM en symbiose avec le Plantain a été étudiée par marquage au ^{13}C du CO_2 utilisé par la plante pour la photosynthèse. Un rhizobox particulier a été utilisé comportant un compartiment central « racines » et deux compartiments latéraux dans lesquelles seuls les hyphes peuvent pénétrer, l'un a reçu une fertilisation, l'autre non. L'expérience a montré que le champignon investit dans l'exploration (croissance des hyphes) dans le compartiment fertilisé alors que son extension est limitée dans le compartiment sans fertilisation dans lequel le C photosynthétique est majoritairement alloué au stockage (Gavito et Olsson 2003).

c. Les ectomycorhizes et le « mining »

Contrairement aux endomycorhizes, les ectomycorhizes ont, comme les racines fines, une action d'absorption mais également de sécrétion, elles peuvent donc agir sur le « mining ». A l'aide de microélectrodes Casarin et al. (2003) ont testé la capacité (1) de modification du pH et (2) d'exsudation de l'oxalate de deux espèces ectomycorhiziennes en association avec *Pinus pinaster* et alimenté par une source de nitrate. Alors que *R. roseolus* a libéré simultanément des protons et de l'oxalate, *H. cylindrosporum* n'a pas excrété d'oxalate et a plutôt eu tendance à alcaliniser le sol rhizosphérique (Casarin et al. 2003). Cette expérience démontre que les ectomycorhizes sont capables, comme les racines fines, d'agir sur le pH rhizosphérique et d'exsuder des composés organiques complexants. L'expérience montre également que l'efficacité de la symbiose ne dépend pas seulement de l'hôte et des conditions édaphiques mais qu'elle est également étroitement lié à l'espèce ectomycorhizienne en présence. La libération d'oxalate et de protons par *R. roseolus*, dans cet exemple, pourrait contribuer à la mobilisation du P du sol. Des transporteurs phosphate spécifiques ont été identifiés sur certains champignons ectomycorhiziens laissant penser à leur rôle dans le transfert dans la plante, même si les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés (Becquer et al. 2014).

B. Actions des bactéries « PGPR »

L'ensemble des bactéries pouvant coloniser le système racinaire et promouvoir la croissance de la plante sont désignés sous l'appellation « PGPR » pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ». Elles regroupent les bactéries agissant de manière indirecte, en réduisant les effets négatifs d'organismes phytopathogènes, et les bactéries agissant de manière directe sur le « mining » et/ou le « foraging ». En ce sens, elles incluent les bactéries agissant dans le milieu rhizosphérique mais également celles logées au sein même des tissus racinaires (endophytes) ou des structures symbiotiques, comme par exemple les nodosités abritant les rhizobia dans les racines des fabacées.

a. *Exemples d'actions de « foraging »*

Certaines PGPR non symbiotiques peuvent avoir une action sur le volume de sol prospecté en (1) modulant les niveaux d'hormones de la plante pour stimuler la croissance racinaire ou (2) en diminuant les effets inhibiteurs de divers agents pathogènes sur la croissance, i.e. en induisant un biocontrôle (van Loon et al. 2007). Une expérience réalisée en 1993 a par exemple démontré que la sécrétion de l'auxine IAA (indole-3-acetic acid) par *Azospirillum brasilense* était responsable de l'action de cette bactérie sur la promotion de la croissance des racines de blé. L'inoculation des racines avec un mutant ayant perdu 70% de sa capacité à produire IAA a réduit de 30 à 40% le nombre de racines latérales et de 45 à 60% la longueur de ces racines latérales par rapport au témoin inoculé avec la souche sauvage ; la distribution des poils racinaires a également été affectée (Barbieri et Galli 1993).

b. *Exemples d'actions de « mining »*

Les PGPR peuvent agir sur le mining (1) en synthétisant un élément sous une forme disponible qu'elle fournit ensuite directement à la plante ou (2) en facilitant l'acquisition d'un nutriment de la rhizosphère. L'exemple de la symbiose entre rhizobia et les racines des légumineuses illustre bien ce premier point, mais il existe aussi des bactéries libres et endophytes qui peuvent fixer, certes en quantité moindre, de l'azote atmosphérique. A l'instar des bactéries du genre *Rhizobium*, elles sont capables de synthétiser de l'ammonium (NH_4^+), une forme d'azote utilisable par la plante, à partir de l'azote atmosphérique N_2. La symbiose établie au sein des nodosités avec l'espèce légumineuse, permet le transfert de cet ammonium vers la plante, qui pourra l'utiliser notamment pour la synthèse d'acides aminés. En échange, les bactéries Rhizobia en symbiose se développent en consommant les carbohydrates fournis par la plante hôte (Gray et Smith 2005). Nous allons illustrer le second point, la facilitation de l'acquisition d'un nutriment de la rhizosphère, en présentant deux cas de figure. Les bactéries, comme les racines fines, peuvent exsuder des acides organiques, des sidérophores,… qui vont avoir les mêmes types de conséquences que celles exposées dans la partie 3B dans le cas des racines fines (Gray et Smith 2005). Nous ne détaillerons donc pas ce point. En revanche un exemple intéressant d'action de « mining » de la bactérie, à son détriment cette fois, est lié à l'intervention d'autres organismes du sol, les nématodes : prédateurs des bactéries. Nous avons vu que P était l'un des éléments les plus difficile à prélever pour les racines et son chemin jusqu'à la plante est parfois long et mouvementé, comme l'a souligné la synthèse de Becquer et al. en 2014. Les phytates sont une des formes principales de P dans le sol. Or, certaines bactéries peuvent produire des phosphatases spécifiques et notamment des phytases permettant de dégrader ces phytates. Le P ainsi produit se retrouve alors au sein des bactéries. L'action de prédation des nématodes bactérivores sur ces bactéries, va provoquer la libération du P contenu dans la biomasse bactérienne et le rendre disponible pour les racines (Becquer et al. 2014). En ce sens, certains nématodes sont également des associés

importants des racines pour la nutrition, comme cela a aussi été illustré pour l'azote et dans le cas des protozoaires, autres prédateurs des bactéries du sol.

L'exemple de l'action combinée « bactéries-nématodes » dans la promotion de l'acquisition du P par la plante illustre la dimension de multi-trophique et complexe des interactions au sein de la rhizosphère. Ce ne sont en effet pas seulement les interactions entre un couple « plante-microorganisme » qui permettent la facilitation mais des interactions « microorganisme-microorganisme ou microorganisme-organisme de la microfaune » peuvent également s'avérer positives pour la plante. L'efficacité de nodulation de rhizobia et de la colonisation des champignons mycorhiziens serait par exemple accentuée par leur interaction avec une bactérie PGPR tierce (Tsigie et al. 2011). D'autre part, des interactions « plante-plante » positives peuvent également avoir lieu par l'intermédiaire d'un microorganisme du sol. Les plantes pourraient en effet partager/échanger des éléments nutritifs par l'intermédiaire d'un réseau mycorhizien commun (Selosse et al. 2006). Des transferts de N depuis une plante légumineuse tropicale vers une non-légumineuse via le mécanisme d'exsudation racinaire et par l'intermédiaire d'un réseau mycélien commun a également été documentée (Jalonen et al. en 2009).

CONCLUSION

L'objectif final du fonctionnement des racines fines est de fournir la plante en eau et nutriments nécessaires à son métabolisme et à son développement. Pour aboutir à cet objectif la racine déploie des actions qui constituent ses différents rôles fonctionnels. L'action d'absorption a été présentée dans la partie II de cette synthèse (« Absorption et mobilisations des ressources facilement disponibles »). Le flux de masse, absorption de l'eau par les racines en réponse à l'évapotranspiration, permet le transport des nutriments présents dans la solution du sol jusqu'à la surface racinaire. En effet, les racines fines sont physiologiquement adaptées pour absorber les nutriments présents à l'état dissous dans la solution de sol directement au contact de la surface racinaire. Cependant, la très grande majorité des nutriments se trouvent dans d'autres réservoirs du sol, et ne sont donc pas mobilisables par le flux de masse. L'action d'absorption des nutriments permet de mobiliser de façon réversible un second réservoir constitué par les cations et anions adsorbés sur le complexe d'échange du sol, par force de diffusion. Cependant certains éléments, comme le phosphore, ne sont pas ou très peu mobilisables par la diffusion. D'autre part, les sols très altérés ou acides ont une capacité d'échange cationique faible et l'essentiel des nutriments se trouvent alors au sein même de la structure cristalline des minéraux ou en combinaison moléculaire au sein de la matière organique. La partie III de cette synthèse (« Sécrétions et mobilisation des ressources non disponibles ») a présenté l'action de

rhizodéposition des racines fines permettant de mobiliser, en partie, ce dernier réservoir. Les composées exsudés par la racine qu'ils soient de simples protons ou ions hydroxyles ou bien des molécules organiques complexes permettent en effet d'altérer efficacement et rapidement les particules de sol afin d'en libérer les éléments nutritifs. Les composés organiques libérés par la racine dans la rhizosphère par le phénomène de rhizodéposition permettent également de créer un hotspot d'activité microbienne. Plusieurs millions de microorganismes y vivent ainsi en étroite interaction (positive, neutre ou négative) avec la racine, lui fournissant des substrats nutritifs. Si certains de ces microorganismes peuvent être pathogènes, une petite proportion en revanche va pouvoir s'associer à la racine pour augmenter leur compétitivité. Les racines sont alors capables de contrôler la population des microorganismes de la rhizosphère et d'attirer spécifiquement ses partenaires, notamment symbiotiques, comme les bactéries du genre Rhizobium et les champignons mycorhiziens par exemple. La partie IV de la synthèse (« Les alliés des racines fines ») a présenté le rôle de ces microorganismes associés aux racines fines, dans l'acquisition des nutriments mais également dans la protection contre les facteurs biotiques et abiotiques. Une coévolution plante-microorganismes du sol parfois de plusieurs millions d'années fait aujourd'hui de certaines bactéries, nématodes ou champignons des alliés essentiels au fonctionnement racinaire. Nous avons présenté dans cette synthèse, par souci de compréhension, les mécanismes de flux de masse, de diffusion, d'altération, de rhizodéposition et d'actions des microorganismes successivement, mais il faut voir, que tous ces processus interviennent simultanément et s'influencent les uns les autres, aboutissant à une dynamique spatiale et temporelle particulièrement complexe. La rhizosphère est ainsi un monde très élaboré, dans lequel il est parfois difficile de distinguer qui fait quoi et qui influe sur quoi. Des milliers de petits phénomènes, créent des phénomènes plus généraux. Par exemple, il est très difficile de trancher sur l'origine microbienne ou racinaire de certains composés comme les phytates, potentiellement excrétés par les deux organismes.

Nous avons vu dans cette synthèse, focalisée en majorité sur la stratégie de « mining » des racines fines, que beaucoup de mécanismes s'établissent en réponse à des stress, biotique ou abiotiques, comme par exemple, une déficience en une ressource. Ceci montre bien que les racines savent réagir à court terme à ces stress, soit seules, soit en association, et que leur rôles fonctionnels évoluent largement en fonction des conditions du milieu. Dans la partie I de la synthèse (« Les racines fines : fonction d'absorption de l'eau et des nutriments »), lors de la présentation de la stratégie de « foraging », nous avons vu que les plantes pouvaient avoir des enracinements particulièrement profonds. Or les conditions abiotiques et biotiques en profondeur pourraient différer des conditions de surface, du fait du poids de la colonne de sol, de l'éloignement avec l'atmosphère et de la litière des parties aériennes, par exemple. Dans certains écosystèmes, une partie considérable de la biomasse

de racines fines se situe à plus d'un mètre de profondeur ; pourtant toutes les études présentées dans cette synthèse sur le « mining » ont été réalisées soit en laboratoire, soit dans les tous premiers centimètres de sol. S'il est apparu naturel d'étudier la profondeur en se plaçant au niveau de la stratégie de « foraging », pourquoi alors si peu d'étude en profondeur concernent la partie « mining » ? Par inutilité ? Ce qui est montré en surface est-il valable et répétable en profondeur ? Les très rares études s'étant posé la question ne vont pas dans ce sens. Le potentiel d'absorption de N, K et Ca par des racines fines a ainsi été mesuré à 10, 50, 150 et 300 cm de profondeur dans une plantation d'*Eucalyptus grandis* de 6 ans (da Silva et al. 2011). Des traceurs de ces éléments ont été injectés aux différentes profondeurs ($^{15}NO_3^-$, Rb^+- analogue de K^+ et Sr^{2+}- analogue de Ca^{2+}). Pour un arbre marqué, un élément est attribué à une et unique profondeur. Il faut donc marquer au minimum 4 arbres, pour tester les 3 éléments aux 4 profondeurs différentes (le dispositif randomisé mis en place a permis d'avoir 3 répétitions pour chaque profondeur pour chaque élément). L'analyse de la concentration des traceurs retrouvés dans les jeunes feuilles des arbres marqués a ensuite permis d'évaluer le potentiel d'absorption des éléments en fonction de leur profondeur d'injection. Le potentiel d'absorption relative le plus élevé a été trouvé pour les traceurs placés à une profondeur de 10 cm. En revanche, lorsque l'on regarde le potentiel d'absorption relative spécifique, qui prend en compte les différences de longueur spécifique de racines entre les différentes couches de sol, alors, les valeurs les plus élevées concernant Sr^{2+} et Rb^+ ont été trouvées à une profondeur de 300 cm. Cette étude va dans le sens de la possibilité d'une spécialisation du fonctionnement racinaire avec la profondeur, indiquant dans ce cas une aptitude particulièrement élevée pour l'acquisition de cations en profondeur. Si le fonctionnement des racines fines en profondeur reste particulièrement sous documenté, voire non documenté, ce n'est clairement pas par manque de pertinence mais en grande partie lié aux challenges méthodologiques qu'implique son étude.

RÉFÉRENCES

Ae N, Arihara J, Okada K, et al. (1990) Phosphorus Uptake by Pigeon Pea and Its Role in Cropping Systems of the Indian Subcontinent. Science 248:477–480. doi: 10.1126/science.248.4954.477

Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. Mycorrhiza 11:107–114. doi: 10.1007/s005720100108

Bakker MR, George E, Turpault MP, et al. (2004) Impact of Douglas-fir and Scots pine seedlings on plagioclase weathering under acidic conditions. Plant Soil 266:247–259.

Barber SA (1995) Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach, 2 edition. Wiley

Barber SA, Walker JM, Vasey EH (1963) Mechanisms for Movement of Plant Nutrients from Soil and Fertilizer to Plant Root. J Agric Food Chem 11:204–207. doi: 10.1021/jf60127a017

Barbieri P, Galli E (1993) Effect on Wheat Root Development of Inoculation with an Azospirillum-Brasilense Mutant with Altered Indole-3-Acetic-Acid Production. Res Microbiol 144:69–75. doi: 10.1016/0923-2508(93)90216-O

Barre P, Montagnier C, Chenu C, et al. (2008) Clay minerals as a soil potassium reservoir: observation and quantification through X-ray diffraction. Plant Soil 302:213–220. doi: 10.1007/s11104-007-9471-6

Barre P, Velde B, Abbadie L (2007a) Dynamic role of “illite-like” clay minerals in temperate soils: facts and hypotheses. Biogeochemistry 82:77–88. doi: 10.1007/s10533-006-9054-2

Barre P, Velde B, Catel N, Abbadie L (2007b) Soil-plant potassium transfer: impact of plant activity on clay minerals as seen from X-ray diffraction. Plant Soil 292:137–146. doi: 10.1007/s11104-007-9208-6

Battie-Laclau P, Delgado-Rojas JS, Christina M, et al. (2016) Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. For Ecol Manag 364:77–89. doi: 10.1016/j.foreco.2016.01.004

Battie-Laclau P, Laclau J-P, Domec J-C, et al. (2014) Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in Eucalyptus grandis plantations. New Phytol 203:401–413. doi: 10.1111/nph.12810

Becquer A, Trap J, Irshad U, et al. (2014) From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. Front Plant Sci 5:548. doi: 10.3389/fpls.2014.00548

Blossfeld S, Schreiber CM, Liebsch G, et al. (2013) Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO2 dynamics with planar optodes. Ann Bot 112:267–276. doi: 10.1093/aob/mct047

Bonfante P, Requena N (2011) Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. (Special Issue: Biotic interactions.). Curr Opin Plant Biol 14:451–457.

Bravin MN, Garnier C, Lenoble V, et al. (2012) Root-induced changes in pH and dissolved organic matter binding capacity affect copper dynamic speciation in the rhizosphere. Geochim Cosmochim Acta 84:256–268. doi: 10.1016/j.gca.2012.01.031

Bravin MN, Marti AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalisation - a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. Plant Soil 318:257–268. doi: 10.1007/s11104-008-9835-6

Brimecombe M.J., De Leij F.A.A.M. & Lynch J.M., 2007. Rhizodeposition and microbial populations. *In:* Pinton R., Veranini Z. & Nannipieri P., eds. *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York, USA: Taylor & Francis Group.

Brunner I, Sperisen C (2013) Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. Front Plant Sci 4:172. doi: 10.3389/fpls.2013.00172

Carvalhais LC, Dennis PG, Fan B, et al. (2013) Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. PLOS ONE 8:e68555. doi: 10.1371/journal.pone.0068555

Casarin V, Plassard C, Souche G, Arvieu JC (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. Agronomie 23:461–469.

Chaignon V, Bedin F, Hinsinger P (2002) Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. Plant Soil 243:219–228. doi: 10.1023/A:1019942924985

Christina M, Laclau JP, Goncalves JLM, et al. (2011) Almost symmetrical vertical growth rates above and below ground in one of the world's most productive forests. Ecosphere 2:2710.

Claassen N, Jungk A (1982) Potassium Dynamics at the Soil-Root Interface in Relation to the Uptake. Z Pflanzenernahrung Bodenkd 145:513–525. doi: 10.1002/jpln.19821450603

Coroneos C, Hinsinger P, Gilkes RJ (1996) Granite powder as a source of potassium for plants: A glasshouse bioassay comparing two pasture species. Fertil Res 45:143–152.

Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR (2010) Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? FEMS Microbiol Ecol 72:313–327. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x

Eissenstat DM, Wells CE, Yanai RD, Whitbeck JL (2000) Building roots in a changing environment: implications for root longevity. New Phytol 147:33–42.

Ferguson BJ, Mathesius U (2014) Phytohormone Regulation of Legume-Rhizobia Interactions. J Chem Ecol 40:770–790. doi: 10.1007/s10886-014-0472-7

Finér L, Ohashi M, Noguchi K, Hirano Y (2011) Fine root production and turnover in forest ecosystems in relation to stand and environmental characteristics. For Ecol Manag 262:2008–2023. doi: 10.1016/j.foreco.2011.08.042

Gahoonia T, Claassen N, Jungk A (1992) Mobilization of Phosphate in Different Soils by Ryegrass Supplied with Ammonium or Nitrate. Plant Soil 140:241–248. doi: 10.1007/BF00010600

Garbaye J (2013) La symbiose mycorhizienne: Une association entre les plantes et les champignons. Quae. 429p

Gardner W, Barber D, Parbery D (1983) The Acquisition of Phosphorus by Lupinus-Albus L .3. the Probable Mechanism by Which Phosphorus Movement in the Soil Root Interface Is Enhanced. Plant Soil 70:107–124. doi: 10.1007/BF02374754

Gavito ME, Olsson PA (2003) Allocation of plant carbon to foraging and storage in arbuscular mycorrhizal fungi. Fems Microbiol Ecol 45:181–187. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00150-8

Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37:395–412. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.08.030

Grove TS, Malajczuk N, Hardy GES (1996) The effect of soil pH on the ability of ectomycorrhizal fungi to increase the growth of Eucalyptus globulus Labill. Plant Soil 178:209–214.

Guo D, Mitchell R, Hendricks J (2004) Fine root branch orders respond differentially to carbon source-sink manipulations in a longleaf pine forest. Oecologia. doi: 10.1007/s00442-004-1596-1

Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao XW (2000) The role of root border cells in plant defense. Trends Plant Sci 5:128–133. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01556-9

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plant Soil 237:173–195.

Hinsinger P (1998) How Do Plant Roots Acquire Mineral Nutrients? Chemical Processes Involved in the Rhizosphere. In: Advances in Agronomy. Elsevier, pp 225–265

Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. (Special Issue: Rhizosphere: achievements and challenges.). Plant Soil 321:117–152.

Hinsinger P, Brauman A, Devau N, et al (2011) Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? Plant Soil 348:29–61. doi: 10.1007/s11104-011-0903-y

Hinsinger P, Elsass F, Jaillard B, Robert M (1993) Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. J Soil Sci 44:535–545. doi: 10.1111/j.1365-2389.1993.tb00475.x

Hinsinger P, Gilkes RJ (1997) Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in an acid, P-fixing mineral substrate. Geoderma 75:231–249. doi: 10.1016/S0016-7061(96)00094-8

Hinsinger P, Jaillard B, Le Cadre E, Plassard C (2007) Speciation et biodisponibilite du phosphore dans la rhizosphere - Speciation and bioavailability of phosphorus in the rhizosphere. Ocean Paris 33:37–50.

Hinsinger P, Plassard C, Tang CaiXian, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. (Special issue: Structure and functioning of cluster roots and plant responses to phosphate deficiency). Plant Soil 248:43–59.

Hoffland E (1992) Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. Plant Soil 140:279–289.

Huang B, Duncan RR, Carrow RN (1997) Drought-resistance mechanisms of seven warm-season - turfgrasses under surface soil drying: II. Root aspects. Crop Sci 37:1863–1869.

Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, et al. (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. Bot-Bot. doi: 10.1139/cjb-2013-0225

Ikka T, Ogawa T, Li D, et al (2013) Effect of aluminum on metabolism of organic acids and chemical forms of aluminum in root tips of Eucalyptus camaldulensis Dehnh. Phytochemistry 94:142–147. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.06.016

Iijima M, Morita S, Barlow PW (2008) Structure and function of the root cap. Plant Prod Sci 11:17–27. doi: 10.1626/pps.11.17

Jaillard B (1982) Relation entre dynamique de l'eau et organisation morphologique d'un sol calcaire. Sci Sol 20:31–52.

Jaillard B, Hinsinger P (1993) Root-induced release of interlayer potassium and vermiculitization ofphlogopite as related to potassium depletion in the rhizosphere of ryegras. J OfSoil Sci 44:525–534.

Jalonen R, Nygren P, Sierra J (2009) Transfer of nitrogen from a tropical legume tree to an associated fodder grass via root exudation and common mycelial networks. Plant Cell Environ 32:1366–1376. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02004.x

Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. Plant Soil 321:5–33. doi: 10.1007/s11104-009-9925-0

Jourdan C, Silva EV, Gonçalves JLM, et al. (2008) Fine root production and turnover in Brazilian Eucalyptus plantations under contrasting nitrogen fertilization regimes. For Ecol Manag 256:396–404. doi: 10.1016/j.foreco.2008.04.034

Jun-Xing Y, Yong L, Zhi-Hong Y (2012) Root-Induced Changes of pH, Eh, Fe(II) and Fractions of Pb and Zn in Rhizosphere Soils of Four Wetland Plants with Different Radial Oxygen Losses. Pedosphere 22:518–527.

Khalvati MA, Hu Y, Mozafar A, Schmidhalter U (2005) Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. Plant Biol 7:706–712. doi: 10.1055/s-2005-872893

Kirk G, Nye P (1986) A Simple-Model for Predicting the Rates of Dissolution of Sparingly Soluble Calcium Phosphates in Soil .1. the Basic Model. J Soil Sci 37:529–540.

Laclau J-P, da Silva EA, Rodrigues Lambais G, et al. (2013) Dynamics of soil exploration by fine roots down to a depth of 10 m throughout the entire rotation in Eucalyptus grandis plantations. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00243

Laclau J-P, Levillain J, Deleporte P, et al. (2010) Organic residue mass at planting is an excellent predictor of tree growth in Eucalyptus plantations established on a sandy tropical soil. For Ecol Manag 260:2148–2159. doi: 10.1016/j.foreco.2010.09.007

Lee J-E, Oliveira RS, Dawson TE, Fung I (2005) Root functioning modifies seasonal climate. Proc Natl Acad Sci U S A 102:17576–17581. doi: 10.1073/pnas.0508785102

Lo J-C, Tsednee M, Lo Y-C, et al. (2016) Evolutionary analysis of iron (Fe) acquisition system in Marchantia polymorpha. New Phytol 211:569–583. doi: 10.1111/nph.13922

Logbo J, Diouf M, Ngaryo F, et al. (2013) Effet du stress hydrique sur larchitecture racinaire de jeunes plants dAcacia tortilis (Forsk.), de Balanites aegyptiaca (L) Del., et de Zizyphus mauritiana Lam. Int J Biol Chem Sci 7:1011–1033.

van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Eur J Plant Pathol 119:243–254. doi: 10.1007/s10658-007-9165-1

Lorenz S, Hamon R, Mcgrath S (1994) Differences between soil solutions obtained from rhizosphere and non-rhizosphere soils by water displacement and soil centrifugation. Eur J Soil Sci 45:431–438. doi: 10.1111/j.1365-2389.1994.tb00528.x

Lu N, Chen S, Wilske B, et al. (2011) Evapotranspiration and soil water relationships in a range of disturbed and undisturbed ecosystems in the semi-arid Inner Mongolia, China. J Plant Ecol 4:49–60. doi: 10.1093/jpe/rtq035

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, Second edition.

Marschner H, Romheld V, Horst W, Martin P (1986a) Root-Induced Changes in the Rhizosphere - Importance for the Mineral-Nutrition of Plants. Z Pflanzenernahrung Bodenkd 149:441–456. doi: 10.1002/jpln.19861490408

Marschner H, Romheld V, Kissel M (1986b) Different Strategies in Higher-Plants in Mobilization and Uptake of Iron. J Plant Nutr 9:695–713. doi: 10.1080/01904168609363475

Mengel K, Kirkby EA (1987) Principles of Plant Nutrition - Springer.

Miyasaka S, Buta J, Howell R, Foy C (1991) Mechanism of Aluminum Tolerance in Snapbeans - Root Exudation of Citric-Acid. Plant Physiol 96:737–743. doi: 10.1104/pp.96.3.737

Morrissey JP, Dow JM, Mark GL, O'Gara F (2004) Are microbes at the root of a solution to world food production? EMBO Rep 5:922–926. doi: 10.1038/sj.embor.7400263

Nihorimbere V, Ongena M, Smargiassi M, Thonart P (2011) Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. Biotechnol Agron Soc Environ 15:327–337.

Pernes-Debuyser A, Pernes M, Velde B, Tessier D (2003) Soil mineralogy evolution in the INRA 42 plots experiment (Versailles, France). Clays Clay Miner 51:577–584. doi: 10.1346/CCMN.2003.0510512

Phillips WS (1963) Depth of Roots in Soil. Ecology 44:424–424. doi: 10.2307/1932198

Pierret A, Maeght J-L, Clément C, et al. (2016) Understanding deep roots and their functions in ecosystems: an advocacy for more unconventional research. Ann Bot mcw130. doi: 10.1093/aob/mcw130

Plassard C, Guérin-Laguette A, Véry A-A, et al. (2002) Local measurements of nitrate and potassium fluxes along roots of maritime pine. Effects of ectomycorrhizal symbiosis. Plant Cell Environ 25:75–84. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00810.x

Pregitzer KS, DeForest JL, Burton AJ, et al. (2002) Fine root architecture of nine North American trees. Ecol Monogr 72:293–309.

Read D (1992) The mycorrhizal mycelium. Mycorrhizal Funct 102–133.

Rengel Z (2015) Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. J Soil Sci Plant Nutr 15:397–409.

Riley D, Barber SA (1971) Effect of Ammonium and Nitrate Fertilization on Phosphorus Uptake as Related to Root-Induced pH Changes at the Root-Soil Interface1. Soil Sci Soc Am J 35:301. doi: 10.2136/sssaj1971.03615995003500020035x

Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature 397:694–697. doi: 10.1038/17800

Rudolph N, Voss S, Moradi AB, et al. (2013) Spatio-temporal mapping of local soil pH changes induced by roots of lupin and soft-rush. Plant Soil 369:669–680. doi: 10.1007/s11104-013-1775-0

Schenk HJ, Jackson RB (2005) Mapping the global distribution of deep roots in relation to climate and soil characteristics. Geoderma 126:129–140. doi: 10.1016/j.geoderma.2004.11.018

Schenk HJ, Jackson RB (2002) Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. J Ecol 90:480–494.

Selosse M-A, Richard F, He X, Simard SW (2006) Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? Trends Ecol Evol 21:621–628. doi: 10.1016/j.tree.2006.07.003

da Silva EV, Bouillet J-P, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2011) Functional specialization of Eucalyptus fine roots: contrasting potential uptake rates for nitrogen, potassium and calcium tracers at varying soil depths: Functional specialization of Eucalyptus fine roots. Funct Ecol 25:996–1006. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01867.x

Schmitz AM, Harrison MJ (2014) Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. J Integr Plant Biol 56:250–261. doi: 10.1111/jipb.12155

Sinha RK (2004) Modern Plant Physiology. CRC Press

Sloan VL, Fletcher BJ, Press MC, et al (2013) Leaf and fine root carbon stocks and turnover are coupled across Arctic ecosystems. Glob Change Biol 19:3668–3676. doi: 10.1111/gcb.12322

Sobolev VS, Potter TL, Horn BW (2006) Prenylated stilbenes from peanut root mucilage. Phytochem Anal 17:312–322. doi: 10.1002/pca.920

Sprent JI (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytol 174:11–25. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02015.x

Tsigie A, Tilak KVBR, Saxena AK (2011) Field response of legumes to inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. Biol Fertil Soils 47:971. doi: 10.1007/s00374-011-0573-1

Turner N, Begg J (1981) Plant-Water Relations and Adaptation to Stress. Plant Soil 58:97–131. doi: 10.1007/BF02180051

Turpault M-P, Gobran GR, Bonnaud P (2007) Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. Geoderma 137:490–496. doi: 10.1016/j.geoderma.2006.10.005

Turpault M-P, Righi D, Uterano C (2008) Clay minerals: Precise markers of the spatial and temporal variability of the biogeochemical soil environment. Geoderma 147:108–115. doi: 10.1016/j.geoderma.2008.07.012

Velde B, Peck T (2002) Clay mineral changes in the morrow experimental plots, University of Illinois. Clays Clay Miner 50:364–370. doi: 10.1346/000986002760833738

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571–586. doi: 10.1023/A:1026037216893

Wang L, Mou PP, Jones RH (2006) Nutrient foraging via physiological and morphological plasticity in three plant species. Can J For Res 36:164–173. doi: 10.1139/x05-239

Yang J, Kloepper JW, Ryu C-M (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci 14:1–4. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.004

York LM, Carminati A, Mooney SJ, et al. (2016) The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. J Exp Bot 67:3629–43. doi: 10.1093/jxb/erw108

Yuan J, Zhang N, Huang Q, et al. (2015) Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain Bacillus amyloliquefaciens NJN-6. Sci Rep 5:13438. doi: 10.1038/srep13438

Zamioudis C, Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. Mol Plant-Microbe Interact MPMI 25:139–150. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0179

3. Hypothèses, démarche expérimentale et présentation du site

I. HYPOTHESES ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

L'étude bibliographique a fait apparaitre l'importance du rôle fonctionnel des racines fines dans le déterminisme de l'efficacité de la nutrition des plantes et de leur habilité à se défendre et s'adapter face aux stress biotiques et abiotiques.

La stratégie de « foraging » adoptée par les systèmes racinaires est guidée en partie par la disponibilité en eau et, particulièrement si elles sont soumises à des contraintes hydriques, les plantes tendent à développer des systèmes racinaires profonds, qui peuvent parfois atteindre la nappe phréatique. Cependant, malgré l'importance quantitative réelle et l'importance qualitative potentielle de ces racines fines en profondeur, les connaissances actuelles concernant leur fonctionnement sont encore extrêmement limitées.

La littérature tend de fait à sous-estimer l'importance des racines fines profondes :

(i) à l'échelle de la plante, en terme de nutrition minérale, en raison notamment de l'appauvrissement des sols en nutriments aisément disponibles et en matière organique avec la profondeur, de la raréfaction consécutive des communautés microbiennes, et de l'absence supposée d'associations symbiotiques, mycorhiziennes notamment en dessous d'un mètre de profondeur,

(ii) à l'échelle de l'écosystème, en terme de stockage du carbone, en raison notamment de la diminution forte de la biomasse racinaire attendue avec la profondeur, et de l'imprécision au niveau de la quantification de la contribution de la rhizodéposition au champ.

L'essentiel des travaux sur la nutrition minérale des systèmes forestiers s'est concentré sur le rôle des racines/mycorhizes superficielles, majoritairement dans les 30 premiers centimètres du sol. L'évaluation de la contribution des racines fines profondes constitue un vrai challenge métrologique et, de fait, un verrou scientifique majeur, qu'il est important de lever pour étudier la durabilité des agro-écosystèmes et écosystèmes forestiers de plantation, ainsi que leur résilience face aux changements globaux. Ce projet de thèse a donc comme enjeu général de franchir la frontière de la profondeur dans l'étude du fonctionnement des racines fines, en explorant les hypothèses ci-après.

A. Hypothèses principales et objectif central

- **le fonctionnement des racines fines est influencé par la profondeur**. Nous avons vu que les propriétés du sol dans lequel se développe la racine en croissance influencent les actions que celle-ci met en place dans le but d'optimiser sa mission première : fournir la plante en eau et en éléments minéraux. Or le poids de la colonne de sol, l'éloignement vis-à-vis de l'atmosphère et de la litière des parties aériennes, ainsi que des activités des organismes du sol, sont des arguments pour penser que (i) les conditions en profondeurs sont différentes des conditions de surfaces et que (ii) les racines fines vont adapter leur fonctionnement à ces nouvelles conditions.
- **les racines fines profondes présentent une importance fonctionnelle spécifique à l'échelle de la plante pour la nutrition et la productivité.** Découlant de la première hypothèse, l'optimisation du fonctionnement des racines fines dans un environnement spécifique incite à penser que des racines spécifiquement adaptées au sol en profondeur fonctionnent différemment des racines ayant adapté leur fonctionnement aux conditions de surface.
- **le fonctionnement des racines fines est impacté par une modification du régime hydrique.** Toujours en se fondant sur l'observation d'une adaptation du fonctionnement aux conditions du milieu, il est logique de penser qu'une modification de régime hydrique (i) va modifier la distribution et la disponibilité de l'eau dans le sol et, par conséquent, (ii) va modifier les actions racinaires (absorption, exsudation).
- **le rôle des racines fines profondes pour la plante est exacerbé en condition de réduction des précipitions.** Les racines fines profondes pourraient être moins affectées par de telles modifications climatiques que les racines de surface et ainsi jouer un rôle clé en période de sécheresse.
- **le fonctionnement des racines fines profondes joue un rôle essentiel dans l'apport de carbone au sol par le phénomène de rhizodéposition et celle-ci est impactée par la modification du régime hydrique.** Nous avons vu dans la synthèse bibliographique qu'une part importante du carbone photosynthétisé par la plante est libérée dans le milieu rhizosphérique par le phénomène de rhizodéposition, en réponse notamment à des stress. Sa contribution a souvent été estimée dans les calculs de stock de carbone mais pas de quantification réelle n'a été faite de ses conséquences sur les concentrations en C organique dans la rhizosphère, encore moins en profondeur.

Dans ce contexte, l'objectif central de la thèse est de caractériser l'effet de la profondeur couplé à l'effet d'une réduction des précipitations sur le fonctionnement des racines fines afin d'évaluer les rôles fonctionnels des racines profondes à l'échelle de la plante, en termes de nutrition minérale et d'association symbiotique, et à l'échelle de l'écosystème, en termes de séquestration du carbone.

B. Démarche expérimentale

Le modèle de l'eucalyptus en plantation clonale a été choisi pour cette étude car il présente l'avantage de développer un système racinaire profond dans des sols tropicaux restant très homogènes jusqu'à la nappe phréatique présente à 17 m de profondeur dans nos conditions. Deux conditions hydriques ont été testées : une condition hydrique témoin correspondant aux précipitations normales ainsi qu'une condition de réduction de 37% des pluviolessivats grâce à un système de gouttières installé au moment de la plantation**.**

La démarche expérimentale suivante a été mise en place :

- **Réflexion sur les moyens méthodologiques possibles pour l'étude du fonctionnement des racines fines *in situ***. La comparaison entre le milieu rhizosphérique soumis aux actions racinaires avec le sol non soumis aux activités racinaires semble être l'approche la plus pertinente pour déduire le fonctionnement des racines fines *in situ* (chapitre 1_partie 1).
- **Essais pour l'application au champ de techniques de laboratoire innovantes pour une étude dynamique et non invasive de la rhizosphère : les optodes**. Ces essais ont été réalisés en plantation d'eucalyptus sur un dispositif de fosses permanentes. Les résultats de ces essais sont présentés dans le chapitre 2B. Ce chapitre aboutit à l'identification de limites pour l'application de la technique « optode » sur le modèle eucalyptus dans des sols tropicaux acides, et à l'établissement d'une démarche à suivre pour de futurs essais *in situ* (chapitre 1_partie 2).
- **Choix d'acquisition des données pour la thèse par une méthode destructive** consistant en la collecte de sol rhizosphérique et non rhizosphérique jusqu'à une profondeur de 4 m, pour les deux régimes de précipitation, en saison sèche, afin de cibler la période de plus fort stress hydrique, (chapitres 2-4).
- **Déduction des actions racinaires pour la nutrition** en utilisant des paramètres pertinents tels que le pH et la concentration en cations majeurs (chapitre 2).
- **Détermination des possibilités d'association mycorhizienne jusqu'à 4 m** par collecte de racines fines, étude visuelle des ectomycorhizes et pyroséquençage. Seuls les résultats de l'étude visuelle

sont présentés dans ce manuscrit (chapitre 3), les données de pyroséquençage sont en cours d'acquisition à ce jour.

- **Quantification de la rhizodéposition** par des analyses de carbone organique/azote total couplées à des mesures de biomasses racinaires réalisées par l'équipe d'une post-doctorante sur le même site et à la même période (chapitre 4).
- **Etude de la résilience du système suite à une situation de sécheresse** en répétant les comparaisons sol rhizosphérique/sol non rhizosphérique dans les deux conditions hydriques (avec et sans réduction des pluviolessivats) mais pendant la saison des pluies (chapitres 2,3,4).

C. Présentations des résultats de la thèse

Les résultats obtenus dans cette thèse sont présentés sous forme de quatre articles :

- « *Rainfall reduction impacts rhizosphere biogeochemistry in eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil* ». Accepté dans *Plant and Soil*. "Article 1" Chapitre 2.
- « *Rainfall reduction does not affect Al and nutrient availability during the wet season in a Eucalyptus grandis plantation grown in a deep ferralsol under humid sub-tropical climate* » Article à soumettre, mais pas en l'état, à la revue *Plant and Soil*, "Article 2" Chapitre 2.
- « *First evidence for ectomycorrhizae associated with deep roots in a eucalypt plantation in Brazil.* » Article à soumettre, mais pas en l'état, à la revue *Journal of Ecology*, "Article 3" Chapitre 3.
- « *Rainfall reduction increases soil carbon storage capacity at great depth in Eucalyptus grandis plantation in a deep ferralsol in Brazil* » Article à soumettre, mais pas en l'état, à la Soil Biology and Biochemistry, "Article 4" Chapitre 4.

L'influence d'une modification des conditions hydriques, via la manipulation des précipitations, sur la stratégie de « foraging » ne sera pas présentée dans cette thèse qui se concentre sur la stratégie de « mining », mais elle a fait partie de la stratégie de recherche générale développée sur ce dispositif expérimental. J'ai initié lors de ma thèse des mesures à l'aide de tubes minirhizotrons jusqu'à 17 m de profondeur dans les fosses permanentes, qui seront présentées dans le chapitre 2 (la méthodologie des mesures minirhizotrons en fosses est illustrée par l'annexe 2). Ces mesures, poursuivies en 2016 dans le cadre de la thèse d'Amandine Germon, feront l'objet d'un article dont la soumission est prévue pour 2017 (Pradier* Germon* et al. *in prep*).

II. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés pour 18 mois au Brésil (lors de trois missions de 8, 5 et 5 mois), sur la station expérimentale de sciences forestières d'Itatinga (Sao Paulo, Brésil) en partenariat avec l'Université de São Paulo et plus particulièrement de l'Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz de Piracicaba (ESALQ) et pour 18 mois en France, au sein des locaux de l'UMR Eco&Sols à Montpellier.

A. Géologie et climat de la région

La station expérimentale d'Itatinga, d'une superficie de 2119,6 ha, est située sur le plateau occidental de l'état de Sao Paulo (23°02'S 48°38'O) caractérisée par une topographie vallonnée. La région autour d'Itatinga a la particularité de posséder plus de 40% de sa surface en affleurement de l'aquifère de Guarani (Cetesb). Avec une surface de 1 087 879 km² (dont 68% au Brésil), cette aquifère est le plus grand réservoir d'eau potable de l'Amérique du sud, sa profondeur allant de 10 à 1800 m.

Le climat de cette région est subtropical humide (Cwa) d'après la classification de Köppen, avec deux saisons : une saison sèche de juin à septembre avec une température moyenne mensuelle de 15°C, et une saison humide caractérisée par de fortes précipitations, avec une température moyenne mensuelle de 25°C et un fort rayonnement global. Au cours des 15 dernières d'années, les précipitations moyennes annuelles étaient de 1360 mm.

B. Caractéristiques géologique et pédologique du site d'étude

Le site d'étude est située sur la partie haute d'une légère colline (pente < 3%) à une altitude de 850 m. Il a été boisé avec des *Eucalyptus saligna* de 1945 à 1998 puis avec des *Eucalyptus grandis* de 1998 à aujourd'hui, gérés en rotation courte (~ 6 ans) pour l'exploitation du bois. Les sols sont des sols ferralitiques profonds développés sur du grès du Crétacé (formation Marilia, groupe Bauru), la nappe phréatique oscillant entre 17 et 20 m de profondeur. Un horizon organo-minéral sombre est présent entre 0 et 15 cm mais le sol reste ensuite assez homogène sur tout le profil, particulièrement en dessous de 1 m. Une caractérisation détaillée des propriétés chimiques et minéralogiques de cette parcelle a été réalisées en 2008 jusqu'à une profondeur de 4 mètres dans le cadre de la thèse de Maquère, 2008. Le contenu en sable est de 70% entre 2 et 3 m et atteint 79% entre 0 et 15 cm. Le contenu en argile augmente avec la profondeur de 16% dans l'horizon 0-15 cm à 24 % en dessous de 1 m. La minéralogie du sol est dominée par le quartz, la kaolinite et les oxyhydroxides, avec des sols acides (pH de 4,5 à 5). Entre 5 et 400 cm, la CEC est comprise entre 0.87 et 0.08 cmolc kg^{-1}, la concentration en K et Na échangeable est en moyenne de 0.02 cmolc kg^{-1} dans les 15 premiers centimètres et inférieure à 0.01 cmolc kg^{-1} ensuite (Laclau et al. 2010).

C. Dispositif expérimental

Un dispositif à deux modalités hydriques a été mis en place en juin 2010 avec un clone d'*Eucalyptus grandis* très productif développé par l'entreprise Suzano soutenue par la FAPESP (www.fapesp.br, 2010/50663-8), le CIRAD, l'USPCOFECUB (Project 2011-25), AGREENIUM (Plantotrem project) et l'institut SOERE F-ORET. Cette étude vise à évaluer l'impact de la réduction des précipitations prédites par les modèles climatiques sur la productivité des plantations d'eucalyptus et la capacité d'adaptation de cet écosystème.

Deux régimes de précipitations (+W=témoin et -W= exclusion des pluies) ont été appliqués sur 3 blocs (cf Planche 1). Les surfaces individuelles des parcelles -W et +W dans chaque bloc sont de 864 m², avec 144 arbres espacés de 2 m x 3 m. Tous les arbres de l'expérimentation ont reçu une fertilisation lors de la plantation (176 kg K ha^{-1}, 80 kg N ha^{-1}, 75 kg P ha^{-1}), dans des conditions non limitantes pour la croissance des arbres sur ce site (Laclau et al. 2009).

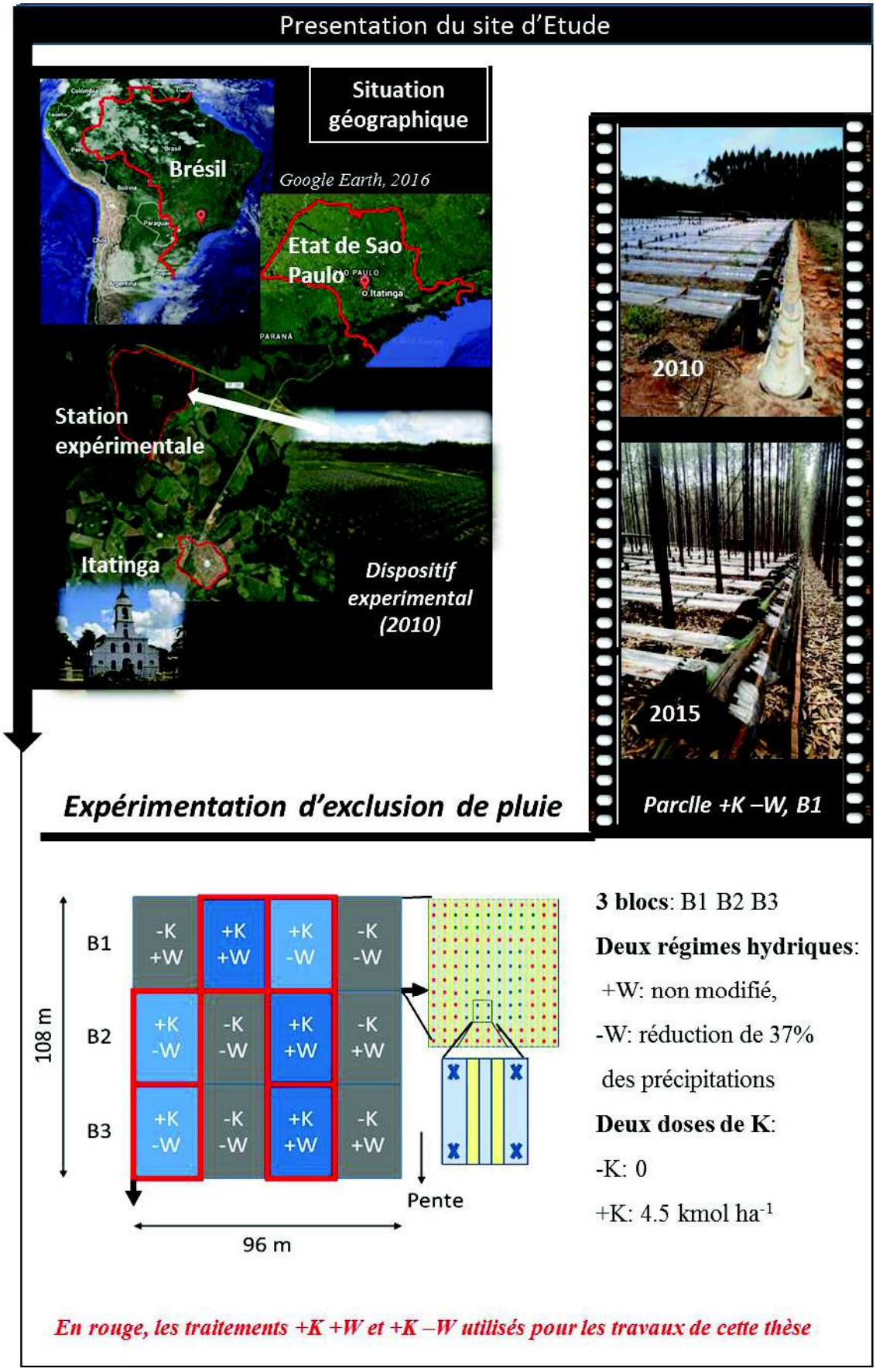
Les parcelles -W ont été équipées, à la plantation en 2010, de bâches plastiques, transparentes à la lumière, installées à une hauteur variant entre 1,6 et 0,5 m entre les lignes d'eucalyptus. Ces bâches plastiques couvrent 37 % de la surface des parcelles -W. Les parcelles +W ont un régime hydrique non modifié. Une tranchée de 50 cm de profondeur a été creusée autour des parcelles -W pour limiter le développement latéral en surface des racines d'*Eucalyptus* entre les traitements -W et +W.

Références

Maquère Valérie (2008) « Dynamics of mineral elements under a fast-growing eucalyptus plantation in Brazil. Implications for soil sustainability », Thèse de doctorat en sciences forestières, sous la direction de Jacques RANGER, José Leonardo de Moraes GONCALVES et Jean-Paul LACLAU, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Laclau J-P, Almeida JCR, Gonçalves JLM, et al. (2009) Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in Eucalyptus plantations. Tree Physiol 29:111–124. doi: 10.1093/treephys/tpn010

Planche 1


Presentation du site d'Etude
Situation géographique
Brésil
Google Earth, 2016
Etat de Sao Paulo
Itatinga
Station expérimentale
Itatinga
Dispositif experimental (2010)
2010
2015
Parclle +K –W, B1
Expérimentation d'exclusion de pluie
B1
B2
B3
-K +W
+K +W
+K -W
-K -W
108 m
96 m
Pente
3 blocs: B1 B2 B3
Deux régimes hydriques:
+W: non modifié,
-W: réduction de 37% des précipitations
Deux doses de K:
-K: 0
+K: 4.5 kmol ha-1
En rouge, les traitements +K +W et +K –W utilisés pour les travaux de cette thèse

Chapitre 1

Développement méthodologique

1. Comment étudier le fonctionnement des racines fines ?

2. Essais pour l'utilisation in situ des optodes pH

Introduction du chapitre

Ce chapitre présente les travaux de développement méthodologique réalisés durant cette thèse dans l'objectif d'utiliser les optodes pour la caractérisation, *in situ* et en grande profondeur, du fonctionnement des racines fines à travers leur effet sur le pH rhizosphérique.

Ce premier chapitre se décompose en deux parties :

La première partie « **Comment étudier le fonctionnement des racines fines ?** » consiste en une synthèse bibliographique sur les moyens actuels d'étude du fonctionnement racinaire en discutant leurs atouts et leurs limites, en termes de finesse des résultats, de biais crées, de possibilité de passage *in situ*. Les optodes, dans ce contexte, apparaissent comme une solution pour une étude plus fine des dynamiques temporelles et spéciales qui régissent la rhizosphère. Les optodes pH donnent accès à un paramètre clé de la rhizosphère qui nous l'avons vu dans la synthèse est un proxy notamment de la fonction d'absorption des cations/anions par la racine et qui peut jouer un rôle important dans la mobilisation des nutriments du sol (stratégie de « mining »).

La seconde partie « **Essais pour l'utilisation *in situ* des optodes pH** » présente les essais d'utilisation de cette technique, *in situ*, en plantation d'eucalyptus au Brésil et appliquée aux racines profondes, grâce à un dispositif de fosses permanentes. Cette partie ne fera pas l'objet d'un article car le développement initié dans cette thèse n'a pu aboutir à des résultats exploitables. Toutefois, les co-auteurs suivants sont associés au travail : Daniela Achatz de l'entreprise PreSens, Gabrielle Daudin, ingénieure, avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration sur ce projet ainsi que Philippe Hinsinger, Christian Krause (entreprise PreSens), Jean-Paul Laclau, Jean-Pierre Bouillet et Christophe Jourdan.

1. Comment étudier le fonctionnement des racines fines ?

Dans les recherches sur les racines, la caractérisation de leur fonctionnement est sans doute une des tâches les plus complexes en raison de la notion d'échanges dynamiques qu'elle implique et des difficultés d'accès non invasif à ces organes souterrains. C'est ainsi au sein de la rhizosphère, carrefour des interactions entre la racine et les différents composants du sol, que ce trouvent les clés de la compréhension du fonctionnement racinaire. Cependant, ce volume réduit de quelques millimètres de sol autour des racines, est particulièrement complexe à étudier, par la difficulté de son échantillonnage, mais également et surtout par l'importance des dynamiques spatiales et temporelles qu'il est difficile de capturer.

I. LA RHIZOSPHÈRE : THE PLACE TO BE!

Le concept de rhizosphère a été défini au début du 20ème siècle par Hiltner (1904) comme la fraction de sol soumise à l'influence de l'activité des racines. Depuis, de nombreuse études ont montré que la rhizosphère est significativement différente du sol non rhizosphérique en terme de propriétés chimiques, physiques et biologiques (Sokolava et al. 2015, Hinsinger et al. 2005, 2009). Les activités racinaires telle que la croissance, l'acquisition d'eau et de nutriments, la respiration ou encore la rhizodéposition créent des interactions complexes entre les différents composants du sol (phase minérale et organique, microorganismes dont les microorganismes symbiotiques tels que les champignons mycorhizens,..) qui se traduisent par des hétérogénéités locales à l'échelle micro- ou milli-métrique et une dynamique spatio-temporelle des éléments chimiques : cations, anions, O_2, CO_2, H^+ et molécules organiques.

L'ubiquité de l'ion hydrogène au sein des réactions chimiques, fait du pH l'un des paramètres les plus influant sur les équilibres et interactions régissant la rhizosphère. Comme nous l'avons vu dans la synthèse, le pH intervient dans la fonction d'acquisition des nutriments, il est acteur de l'altération, et régulateur des communautés bactériennes. Nous avons également vu qu'une différence de pH entre le milieu rhizosphérique et non-rhizosphérique peut être le résultat de l'action combinée de différents processus mais ces modifications de pH sont toutefois principalement dues à l'excrétion de protons (H^+) ou d'ions hydroxydes (OH^-) par les racines fines, afin de maintenir l'électro-neutralité dans le milieu intracellulaire suite à un prélèvement excédentaire de cations ou d'anions. Outre le paramètre pH, d'autres paramètres physico-chimiques pourraient être utilisés pour révéler le fonctionnement de la rhizosphère. La concentration en oxygène (et donc la pO_2) régie les conditions nécessaires à la vie des microorganismes aérobies du sol, et notamment des bactéries impliquées dans la minéralisation aérobique de la matière organique et il est également un indicateur des conditions redox dans le cas

de sols immergés, tels que dans les zones de marécages (Dickopp et al. 2011) ou les rizières irriguées par submersion. La pCO2 renseigne, quant à elle, sur la respiration racinaire et les activités métaboliques des microorganismes rhizosphériques.

L'enjeu méthodologique consiste alors à capturer la dynamique temporelle et spatiale d'un élément ou d'un de ces paramètres physico-chimiques, engendrée par l'action racinaire, à une échelle micro- ou millimétrique et en engendrant le minimum de perturbation possible, dans le milieu sol qui par essence est opaque et difficilement accessible !

Il n'existe pas de méthodes miracles mais une grande variété d'approches avec chacune leurs avantages et leurs limites. Classiquement, on différencie deux types d'approches méthodologiques : une approche destructive consistant en la collecte de la rhizosphère et en la réalisation d'analyses physico-chimiques ou biologiques et une approche non destructive de suivi des paramètres rhizosphériques grâce à des dispositifs d'observation de type rhizobox/rhizotron. L'application depuis une dizaine d'années des capteurs optiques pour l'étude du milieu rhizosphérique ouvre de nouvelles perspectives particulièrement prometteuses.

II. Deux approches pour l'etude de la rhizosphere

A. Approche 1 : Echantillonnage puis analyse destructive

La première approche nécessite la séparation physique des compartiments : racines, sol rhizosphérique et sol non rhizosphérique (« bulk soil ») et consiste ensuite en l'analyse des sols pour déterminer différents paramètres : le pH, le phosphore disponible, la CEC et les cations échangeables, ou encore les oligoéléments par exemple, dépendant de la quantité de sol disponible et de la question de recherche posée.

Cette approche de séparation des compartiments se heurte alors à deux difficultés :

a. Imprécision quant à la délimitation entre le sol rhizosphérique et le sol non rhizosphérique.

Déjà d'un point de vue théorique,

Si l'on se base sur la définition fonctionnelle décrite par Hiltner, le sol rhizosphérique est la fraction de sol autour des racines soumise à l'influence de l'activité racinaire. Or, dans leur revue de 2005, Hinsinger et al. insistent sur le fait que les processus rhizosphériques engendrent des gradients de tailles différentes autour des racines. Par exemple, la zone d'appauvrissement engendrée par le prélèvement racinaire du phosphore est < 1 mm alors qu'elle est de plusieurs centimètres pour le nitrate. Il est alors impossible de définir une frontière unique entre les compartiments rhizosphérique et non rhizosphérique puisque celle-ci dépendra de l'élément ou du processus étudié (York et al. 2016,

Figure 1). Dans les horizons de surface où la densité racinaire est très importante, on peut s'interroger sur l'existence d'un sol réellement non rhizosphérique, c'est-à-dire non influencé par l'activité racinaire.

D'un point de vu méthodologique,

Il est considéré classiquement que le sol rhizosphérique est le sol adhérant aux racines lorsqu'on excave le système racinaire. Cependant l'épaisseur de cette couche de sol adhérant aux racines est fortement influencée par la texture du sol ainsi que par l'humidité du sol au moment de la collecte ce qui est gênant dans la reproductivité des échantillonnages *in situ*. La difficulté de définir un sol non rhizosphérique en surface rend cette approche surtout intéressante pour explorer les couches de sol plus profondes, alors qu'elle a été surtout appliquée aux horizons superficiels.

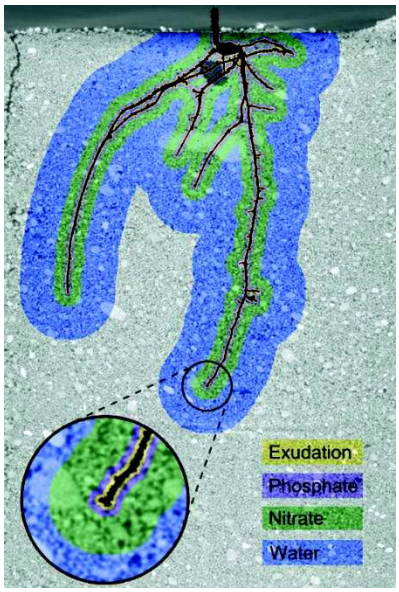


Figure 1. Délimitations approximatives de la rhizosphere d'un système racinaire d'orge suivant le phénomène étudié : accumulation d'exsudats et évolution des communautés bactériennes, zone d'appauvrissement du phosphate, du nitrate ou encore de l'eau (York et al. 2016).

b. Difficulté dans la séparation du sol rhizosphérique et des racines.

En 2006, au sein d'un manuel sur l'étude de la rhizosphère (Luster et al. 2006), Turpault propose une méthode de séparation en séchant le système racinaire, alors que Berge proposent de laver les racines pour récupérer le sol adhérant. La seconde méthode permet de récupérer une plus grande quantité de sol rhizosphérique (du sol restant adhérant aux racines après le séchage) mais l'eau de lavage peut perturber le statut physico-chimique de la rhizosphère. La méthode de séchage est intéressante dans le cas de collecte en milieu tempéré sur des sols humides. Cependant on peut se demander si laisser en contact, et qui plus est à température élevée, des racines sectionnées avec leur sol adhérant ne

pourrait pas engendrer une contamination du sol rhizosphérique à analyser par des composés excrétés par la racine en réaction à ces coupures (Spohn et al. 2014).

Malgré les artefacts qu'elle peut apporter, cette approche de « collecte puis analyse » est facile à mettre en place et surtout, est applicable *in situ* et l'a déjà été, notamment en milieu forestier. Les chapitres 2 et 4 présenteront les résultats obtenus en utilisant cette méthode pour une collecte à 10 profondeurs de 0 à 4 m (collecte 1) ainsi qu'une collecte à six profondeurs de 0 à 2 m (collecte 2). On notera que nous avons utilisé une méthode de collecte de sol rhizosphérique sans séchage pour la séparation racine-sol rhizosphérique pour éviter les possibles artefacts cités plus haut car le sol au moment de la collecte ayant un taux d'humidité très faible (<10%), le sol adhérant aux racines se détachait facilement. La collecte du sol non rhizosphérique s'est faite contre les parois des fosses afin de pouvoir vérifier l'environnement du sol en place avant sa collecte. L'annexe 1 illustre la méthode de collecte utilisée dans la thèse.

Des dispositifs de croissance en milieu contrôlé permettent de pallier ses problèmes liés à la séparation du sol non rhizosphérique, du sol rhizosphérique et des racines en intercalant une membrane pour développer une interface sol-racines plane. Le dispositif rhizotest permet par exemple de soumettre une galette de sol à l'influence de l'activité d'un tapis racinaire développé sur une membrane (Bravin et al. 2010). Ces méthodes permettent une collecte aisée de la rhizosphère, voire l'analyse de gradients de concentration dans la rhizosphère. Cependant, cette méthode (rhizotest) peut créer un artefact de concentration racinaire pouvant accentuer les effets rhizosphériques observés. Zoysa et al. en 1997 proposent une méthode basée sur le même principe et applicable au champ. Son application nécessite cependant une bonne densité racinaire ce qui peut être une limite pour l'étude en profondeur.

En conclusion, nous avons vu que cette première approche se heurte à une imprécision de type méthodologique liée à la séparation des compartiments racines, sol rhizosphérique et sol non rhizosphérique mais qu'elle est cependant facilement utilisable *in situ*. Elle est particulièrement intéressante lorsque l'on souhaite comparer des traitements car la méthode de collecte, si imparfaite soit-elle, est la même pour les différents traitements ; idem pour l'exploration verticale du système racinaire.

Toutefois il est important de discuter une autre limite de cette méthode liée à la compréhension de l'activité racinaire par l'effet engendré sur le sol rhizosphérique. Il s'agit d'une question d'échelle, à la fois temporelle et spatiale.

Au niveau de l'échelle spatiale,

La rhizosphère est régie par des processus en gradients ; nous avons déjà discuté des problèmes quant à l'étude des gradients radiaux par cette approche de collecte mais il se pose aussi la question des gradients axiaux, i.e. le long de la racine. En effet, nous accédons avec cette méthode aux effets rhizosphériques engendrés par le système racinaire dans sa globalité. Or il a été montré que les effets rhizosphériques sur le pH par exemple pouvaient varier considérablement, pas seulement en fonction de l'espèce ou des conditions environnementales mais également en fonction (1) du type de racine et (2) de la position le long de la racine (Marschner and Romheld, 1983; Marschner et al., 1986; Pilet et al., 1983). Inspiré des travaux de Weisenseel et al. en 1979, plusieurs auteurs ont depuis décrit des spécialisations fonctionnelles le long de l'axe racinaire, en estimant les flux d'ions grâce à l'utilisation de microélectrodes (Newman et al. 1987, Henriksen et al. 1992, Garnett et al. 2001, Plassard et al. 2002,...). Ainsi, la partie subapicale de la racine est la région la plus active en termes de prélèvement et de relargage. L'impact de l'ectomycorhization sur le prélèvement des nutriments à également pu être étudié sur le pin maritime comme nous l'avons vu dans la synthèse (Plassard et al. 2002). Cependant cette technique donne une information sur des flux potentiels et peut difficilement s'appliquer au sol.

Au niveau de l'échelle temporelle,

Des dynamiques saisonnières ont déjà été mise en évidence par des collectes successives (Calvaruso et al. 2014) mais l'étude à un pas de temps court, comme par exemple l'étude d'éventuelle du cycle jour / nuit dans l'absorption de l'eau ou des nutriments (Blossfeld et al. 2007) ou des réponses à un changement de conditions environnementales (pluie,..) n'est pas possible.

B. Approche 2 : Méthodes non invasives - visualisation 2D

Des méthodes permettant la visualisation non destructive des zones actives de la racine apparaissent aujourd'hui comme une alternative notamment avec le développement depuis une dizaine d'années des capteurs optiques appliqués à l'étude de l'environnement rhizosphérique.

L'idée n'est cependant pas nouvelle. L'application d'un gel d'agar contenant un indicateur coloré sur un système racinaire préalablement développé en rhizobox ou en culture hydroponique, avait déjà permis dans les années 1990 de quantifier notamment les flux de protons par la méthode de vidéodensitométrie (Ruiz et Arvieu, 1990, Plassard et al. 1999). Cette méthode ne permet cependant pas d'étudier le système racinaire dans un milieu complexe comme le sol, excepté au travers d'une approche qualitative (travaux de Marschner et Römheld).

Développée en 1994 par Davison et Zhang pour détecter les cations métalliques dans des environnements marins, l'utilisation de gradients de diffusion en couches minces (*diffusive gradients in thin films*, ou DGT) permet de travailler sur un support sol. Il s'agit d'un échantillonneur passif ou

l'élément à analyser, après être filtré par une membrane, diffuse à une vitesse contrôlée à travers un gel avant de s'adsorber sur une résine. Les résines récupérées après désorption selon différentes techniques peuvent être utilisées afin d'obtenir une image bidimensionnelle, d'une résolution inférieure au millimètre, de la distribution spatiale des analytes dans la rhizosphère : proton-induced X-ray emissions (Davison et al. 1994) ; computer-imaging densitometry (Ding et al. 2013) ; Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry « LA-ICP-MS » (Christel et al. 2016) ; 2D slicing (Ding et al. 2011). Cependant cette technique ne permet pas un suivi au cours du temps, l'adsorption sur la résine n'étant pas réversible.

C'est sur ce point que la technologie optode s'impose comme une vraie alternative. En effet, les deux intérêts majeurs de cette technique sont de permettre (i) une mesure non-invasive grâce au découplage entre le capteur optique (l'optode) et le détecteur (une caméra CCD ou fibre optique) et (ii) une mesure pouvant être répétée au cours du temps grâce à la rapidité de réponse du capteur et surtout sa réversibilité. On obtient par cet outil la cartographie d'un élément au cours du temps permettant une étude non destructive et dynamique de la rhizosphère de plantes cultivées.

III. LES OPTODES : LA SOLUTION POUR UN SUIVI SPATIALE ET TEMPOREL

En 1996, la première étude utilisant une optode plane à oxygène a été publiée en écologie microbienne, montrant un suivi non invasif des dynamiques d'O_2 dans les sédiments avec une résolution de 25 à 100 µm (Glud et al. 1996). La première publication de l'application des optodes pour l'étude du sol rhizosphérique (hors sédiment) remonte à 2007 où l'utilisation d'optodes pH avait mis en évidence des cycles diurnes d'acidification par les racines et particulièrement par la zone d'élongation des racines de *Juncus effusus* L, en rhizobox immergé en eau (Blossfeld et Gansert 2007). Aujourd'hui, ce sont les optodes pH, O_2 et pCO_2 qui sont les plus utilisées (voir Tableau 1). Deux entreprises commercialisent des optodes pH, O_2 et pCO_2 : Oceanoptics et PreSens. Le site de PreSens a une section dédiée à l'application pour l'étude du sol rhizosphérique. Toutefois, pour une question de coût et de recherche de propriétés particulières, de nombreuses équipes de recherche fabriquent elles-mêmes leurs capteurs optiques. Les principales références pour les optodes pH, O_2 et pCO_2 mais également NH_4^+ et HS^- sont disponibles dans l'article de revue de Santner et al. 2015 avec la précision de l'indicateur luminescent (i.e. fluorescence ou phosphorescence) utilisé, ainsi que la matrice et les principales caractéristiques de l'optode ainsi obtenue.

A. Fonctionnement

Le principe de mesure de l'optode repose sur le changement des propriétés de fluorescence d'un fluorophore spécifique de l'analyte ciblé. Les fluorophores sont immobilisés au sein d'une matrice polymère perméable à l'analyte (i.e. H^+, O_2, CO_2,...), elle-même fixée sur un support (feuille polyester).

On obtient alors un capteur plan d'une dizaine de micromètres d'épaisseur dont la face « support » peut être collée contre le plexiglas d'un rhizobox/rhizotron, de manière à mettre en contact les fluorophores avec le sol une fois le rhizobox/rhizotron fermé. *Il existe des optodes fonctionnant sur un principe de phosphorescence mais nous ne détaillerons pas leur fonctionnement ici, dans la mesure où mes travaux se sont concentrés sur des optodes fonctionnant sur un principe de fluorescence.*

Un fluorophore est une molécule ayant la capacité (i) d'absorber des photons à une longueur d'onde particulière lors d'une phase d'excitation et de (ii) subséquemment réémettre des photons à une longueur d'onde plus élevée (spectre d'émission). La phase d'excitation fait passer les électrons dans un état excité alors que la phase d'émission correspond au retour de ces électrons à l'état fondamental. Entre ces deux phases a lieu un phénomène très rapide (10^{-12} secondes) pendant lequel une partie de l'énergie absorbée lors de l'excitation est perdue en chaleur : il s'agit de la relaxation vibrationnel des électrons excités. Le retour à l'état fondamental produit ainsi moins d'énergie que l'excitation n'en a consommée : les photons émis ont ainsi une énergie plus faible. La fluorescence émise est par conséquence d'une longueur d'onde plus élevée.

L'excitation des fluorophores se fait généralement par des LEDs qui présentent l'avantage d'avoir un champ d'émission étroit et un faible coût. Le spectre d'émission de la LED doit correspondre au spectre d'excitation du type de fluorophore utilisé.

Au niveau de ce que l'on mesure, deux cas existent : (1) la mesure de l'intensité de la fluorescence émise et (2) la mesure du temps de décroissance de fluorescence (fluorescence decay-time) du fluorophore.

La première méthode est présentée dans l'article de Blossfeld et al. (2013) et utilise une caméra comme détecteur. Les optodes PreSens utilisées dans cette thèse sont basés sur ce premier principe de fonctionnement. La seconde méthode est présentée dans l'article de Blossfeld et Gansert al (2007). Une fibre optique est utilisée pour la détection.

Mesure d'intensité de fluorescence : méthode ratiométrique et détection par caméra (CCD ou CMOS)

Le principe est basé sur la mesure de l'intensité de fluorescence émise lors du retour à l'état fondamental du fluorophore sensible au pH (dépendant de la concentration en analyte). Deux sources de problème peuvent cependant altérer la fiabilité et la répétabilité des mesures fondées sur l'intensité. La première source d'erreur est inhérente à l'optode et liée à sa qualité initiale – présence d'hétérogénéités de la concentration en fluorophores sur la matrice par exemple – et à sa conservation dans le temps – lixiviation des fluorophores dans la solution, détérioration de la qualité des fluorophores par photoblanchiment par exemple. La seconde source d'erreur est expérimentale et

peut correspondre notamment à une fluctuation de l'intensité lumineuse des LEDs excitatrices ou encore à l'intensité lumineuse parasite autour de l'optode lors des mesures. Une approche appelée en anglais « Fluorescence Ratiometric Imaging Measurement » (FRIM) permet de pallier ces problèmes (cf planche 2). Cette méthode est fondée sur un couple de fluorophores ayant le même spectre d'excitation mais un spectre d'émission différent ; l'un est sensible au pH, l'autre non. Il s'agit du principe de fonctionnement des optodes PreSens utilisées pendant cette thèse ; prenons donc cet exemple pour l'expliquer. PreSens fournit une caméra CCD équipée de LEDs émettant dans le bleu (470nm) permettant d'exciter le couple de fluorophores et de capter la fluorescence émise. Le spectre d'émission du fluorophore témoin est capté par le canal rouge de la caméra alors que le spectre d'émission du fluorophore sensible au pH est capté par le canal vert de la caméra. Le canal bleu ne collecte lui aucune intensité lumineuse en raison d'un filtre placé derrière l'objectif. Toute l'intensité lumineuse collectée par la caméra se répartit donc entre le canal rouge qui a collecté l'émission produite par les fluorophores témoins et le canal vert qui a collecté l'émission produite par les fluorophores sensibles au pH. En procédant à un ratio entre les canaux vert et rouge, il est possible de compenser la plupart des interférences environnementales et les possibles altérations de l'optode au moment de la mesure.

Avec cette méthode, nous obtenons en sortie une image RVB (ie à 3 canaux : rouge, vert, bleu) d'intensité à laquelle doit être appliquée le ratio R/V. Une calibration nous permet de traduire les valeurs de ratio en valeur de pH (cf partie « calibration » de ce chapitre).

Mesure de décroissance de fluorescence : méthode DLR et détection par fibre optique

Le principe est basé sur la mesure du temps de décroissance de fluorescence du fluorophore sensible au pH. Or, le temps de décroissance de fluorophore de la plupart des indicateurs sensibles au pH est de l'ordre de la nanoseconde ce qui nécessiterait un matériel sophistiqué et cher pour être détecté. Une méthode pour pallier ce problème est, en anglais, « Dual Lifetime Referencing » (DLR), que nous traduirons par « mesure de double vie ». Cette méthode utilise un couple de luminophores ayant le même spectre d'excitation ; l'un est le fluorophore sensible au pH (avec un temps de décroissance de l'ordre de la nano seconde), le second, non sensible au pH a un temps de décroissance de l'ordre de la micro seconde. L'intensité de fluorescence est convertie alors en un retard de phase.

Une fibre optique polymère de 2 mm de diamètre est utilisé pour (1) transférer la lumière d'excitation (470 nm) aux luminophores de l'optode et (2) récupérer les signaux optiques. Un logiciel spécifique (CommLogging : PreSens GmbH) permet de convertir ces signaux en une valeur de pH (après renseignement des données de calibration).

Nous obtenons ainsi en sortie directement une valeur de pH. Cependant cette valeur est calculée en moyennant les signaux émis par une zone de 2 mm² environ. Dans le cas d'une optode > 2 mm², c'est la répétition des mesures dans l'espace qui permet ensuite de recréer une carte du pH. Un bras peut être utilisé pour déplacer la fibre optique régulièrement et parcourir toute la surface de l'optode.

B. Paramètres généraux concernant la mesure optode

La résolution spatiale. Elle dépend principalement des caractéristiques de la caméra utilisée comme détecteur. La résolution spatiale maximale est déterminée par la taille du pixel du capteur de la caméra. Dans le cas des caméras CCD *high grade*, c'est typiquement 5.7*5.7 µm. Cependant la résolution maximale ne peut être atteinte que si le champ de la caméra (Field of view) le permet.

Le temps de réponse. Il dépend du temps nécessaire pour que l'analyte, au sein de la couche polymère, atteigne l'équilibre thermodynamique avec le milieu environnant. Ceci dépend de l'épaisseur de la couche sensible de l'optode qui doit être minimisé, ce qui nécessite l'emploi d'indicateur renvoyant une forte intensité lumineuse pour récupérer assez de signal (Bright indicators) (Mayr at al 2009). Classiquement, le temps de réponse est de l'ordre ou inférieur à la minute (les plus rapides sont des optodes O_2 utilisant des indicators ultra bright qui répondent en 1 à 2 s) (Mayr et al. 2009).

Plage dynamique. Les optodes O_2 présentent une large plage dynamique permettant des applications pour des teneurs en O_2 de 0 à 100 % d'air saturé. La gamme dynamique des optode CO_2 est de l'ordre de 0-20 à 0-40hpa (Zhu et al. 2006), et celle de l'optode NH_4^+ est de l'ordre de 10 µmoL – 100 mmoL (Stromberg 2008).

La plage dynamique des capteurs pH est principalement déterminée par la constante de dissociation acide pK_a du fluorophore. La gamme dynamique est typiquement +/- 1,5 unité pH autour du pK_a de l'indicateur (Wolfbeis 1997). Santner et al. présentent 5 indicateurs pH dans leur article de 2015 et l'on remarque que tous couvrent des plages de pH plus basique que 5 (5.5-9.5 pour HPTS, 7.2-9.3 pour DHFA et DHAE, 5-8 pour 5-hexadecnoylamino-florescein et 6-9 pour DHPDS). L'entreprise PreSens vient de commercialiser une optode dite « acide » en 2015 couvrant la plage de pH comprise entre 2 et 5. C'est le prototype de cette optode qui a été utilisé dans les expérimentations de cette thèse, *a priori* plus adaptée aux sols tropicaux de notre étude.

La stabilité du capteur durant son stockage ou une période de mesure longue est importante pour respecter la fidélité de la mesure. La première chose est de conserver l'optode à l'obscurité. Les deux principales causes d'altération de la stabilité sont ensuite la fuite de l'indicateur et le photoblanchiment. Le premier problème est évité lorsque les fluorophores sont liés de façon covalente à la matrice polymère. Lors des périodes de mesures prolongées en milieu biologique actif, il peut se produire un encrassement biologique de la surface de l'optode comme cela a été reporté dans le cas

de mesures en eaux usées, dû à l'action biologique d'animaux aquatiques (Hulth et al. 2002). Ces problèmes de bio-encrassement peuvent causer des erreurs dans la détermination de la concentration en analyte et ralentir le temps de réponse du capteur. L'encrassement biologique décrit dans ces articles est dû à l'activité biologique des animaux marins. Cependant, on peut se demander si un encrassement dû à l'activité biologique des racines ou des microorganismes du sol serait possible également. Ce point sera discuté dans la partie « Mesure optode in situ » de ce chapitre.

Interférences. La température peut modifier les propriétés de fluorescence des indicateurs et doit être compensée si elle ne peut pas être gardée constante (Borisov et al. 2011). On peut compenser la température en utilisant un fluorophore sensible à la température (Borisov et al. 2011. La mesure ratiométrique limite les interférences, cependant elle ne permet pas totalement de normaliser la température car les deux fluorophores (indicateur et témoin) n'ont probablement pas la même sensibilité aux variations de température.

La force ionique est le second paramètre pouvant affecter les mesures. En raison de leur matrice perméable aux protons, les optodes pH sont les plus exposées aux variations de la force ionique du milieu extérieur. Cela peut augmenter le pK_a de l'optode comme c'est le cas de l'optode pH présentée dans l'article de Zhu et al. 2005.

L'ion hydrogène est spécial d'un point de vue analytique puisqu'il est pratiquement toujours quantifié en terme de pH, soit le logarithme négatif de son activité, défini pour la première fois en 1924 par le chimiste danois Søren Sørensen : $pH = -\log a_H$. Le pH « électrode » est directement relié à a_H, l'activité des ions H^+, i.e. H_30^+ en solution, alors que les optodes pH mesurent en fait la concentration d'indicateur en forme acide et en forme basique. Or la force ionique influence les coefficients d'activité (théorie de Debye Hückel). Cela peut résulter en un décalage de la courbe de calibration (cf fig 4 de l'article : Santner et al. 2015). Le pK_a est seulement valide pour une force ionique donnée et une température donnée. Les optodes pH sont donc particulièrement sensibles à la force ionique. Leur sensibilité dépend en fait de la charge de l'indicateur pH utilisé et de la concentration en électrolyte dans l'échantillon (Wolfbeis 1997).

Calibration. Nous allons seulement expliquer la calibration pour les optodes pH ratiométriques, permettant de relier les valeurs de ratio d'intensité (ordonnées de la courbe de calibration) à des valeurs de pH (abscisses de la courbe de calibration). Les valeurs de pH suivent une réponse sigmoïdale dont le point d'inflexion correspond au pK_a de l'indicateur. Elle peut être déterminée en fixant 4 paramètres dans la relation suivante dérivée de l'équation de Boltzman. Une calibration à 5 points est généralement effectuée pour fixer ces paramètres. Une réponse de calibration sigmoïde implique

d'avoir des valeurs bornées de ratio et, suivant la pente de la sigmoïde, une plage dynamique assez réduite (cf. partie plage dynamique).

$$pH = a + b * log\left[\frac{c-d}{R-d} - 1\right]$$

$$a = pH_0 \quad b = dpH \quad c = R_{max} \quad d = R_{min}$$

Equation 1: Equation de Boltzman ainsi que les paramètres fixés par la calibration présentée planche 4.

Sensibilité. La sensibilité est définie comme la réponse incrémental du signal par unité d'augmentation de la concentration en analyte. Elle est généralement donnée par la pente de la courbe de calibration. Les optodes pH ont la plus grande sensibilité sur la gamme de pH à +/- 0.5 pK_a où la courbe a la pente la plus élevée et est quasiment linéaire (Larsen et al. 2011).

Précision. La précision est définie comme le standard de déviation du signal optode lorsque celle-ci est exposée à un milieu homogène. La précision peut être affectée par la réponse du capteur, signal non homogène lié au bruit, ou à l'homogénéité de l'optode. Nous verrons dans la partie « mesures in situ » qu'un effet de bord dû à un champ de vision de la caméra faible peut devenir gênant notamment aux pH acides pour lesquels l'intensité lumineuse émise par les fluorophores est réduite.

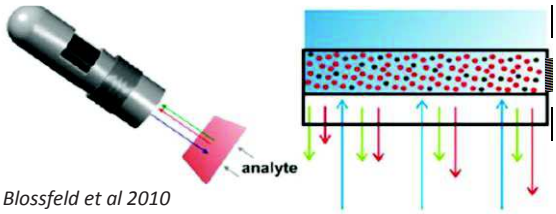
Trajet de la lumière. Le trajet de la lumière à travers la paroi transparente du rhizobox/rhizotron et les différentes couches du capteur (couche support et couche sensible de l'optode), peut influencer le résultat. Il faut donc s'assurer de travailler sur un plexiglas non rayé.

Analyse des images. Les images enregistrées contiennent plusieurs milliers de pixels. Les images sont souvent analysé par les logiciel ImageJ (Larsen et al. 2011) ou Matlab (Hakonen et al. 2010) ou des logiciel ayant des packages similaires. Les logiciels ImageJ et Fiji ont été utilisés dans cette thèse.

Planche 2

Principe de fonctionnement des optodes

- Description d'une optode planaire

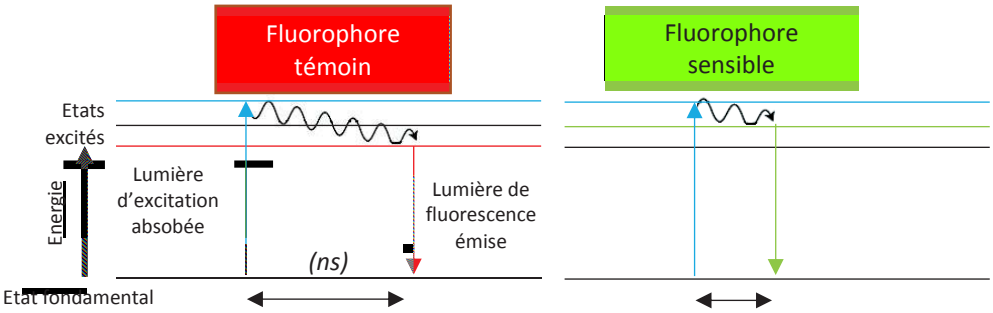


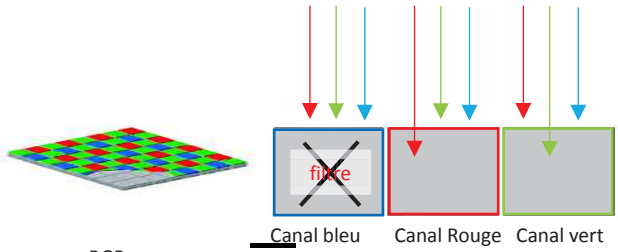
Blossfeld et al 2010

- Chaine « capteur (optode) – Détecteur (caméra USB + PC) »

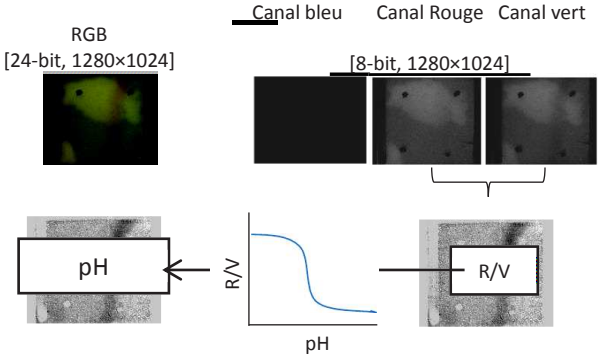
Blossfeld et al 2010

- Principe de fluorescence et de la mesure ratiométrique





La signal du fluorophore témoin est capté par le canal rouge alors que le signal du fluorophore sensible est capté par le canal vert



On obtient une carte du pH après l'application de la calibration sur l'image 8-bit obtenue par ratio entre les canaux rouge et vert

C. Analyse de la littérature existante

Les tableaux 2 à 6 présentent les publications proposées par le moteur de recherche WOS en entrant les mots clés « rhizosphere » et « optode » en mai 2016. Nous allons nous baser sur cette liste pour faire un état des lieux de l'utilisation des optodes pour l'étude de la rhizosphère, les résultats principaux mis en évidence par cette technique et les lacunes pouvant existées. Le tableau 1 résume quelques points marquants des tableaux 2 à 6.

Tableau 1 : Quelques données (nombre de publication, type d'optode utilisée, …) sur les publications utilisant les optodes pour l'étude du sol rhizosphérique.

Type d'optode	Nombre de publications	Problématique	Condition d'humidité		In situ	Couplage	Espèces
			Immergé	Autre			
pH	**4**	Localisation des zones d'acidification/alcalinisation sur le racine ; Effet du pH sur la disponibilité des éléments toxiques	2	2 (sans déficit en eau)	0	1 (GFP)	3 poacées (maïs, jonc, fétuque), 2 fabacées (haricot, lupin), une autre espèce herbacée
pH, pCO_2	**1**	Traits racinaires, Nodosités	1	0	0	0	1 poacée, 2 fabacées
O_2	**11**	Conditions redox en sol immergé - pertes en oxygène	10	1 (avec effet distribution en eau testée)	1 (en rizière)	1 (Neutron radiography); 2 (DGT)	5 plantes aquatiques (Zosteracées/Ruppiacée); 4 poacées (roseau/riz); 1 fabacée (lupin)
O_2, pH	**3** (dont une avec une hybride)	Conditions redox en sol immergé - pertes en oxygène	3	0	0	1 (Neutron radiography)	3 Juncacées (joncs); 1 fabacée (lupin); 1 herbacée, 1 poacée
NH_4^+	**1**	NH_4^+ turnover	1 (Solution)	0	0	0	1 solanacée

a. Commentaires généraux

Au niveau du type d'optode utilisé : sur les 20 publications recensées, 14 utilisent des optodes O_2, seulement 8 utilisent des optode pH, une seule publication utilise une optode pCO_2 et une également pour NH_4^+. Les optodes pH utilisées ont des plages dynamiques de pH > 5.

Au niveau des conditions d'études : seulement 3 études sur 20 ont été réalisées sur substrat non immergé en eau, mais sans conditions de déficit. On note qu'une étude utilisant des optodes O_2 a été réalisée in situ, en rizière. Les espèces végétales choisies pour ces études sont principalement des poacées et des fabacées (15/25). L'utilisation des optodes O_2 est souvent liée à des espèces aquatiques (5/15), ou vivant en marais (7/15). Aucune étude n'a été faite sur des racines d'arbre ou de plantule d'arbre.

Au niveau des techniques utilisées : dans 5 publications, la technologie optode est couplée à une seconde technique de pointe : la radiographie neutron (2) pour étudier la distribution de l'eau, les membranes DGT (2) pour avoir une information sur les activités enzymatiques ou le marquage GFP (1) pour l'identification des espèces poussant dans un même milieu. La technologie des optodes ne permet pas encore de travailler sur une grande diversité de variables (3 publiés sur un substrat solide

= O_2, pCO_2, pH). Pour réellement interpréter un effet rhizosphérique, il est donc parfois nécessaire de croiser plusieurs techniques. Une optode permettant de mesurer la concentration en nitrate sur une plage dynamique entre 1 et 50 mM est présenté dans l'article de Pedersen et al. (2015), elle n'a cependant pas encore fait l'objet de publication sur l'étude de la rhizosphère. Par ailleurs, l'équipe de Spohn et al. présente en 2013 une technique de zymographie in situ pour la localisation et la quantification des activités enzymatiques du sol au moyen de minces couches de gel avec des substrats embarqués. Après incubation, le substrat restant sur le gel est coloré et quantifié grâce à des courbes de calibration et un traitement d'images. Ils montrent grâce à cette technique que les zones d'activité intense de la phosphatase acide se trouvent proche des racines alors que les zones de forte activité en phosphatase alcaline se trouvent plus loin des racines. La phosphatase acide est donc principalement excrétée par les racines et les microorganismes associés à la rhizosphère alors que les phosphatases alcalines sont principalement produites par des microorganismes du sol non rhizosphérique. Cette différenciation spatiale de ces microorganismes a été interprétée comme une stratégie évitant la compétition pour les substrats organiques de P.

b. Principaux champs d'application et résultats obtenus

L'effet de l'activité des racines sur le pH rhizosphérique a été étudié par plusieurs auteurs. Blossfeld et al. 2007 ont mis en évidence des variations diurnes d'acidification des racines de Joncs atteignant jusqu'à 0.5 unité pH, particulièrement au niveau de la zone d'élongation. Rudolph et al. 2013 identifie également la zone d'acidification la plus intense entre 0.56 et 3.36 mm derrière les apex de racines de joncs et de lupins. Rudolph-Morh et al. en 2014 montrent que la localisation des zones d'acidifications intenses dépend de la concentration en eau de la rhizosphère. Ils trouvent que les valeurs de pH autour de racines de lupin situées dans des zones de faible teneur en eau étaient significativement plus faibles que pour le reste du système racinaire. Blossfeld et al. en 2010, rapproche les modifications de pH dans la rhizosphère aux conséquences sur la disponibilité d'un élément toxique pour la plante étudiée. Ainsi ils montrent que les racines de riz et de fétuque alcalinisent leurs rhizosphères jusqu'à 1.7 unité pH alors que le maïs acidifie sa rhizosphère jusqu'à -0.7 unité pH. Basé sur ces changements de pH, les auteurs calculent les concentrations locales en cadmium (Cd) dans la solution de sol et concluent que la concentration en Cd dans les pores de la rhizosphère des 2 premières espèces a été réduite 200 fois alors qu'elle a été multipliée par 3 chez le maïs. L'importance d'étudier les effets rhizosphériques en fonction de la position par rapport à l'apex a été montrée également en 2013 par Blossfeld et al. qui ont mis en évidence que l'apex des racines de blé acidifie légèrement alors que leur zone d'élongation alcalinise leur rhizosphère (>1unité pH). Ces auteurs montrent également que les racines et nodosités de pois-chiche acidifient lors de la fixation d'azote avec un cycle diurne, tandis que les racines en croissance de *V. juncea* influencent la concentration en CO_2 du sol sur plusieurs millimètres grâce à

l'utilisation d'une optode pCO_2. L'effet d'une culture associée sur les modifications de pH rhizosphérique a été étudié par Faget et al. en 2013 sur le haricot et le maïs doux issu de la lignée de maïs génétiquement modifié ETH-$M72_{GFP}$ et montrent que l'effet rhizosphérique sur le pH est plus fort quand les racines de haricot ou de maïs poussent seules en comparaison à une situation où elles poussent en association.

La majorité des travaux réalisés avec des optodes O_2 vise à étudier les pertes radiales en oxygène des racines de plantes aquatiques ou de marais ou la tolérance des espèces à l'inondation (Schreiber et al. 2012). Frederiksen et al. 2006 montrent que la fuite en oxygène est concentrée à la pointe des racines de *Zostera marina* (contrairement à la littérature antérieure). Ce résultat est confirmé sur la même espèce par Jensen et al. 2005 expliquant cela par la présence d'une barrière anti perte en O_2 présente sur la partie plus vieille des racines. Dickopp et al. 2011 testent l'influence de la matière organique du substrat sur l'aération du rhizome de Roseau commun et suggèrent que la libération d'O_2 à partir des racines est gênée en cas de sites très organiques par rapport à des conditions de faibles concentrations en matières organiques. Rudolph et al. 2012 montrent que les déficits d'oxygène observés à proximité des racines (lupins) résultent de la respiration des racines et apparaissent lorsque la ré-aération de l'atmosphère par les transports en phase gazeuse est limitée par la saturation en eau. L'acquisition des éléments traces par le riz a été étudiée *in situ* par Williams et al. en 2014 en utilisant une optode sandwich DGT/O_2. Les flux de fer sur la résine DGT seraient 3 fois plus importants au niveau des apex qu'au niveau du sol non rhizosphérique anaérobique.

Stromberg et al. en 2008 ont utilisé une optode NH_4^+ pour étudier le renouvellement en ammonium autour des racines de tomate et montrent que tout le système racinaire participe au prélèvement d'ammonium mais que les ramifications fines sont environ 2 fois plus efficaces que la racine principale.

Tableau 2 : Résultats concernant les optode O_2 utilisées seules.

Références	*Sujet*	*Espèce*	*Milieu*	*Résultat principal*
Frederiksen et al. 2006	Etude de la fuite radiale en oxygène des racines	Zostère marine	Sédiment	Fuite concentrée à l'apex des racines (contrairement à la littérature antérieure)
Jensen et al. 2005	Etude de la fuite radiale en oxygène	Zostère marine	Sédiment	Fuite concentrée aux apex en raison d'une barrière anti perte en O_2 présente sur la partie plus vieille des racines.
Dickopp et al. 2011	Influence de la matière organique du subtract sur l'aération du rhizome de Roseau commun	Roseau	Marais reconstitué	Libération d'O_2 à partir des racines gênée en cas de site très organiques par rapport à des conditions de faibles concentrations en matières organiques.
Zhu et al. 2014 (abstract)	Lien entre dynamique de O_2 et émissions de N_2O			Les émissions de N_2O augmentent directement après l'appauvrissement en O_2
Jovanovic et ak 2015 (abstract)	Impact de l'intensité lumineuse et de la concentration en O_2 de l'eau sur la perte radiale d'oxygène (ROL)	Zostère marine Ruppie maritime		R. maritime est capable de maintenir un « ROL » plus élevée que Z. marina
Koren et al. 2015	Cartographie de la distribution et de la dynamique de O_2 dans la rhizosphere d'algues sous l'effet de stress	Zostère marine	Sédiment reconstitué	La libération d'oxygène est plus élevée à la lumière qu'à l'obscurité et une hypoxie de la colonne d'eau diminue les taux de O_2 autour de la racine.
Koop-Jakobsen et al. 2015	Dynamique de O_2 dans la rhizosphere de plante poussant sur des sédiments	Spartine anglaise	Sédiments	L'oxygénation de la rhizosphère de *Spartina anglica* est temporellement et spatialement variable le long des racines
Larsen et al. 2015	Effet de la fuite radiale de O_2 (ROL) sur la disponibilité de O_2 dans la rhizosphere du riz	Riz asiatique	Sol saturé en eau	Hétérogénéité spatiale et temporelle de la dynamique de O_2 élevée et variation du ROL en fonction de la zone rhizosphérique

Tableau 3 : Résultats concernant les optode O_2 en association avec une seconde technique (non optode) : radiographie neutronique (Rudolph et al. 2012), Dispositif sandwich DGT/optode O_2.

Références	*But*	*Espèce*	*Milieu*	*Résultat principal*
Rudolph et al. 2012	Lien entre : O_2 ; Respiration racinaire ; Evapotranspiration ; Distribution en eau du sol	Lupins	Rhizobox : sable/quartz Saturé ou non en eau	Les déficits d'oxygène observés à proximité des racines résultent de la respiration des racines et apparaissent lorsque la ré-aération de l'atmosphère par les transports en phase gazeuse est limitée par la saturation en eau.
Williams et al. 2014	Acquisition des éléments traces chez le riz	Riz asiatique	***in situ*** **Rizière**	Le flux de fer vers la résine DGT au niveau des apex est 3x supérieure à celui dans le sol non rhizosphérique (anaérobique) et 27x supérieure au reste de la zone racinaire (aérobique).

Tableau 4 : Résultats concernant les optode pH (association optode pH/GFP dans la publie de Faget et al. 2013 ; utilisation de la fibre optique pour Blossfeld et al. 2007)

Référence	*But*	*Espèce*	*Milieu*	*Résultat principal*
Blossfeld et al. 2007	Dynamique du pH rhizosphérique	Jonc	Rhizobox θ_s	Variations diurnales d'acidification jusqu'à 0.5 unité pH, particulièrement au niveau de la zone d'élongation
Blossfeld et al. 2010	Calcul de [cd] en fonction du pH	Tabouret bleuâtre Mais ivraie vivace	rhizobox 80% θ_{cr} sols contaminés par des métaux lourds	$[cd]_{rhizo}$ x3 chez mais qui acidifie (-0.5 unité) et ÷200 chez les 2 autres espèces qui alcalinisant (+1.7 unité).
Rudolph et al. 2013	Distribution pH	Lupins Jonc	Rhizobox θ_s Sable/quartz	La zone d'acidification la plus intense se situe entre 0.56 et 3.36 mm de l'apex.
Faget et al. 2013	Effet de l'association de deux espèces sur l'effet rhizosphérique	Maïs ETH-M72$_{GFP}$ Haricot	Rhizobox θ_s 2/3 sol - 1/3 sable	L'effet rhizosphérique sur le pH plus fort quand les racines de haricot ou de mais poussent seules.

Tableau 5 : Résultats concernant les optodes pH utilisées en association avec les optode O_2 (Blossfeld et al. 2011 utilisent une optode hybride ; la publie de Rudolph-Mohr et al. 2014 associe la radiographie neutronique) ou les optode pCO_2 (Blossfeld et al. 2013a).

Référence	*But*	*Espèce*	*Milieu*	*Résultat principal*
Blossfeld et al. 2011	Effet des racines de plantes de marais sur l'abondance des acides organiques en fonction du pH	3 espèces de Joncs	Tourbe	Les 3 espèces montrent une fuite d'O_2 le long des racines mais une reponse différente quant à l'effet sur le pH rhizosphérique : acidification pour une espèce, alcalinisation pour une seconde et pas d'effet pour la dernière.
Schreiber et al. 2012	Etude de la tolérance à la submersion	*Arundinella anomala Alternanthere*	Rhizobox saturé en eau	Le système racianire reste parfaitement fonctionnel pendant et après les périodes d'innondation
Blossfeld et al. 2013	Dynamique de pH et de pCO_2 en fonction des traits racinaires	Blé Pois chiche (racines/ nodules) Jonc	Rhizobox saturé en eau (sable)	1. L'apex des racines de blé acidifie légèrement alors que leur zone d'élongation alcalinisent leur rhizosphere (>1unité pH) 2. Les racines et nodules de pois acidifient lors de la fixation d'azote et en cycles diurnaux 3. les racines en croissance de jonc influence le CO_2 du sol sur plusieurs millimètres
Rudolph-Mohr et al. 2014	Approche combinant la fluorescence à la radiographie de neutron	Lupin	Rhizotron	Le pH est significativement plus faible autour des racines situées dans les zones de faible teneur en eau qu'au niveau du reste du système racinaire

Tableau 6 : Résultat concernant l'utilisation d'une optode ammonium.

Référence	*But*	*Espèce*	*Milieu*	*Résultat principal*
Stromberg 2008	Etude du renouvellement en ammonium autour des racines de tomate	*Solanum lycopersicum*	Racine isolée dans un réservoir contenant du NH_4^+ ($500e^{-6}$M)	Tout le système racinaire participe au prélèvement d'ammonium mais les ramifications fines sont environ 2 fois plus efficaces que la racine principale

Références

Blossfeld S, Gansert D (2007) A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH dynamics in the rhizosphere of plants. Plant Cell Environ 30:176–186. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01616.x

Blossfeld S, Gansert D, Thiele B, et al. (2011) The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of Juncus spp. Soil Biol Biochem 43:1186–1197. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.02.007

Blossfeld S, Perriguey J, Sterckeman T, et al. (2010) Rhizosphere pH dynamics in trace-metal-contaminated soils, monitored with planar pH optodes. Plant Soil 330:173–184. doi: 10.1007/s11104-009-0190-z

Blossfeld S, Schreiber CM, Liebsch G, et al. (2013) Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO2 dynamics with planar optodes. Ann Bot 112:267–276. doi: 10.1093/aob/mct047

Borisov SM, Seifner R, Klimant I (2011) A novel planar optical sensor for simultaneous monitoring of oxygen, carbon dioxide, pH and temperature. Anal Bioanal Chem 400:2463–2474. doi: 10.1007/s00216-010-4617-4

Bravin MN, Michaud AM, Larabi B, Hinsinger P (2010) RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. Environ Pollut 158:3330–3337. doi: 10.1016/j.envpol.2010.07.029

Calvaruso C, Collignon C, Kies A, Turpault M-P (2014) Seasonal Evolution of the Rhizosphere Effect on Major and Trace Elements in Soil Solutions of Norway Spruce (<i>Picea abies Karst</i>) and Beech (<i>Fagus sylvatica</i>) in an Acidic Forest Soil. Open J Soil Sci 4:323–336. doi: 10.4236/ojss.2014.49034

Christel W, Zhu K, Hoefer C, et al. (2016) Spatiotemporal dynamics of phosphorus release, oxygen consumption and greenhouse gas emissions after localised soil amendment with organic fertilisers. Sci Total Environ 554:119–129. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.152

Davison W, Zhang H (1994) In-Situ Speciation Measurements of Trace Components in Natural-Waters Using Thin-Film Gels. Nature 367:546–548.

Dickopp J, Kazda M, Cizkova H (2011) Differences in rhizome aeration of Phragmites australis in a constructed wetland. Ecol Eng 37:1647–1653. doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.06.030

Ding S, Jia F, Xu D, et al. (2011) High-resolution, two-dimensional measurement of dissolved reactive phosphorus in sediments using the diffusive gradients in thin films technique in combination with a routine procedure. Environ Sci Technol 45:9680–9686. doi: 10.1021/es202785p

Ding S, Wang Y, Xu D, et al. (2013) Gel-Based Coloration Technique for the Submillimeter-Scale Imaging of Labile Phosphorus in Sediments and Soils with Diffusive Gradients in Thin Films. Environ Sci Technol 47:7821–7829. doi: 10.1021/es400192j

Faget M, Blossfeld S, Gillhaussen P von, et al. (2013) Disentangling who is who during rhizosphere acidification in root interactions: combining fluorescence with optode techniques. Front Funct Plant Ecol 4:n.p.

Frederiksen MS, Glud RN (2006) Oxygen dynamics in the rhizosphere of Zostera marina: A two-dimensional planar optode study. Limnol Oceanogr 51:1072–1083.

Garnett TP, Shabala SN, Smethurst PJ, Newman IA (2001) Simultaneous measurement of ammonium, nitrate and proton fluxes along the length of eucalypt roots. Plant Soil 236:55–62. doi: 10.1023/A:1011951413917

Glud RN, Ramsing NB, Gundersen JK, Klimant I (1996) Planar optrodes: A new tool for fine scale measurements of two-dimensional O-2 distribution in benthic communities. Mar Ecol Prog Ser 140:217–226. doi: 10.3354/meps140217

Hakonen A, Hulth S, Dufour S (2010) Analytical performance during ratiometric long-term imaging of pH in bioturbated sediments. Talanta 81:1393–1401. doi: 10.1016/j.talanta.2010.02.041

Henriksen G, Raman D, Walker L, Spanswick R (1992) Measurement of Net Fluxes of Ammonium and Nitrate at the Surface of Barley Roots Using Ion-Selective Microelectrodes .2. Patterns of Uptake Along the Root Axis and Evaluation of the Microelectrode Flux Estimation Technique. Plant Physiol 99:734–747. doi: 10.1104/pp.99.2.734

Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. (Special Issue: Rhizosphere: achievements and challenges.). Plant Soil 321:117–152.

Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytol 168:293–303. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x

Hulth S, Aller RC, Engstrom P, Selander E (2002) A pH plate fluorosensor (optode) for early diagenetic studies of marine sediments. Limnol Oceanogr 47:212–220.

Jensen SI, Khl M, Glud RN, et al. (2005) Oxic microzones and radial oxygen loss from roots of Zostera marina. Mar Ecol Prog Ser 293:49–58. doi: 10.3354/meps293049

Jovanovic Z, Pedersen MO, Larsen M, et al. (2015) Rhizosphere O-2 dynamics in young Zostera marina and Ruppia maritima. Mar Ecol Prog Ser 518:95–105. doi: 10.3354/meps11041

Koop-Jakobsen K, Wenzhoefer F (2015) The Dynamics of Plant-Mediated Sediment Oxygenation in Spartina anglica Rhizospheres-a Planar Optode Study. Estuaries Coasts 38:951–963. doi: 10.1007/s12237-014-9861-y

Koren K, Brodersen KE, Jakobsen SL, Kuehl M (2015) Optical Sensor Nanoparticles in Artificial Sediments-A New Tool To Visualize O-2 Dynamics around the Rhizome and Roots of Seagrasses. Environ Sci Technol 49:2286–2292. doi: 10.1021/es505734b

Larsen M, Borisov SM, Grunwald B, et al. (2011) A simple and inexpensive high resolution color ratiometric planar optode imaging approach: application to oxygen and pH sensing. Limnol Ocean Methods 9:361–379.

Larsen M, Santner J, Oburger E, et al. (2015) O-2 dynamics in the rhizosphere of young rice plants (Oryza sativa L.) as studied by planar optodes. Plant Soil 390:279–292. doi: 10.1007/s11104-015-2382-z

Luster J (ed) (2006) Handbook of methods used in rhizosphere research. Section " Sampling of rhizosphere soil for physico-chemical and mineralogical analyses by physical separation based on drying and shaking" 179–199. Swiss Federal Res. Inst. WSL, Birmensdorf

Marschner H, Roemheld V (1983) A Simple Method to Demonstrate Ph Changes at the Soil-Root Interface (rhizosphere). Plant Physiol 72:152–152.

Marschner H, Romheld V, Horst W, Martin P (1986) Root-Induced Changes in the Rhizosphere - Importance for the Mineral-Nutrition of Plants. Z Pflanzenernahrung Bodenkd 149:441–456. doi: 10.1002/jpln.19861490408

Mayr T, Borisov SM, Abel T, et al. (2009) Light Harvesting as a Simple and Versatile Way to Enhance Brightness of Luminescent Sensors. Anal Chem 81:6541–6545. doi: 10.1021/ac900662x

Newman I, Kochian L, Grusak M, Lucas W (1987) Fluxes of H+ and K+ in Corn Roots - Characterization and Stoichiometries Using Ion-Selective Microelectrodes. Plant Physiol 84:1177–1184. doi: 10.1104/pp.84.4.1177

Pedersen LL, Dechesne A, Smets BF (2015) A nitrate sensitive planar optode; performance and interferences. Talanta 144:933–937. doi: 10.1016/j.talanta.2015.07.046

Pilet P, Versel J, Mayor G (1983) Growth Distribution and Surface Ph Patterns Along Maize Roots. Planta 158:398–402. doi: 10.1007/BF00397731

Plassard C, Guérin-Laguette A, Véry A-A, et al. (2002) Local measurements of nitrate and potassium fluxes along roots of maritime pine. Effects of ectomycorrhizal symbiosis. Plant Cell Environ 25:75–84. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00810.x

Plassard C, Meslem M, Souche G, Jaillard B (1999) Localization and quantification of net fluxes of H+ along maize roots by combined use of pH-indicator dye videodensitometry and H+-selective microelectrodes - art%3A10.1023%2FA%3A1004560208777.pdf.

Rudolph N, Esser HG, Carminati A, et al. (2012) Dynamic oxygen mapping in the root zone by fluorescence dye imaging combined with neutron radiography. J Soils Sediments 12:63–74. doi: 10.1007/s11368-011-0407-7

Rudolph N, Voss S, Moradi AB, et al. (2013) Spatio-temporal mapping of local soil pH changes induced by roots of lupin and soft-rush. Plant Soil 369:669–680. doi: 10.1007/s11104-013-1775-0

Rudolph-Mohr N, Vontobel P, Oswald SE (2014) A multi-imaging approach to study the root-soil interface. Ann Bot 114:1779–1787. doi: 10.1093/aob/mcu200

Ruiz L, Arvieu JC (1990) Measurement of pH gradients in the rhizosphere. Symbiosis Rehovot 9:71–75.

Santner J, Larsen M, Kreuzeder A, Glud RN (2015) Two decades of chemical imaging of solutes in sediments and soils – a review. Anal Chim Acta 878:9–42. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.006

Schreiber CM, Zeng B, Blossfeld S, et al. (2012) Monitoring rhizospheric pH, oxygen, and organic acid dynamics in two short-time flooded plant species. J Plant Nutr Soil Sci 175:761–768. doi: 10.1002/jpln.201000427

Sokolova TA (2015) Specificity of soil properties in the rhizosphere: Analysis of literature data. Eurasian Soil Sci 48:968–980. doi: 10.1134/S1064229315050099

Spohn M, Kuzyakov Y (2014) Spatial and temporal dynamics of hotspots of enzyme activity in soil as affected by living and dead roots-a soil zymography analysis. Plant Soil 379:67–77. doi: 10.1007/s11104-014-2041-9

Stromberg N (2008) Determination of ammonium turnover and flow patterns close to roots using Imaging optodes. Environ Sci Technol 42:1630–1637. doi: 10.1021/es071400q

Williams PN, Santner J, Larsen M, et al. (2014) Localized Flux Maxima of Arsenic, Lead, and Iron around Root Apices in Flooded Lowland Rice. Environ Sci Technol 48:8498–8506. doi: 10.1021/es501127k

Wolfbeis OS (1997) Chemical sensing using indicator dyes.

York LM, Carminati A, Mooney SJ, et al. (2016) The holistic rhizosphere: integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. J Exp Bot 67:3629–43. doi: 10.1093/jxb/erw108

Zhu K, Bruun S, Larsen M, et al. (2014) Spatial Oxygen Distribution and Nitrous Oxide Emissions from Soil after Manure Application: A Novel Approach Using Planar Optodes. J Environ Qual 43:1809–1812. doi: 10.2134/jeq2014.03.0125

Zhu Q, Aller RC, Fan Y (2006) A new ratiometric, planar fluorosensor for measuring high resolution, two-dimensional pCO2 distributions in marine sediments. Mar Chem 101:40–53. doi: 10.1016/j.marchem.2006.01.002

Zhu Q, Aller RC, Fan Y (2005) High-Performance Planar pH Fluorosensor for Two-Dimensional pH Measurements in Marine Sediment and Water. Environ Sci Technol 39:8906–8911. doi: 10.1021/es051023m

Zoysa AKN, Loganathan P, Hedley MJ (1997) A technique for studying rhizosphere processes in tree crops: soil phosphorus depletion around camellia (Camellia japonica L.) roots. Plant Soil 190:253–265. doi: 10.1023/A:1004264830936

2. Essais pour l'utilisation in situ et en profondeur des optodes pH

Développement méthodologique de l'utilisation *in situ* des optodes pH pour l'étude du fonctionnement des racines fines profondes

Céline Pradier[1], Daniela Achatz[2], Gabrielle Daudin[3], Philippe Hinsinger[3], Christian Krause[2], Jean-Paul Laclau[1], Jean-Pierre Bouillet[1], Christophe Jourdan[1]

[1]CIRAD, UMR Eco&Sols, Montpellier, France, [2] PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, Germany, [3] INRA, UMR Eco&Sols, Montpellier, France. *Contact:* celine.pradier@cirad.fr

L'étude de la littérature « optode » fait apparaitre une lacune concernant (1) l'application *in situ* des optodes pH et (2) l'application des optodes pour l'étude des racines d'arbres.

Un objectif de cette thèse a donc été de tester l'application *in situ* des optodes, en plantation d'eucalyptus au Brésil, sur le site expérimental présenté à la fin de la partie d'introduction de la thèse. Un dispositif de fosses a été installée dans le bloc 1 en réduction des pluies (-W) et en parcelle témoin (+W) afin d'accéder aux racines profondes.

Ce choix de dispositif expérimental est innovant dans l'application des optodes par :

- L'espèce utilisée : eucalyptus de 5 ans
- L'application *in situ*
- Le type de sol : tropical acide
- La profondeur du sol
- La réduction des pluies

I. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

A. Fosses & Rhizotrons

Afin d'avoir accès au profil complet de sol potentiellement colonisé par les racines d'eucalyptus, deux fosses de 1,5 m de diamètre ont été ouvertes jusqu'à la nappe phréatique, atteignant ainsi une profondeur de 17 m. L'ouverture de ces tranchées a été réalisée entre février et mars 2014 par l'entreprise Floragro. A l'ouverture des tranchées, le front racinaire atteignait 12 m. La planche 3 présente les fosses. Vingt rhizotrons, répartis sur 8 profondeurs ont été installés dans chacune des 2 fosses.

Les rhizotrons utilisés ont été spécialement conçus pour cette étude en offrant la possibilité d'être ouverts et refermés facilement pour permettre la pose des optodes. Ils sont composés de 2 plaques amovibles de plexiglas (Plexiglas, 10x20 cm ; épaisseur : 4 mm ; ABAQUEPLAST, Stains, France) vissées sur un cadre en aluminium assurant une rigidité à la structure. Le cadre en aluminium se fixe sur le sol à l'aide de vis à ces 4 coins (Planche 3).

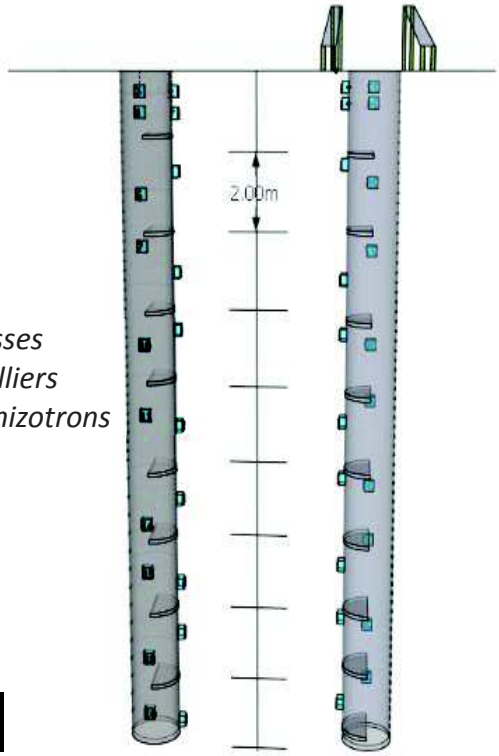
Après l'ouverture d'espaces de 40 par 40 cm dans les buses en béton, les 30 premiers centimètres de sol ont été retirés afin d'éviter toute contamination liée au creusement des fosses ou à la pause des buses. La méthode de pose consiste alors à créer une surface parfaitement plane sur laquelle viendra reposer le rhizotron. Si cette méthode présente l'avantage d'avoir une surface de sol non remanié derrière les plaques de plexiglas, elle s'est avérée inapplicable en traitement –W pour lequel le sol très sec était trop friable. Une nouvelle méthode de pose a donc été mise au point pour s'affranchir de ce problème, qui a consisté à créer une boue (mélange sol/eau distillée) et à l'étaler sur le rhizotron (dont les vitres de plexiglas auront été préalablement recouvertes d'un film afin que la boue ne reste pas adhérente au plexiglas). Le rhizotron et la pellicule de sol humide sont plaqués à l'emplacement voulu et fixés par les 4 vis angulaires. Une porte métallique a été installée devant chaque rhizotron afin de minimiser les échanges avec l'environnement de la fosse.

Planche 3

Dispositif mesure optode en profondeur

a

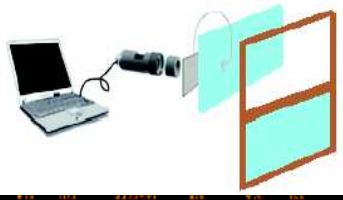
-W +W

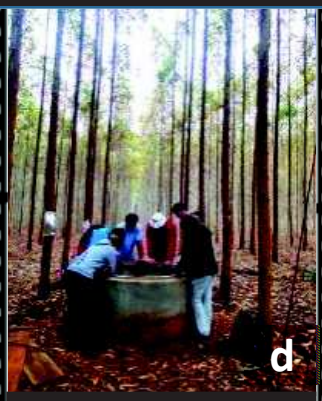


2 fosses
8 palliers
20 rhizotrons

b

c




d

e

f

g

h

i

a et e. Vu du haut de la fosse, b. représentation 3D des fosses, c. dispositif de mesure optode, f. porte métallique des rhizotrons; g. rhizotron fermé, h. Rhizotron dont la plaque supérieur a été retirée pour placer une optode, i. mesure optode en fosse.

B. Les optodes

Le système de mesure comporte une caméra à port USB associé à un logiciel (VisiSens ; PreSens GmbH, Regensburg, Germany) et des optodes pH de plage dynamique acide, prototype en 2015 et aujourd'hui commercialisées par PreSens (product code ; PreSens GmbH). Les LEDs d'excitation, les filtres optiques, les lentilles et la puce de la camera sont rassemblés dans un tube en aluminium de 10 cm de longueur et 3.5 cm de diamètre pouvant se connecter via un port USB2.0 à un PC. La caméra délivre des images RGB 24-bit, 1280 × 1024 (1.3 mégapixel) contenant la réponse brut du capteur. Lorsque le tube aluminium est plaqué contre le plexiglas, la caméra est à une distance de 4 mm des optodes ce qui résulte en un champ de vue de 15*12 mm et une résolution de 10 μm ou chaque pixel contient une information discrète de la quantification de l'analyte. Le champ de vue détermine la part interprétable de l'image obtenue ; si l'optode est plus grande, la caméra doit être déplacée et les images doivent être recombinés ensuite. La résolution temporelle renseignée par le constructeur est de l'ordre de la minute. Nous discuterons de ce point ensuite. Un schéma du dispositif est disponible planche 2. Le logiciel fourni par PreSens (VisiSens AnalytiCal 1 ; PreSens GmbH) permet d'acquérir les images et propose aussi une interface pour le traitement. Cependant, afin d'avoir plus de contrôle sur les étapes de traitement des images, les logiciels ImageJ et Fiji ont été utilisés pour traiter les images brutes acquises.

La taille choisie pour les optodes est 0.7 cm x 0.7 cm. Les deux faces des optodes ne sont pas identiques, le côté « rose » est la face support non réactive de l'optode, qui va être collée sur le plexiglas. La seconde face, présente à sa surface les fluorophores, qui seront en contact avec le sol. Lors du collage, il faut s'assurer de ne pas faire de bulles entre le plexiglas et l'optode, ce qui pourrait interférer avec le trajet de fluorescence et fausser les ratios (cf point sur trajet de la lumière). De la vaseline a été utilisée en premier lieu car l'optode est facilement retirable du rhizotron après la mesure, sans rayer le plexiglas. La glue, rend la pose plus simple mais on condamne alors la partie de rhizotron utilisée. Le climat du brésil rend l'utilisation de la vaseline plus compliquée. Une solution alternative a été la pose des optodes sur une plaque de plexiglas indépendante de la plaque de plexiglas fermant le rhizotron que l'on pose au contact du sol le temps de la mesure.

Les sols du Brésil sont beaucoup plus acides que de nombreux sols agricoles sous climats tempérés ; les optodes jusque-là utilisée en rhizobox visent un pH compris entre 7 et 9, alors que les sols du brésil sont autour de 5 et une hypothèse est que la racine acidifie ces sols. L'entreprise PreSens a développé une nouvelle optode pour des gammes de pH, idéalement entre 2.5 et 5. Cette gamme correspond mieux aux sols de l'expérimentation mais est légèrement basse, notamment lorsqu'elle est utilisée dans les conditions du Brésil (cf calibration).

II. CALIBRATION

Une calibration des optodes doit être réalisée avant et après la phase expérimentale afin de prendre en compte les possibles décalages dans la réponse de l'optode. L'âge et le photoblanchiment peuvent altérer la réponse et résulter en un décalage (Blossfeld et al. 2013). Nous verrons dans cette étude, que le simple contact avec les racines d'eucalyptus altère le signal. Les phases de calibration et recalibration doivent être réalisées dans les mêmes conditions extérieurs que les mesures en fosses : température, luminosité, force ionique, ce qui est parfois compliqué dans l'application *in situ* des optodes. D'autre part, et cela n'est pas spécifique de l'application *in situ*, les calibrations sont réalisés en solution bien que les mesures soient faites sur du sol en raison de la difficulté de réaliser une gamme de pH précise (et facilement contrôlable et mesurable) avec du sol.

A. Obtention de la relation pH - ratio

Les tampons de calibrations sont réalisés à partir de deux solutions tampons citrates de force ionique proche de celle du sol (IS=5 mM). Une solution A d'acide citrique + NaCl ainsi qu'une solution B d'acétate de sodium déshydraté sont préparés tel que FI = 60 mM. Les solutions A et B sont ensuite diluées au 1/12 pour obtenir les solutions A' et B' telles que IS 5 mM. A' B' sont ensuite mélangés de manière à obtenir au moins 5 tampons de pH compris entre pH 2 et 5 (Tableaux 7-8). Le pH est ensuite ajusté avec une solution de HCl ou NaOH concentrée et le pH est contrôlé à l'aide d'un pH mètre. Chaque tampon est laissé 10 minutes au contact de l'optode pH. Une modélisation par l'équation de Boltzman est réalisée à partir des valeurs de ratio obtenues et utilisée pour convertir les cartes d'intensité en carte de pH.

Tableau 7 : Solutions A et B.

Solutions	Produits	MW	C (mM)	V (L)	FI (mM)	m à peser (g)
A	acide citrique	192.5	20	0.1	60	0.385
	NaCl	58.44	60	0.1	60	0.3506
B	sodium acétate dihydraté	294.1	20	0.1	60	0.5882

Tableau 8 : Proportions des solutions A' et B' pour obtenir 6 tampons entre pH 2.5 et pH 5.

pH	A' (ml)	B' (ml)
2.5	20	0
3	18.6	1.4
3.6	14.8	5.2
4	13.2	6.8
4.6	10.2	9.8
5	8.2	11.8
V total	85	35

La planche 4 présente une calibration et permet d'introduire plusieurs remarques. On constate que la gamme de pH optimale est relativement réduite et comprise entre pH 2.5 et 4.5. Or des mesures de pH classique par extraction $CaCl_2$ suivant la norme NF ISO 10390 ont montré que les valeurs de pH du sol non rhizosphérique le long du profil sont comprises entre 5 et 5.5, ce qui peut être une limite à la précision des mesures, notamment dans l'hypothèse où la racine n'acidifierait pas mais alcaliniserait son milieu. D'autre part, on constate un phénomène d'effet de bord sur l'image obtenue, qui devient particulièrement important et gênant pour les pH < 3,5 pour lesquels les fluorophores sensibles au pH n'émettent qu'une faible intensité. Cet effet de bord a été évalué en comparant les ratios calculés sur différentes régions d'intérêts (voir planche 4 : RC RE RN RO RB). Pour les pH <3.5, la valeur du ratio est plus élevée lorsque l'on s'éloigne du point central de l'image (RC). La région RB atteint un ratio > 5 et montre donc que les bords de l'image sont difficilement exploitables.

Ces effets de bords nous confortent dans le choix d'utiliser des optodes de taille réduite (0.7*0.7mm). En effet l'utilisation d'optodes plus grandes est possible en prenant plusieurs images décalées dans l'espace et en les recombinants ensuite avec un logiciel de traitement d'image type Fiji (macro 2D Stitching). Cependant les zones à l'angle de 4 images seront reconstruites à partir des bords des 4 images adjacentes et donc auront une information faussée.

La planche 4 montre les points de calibration obtenus, dans les conditions du Brésil, ainsi que la courbe de modélisation calculée à partir de l'équation de Boltzman (équation 1). Les coefficients a, b, c, d ont respectivement été fixés à 2.7, 0.36, 3.4, 0.98.

$$pH = a + b * log\left[\frac{c-d}{R-d} - 1\right]$$

$$a = pH_0 \quad b = dpH \quad c = R_{max} \quad d = R_{min}$$

Equation 1: Equation de Boltzman ainsi que les paramètres fixés la calibration présentée planche 4.

B. Phase d'équilibration

La mesure de calibration se fait après 30 min de contact entre l'optode et la solution. Les optodes sont préalablement mises en contact avec un tampon citrate de 60 mM pendant une durée de 3 h ; il s'agit de la phase d'équilibration pendant laquelle l'optode initialement sèche va se gorger d'eau. Sa matrice va gonfler légèrement et rendre les fluorophores plus accessibles et donc plus réactifs. La force ionique du tampon utilisé est de 5 mM pour se rapprocher des conditions du sol. Cependant, le contact prolongé des optodes avec un milieu de force ionique faible (<40 mM) est susceptible de détériorer les fluorophores ; c'est pourquoi la phase d'équilibration est réalisée dans une solution de force ionique égale à 60 mM.

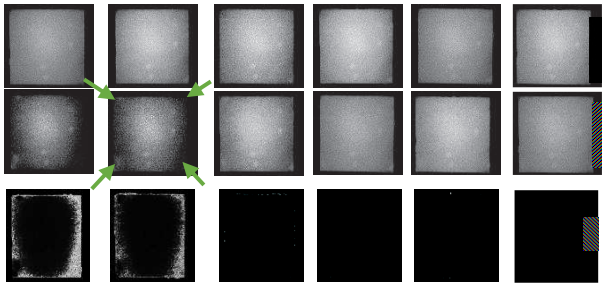
C. Recalibration des optodes

Après la mesure, une recalibration partielle de l'optode doit être effectuée pour vérifier si l'optode fonctionne normalement et donc si les ratios mesurés en expérimentation peuvent être exploités avec la calibration précédente. La réaction des fluorophores avec les ions hydrogène étant réversible, lors de la recalibration dans un tampon, les ratios sur l'optode doivent être parfaitement homogènes (aux effets de bords près...).

Planche 4

Calibration des optodes

Tampons pH



Canal R « rouge »

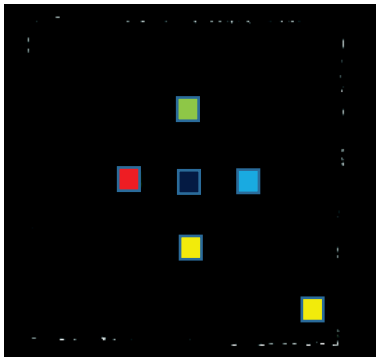
Canal G « vert »

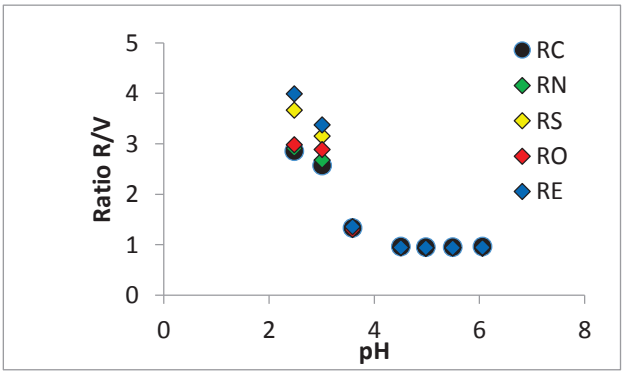
Ratio R/V

Effet « bord » important pour pH <3.5 sur le canal vert.

Détermination de la moyenne des ratios obtenus sur 5 régions de l'optode: RC, RN, RO, RE, RS et RB.

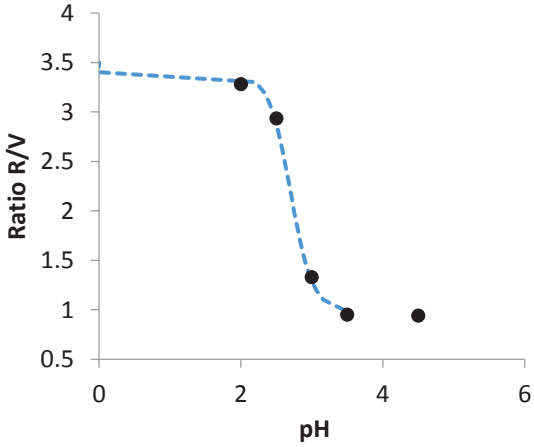
Pour les pH <3.5, la valeur du ratio est plus élevée lorsque l'on s'éloigne du point central de l'image (RC). La région RB atteint un ratio > 5 et n'est donc pas représentée sur le graphique ci-dessous.





Grande variabilité spatiale depuis le centre vers l'extérieur de l'optode

Résultat de la calibration en prenant la zone RC



Modélisation de la courbe

$$pH = a + b * \log((c-d)/(R-d)-1)$$

pH0	a	2.7
dpH	b	0.36
rmax	c	3.4
rmin	d	0.98

La plage optimale de fonctionnement est pH 2-4

III. MESURES, LIMITES

Concernant le dispositif : Une sécheresse particulièrement intense a frappé notre zone d'étude en 2014. Cette sécheresse, une des plus importantes survenues au Brésil en 84 ans (Peixoto et Pitombo, 2015) a considérablement affecté la colonisation des rhizotrons par les racines.

Concernant les mesures optodes en fosse : la planche 5 présente trois exemples de mesure réalisée en fosse. L'image obtenue traduit une acidification du sol rhizosphérique par la racine. Cependant lorsque l'optode ayant servie à la mesure est placée dans un tampon, on voit que le signal n'est pas réversible. L'optode est en fait également « tâchée » à l'œil nu (Figure 2). Lors de la recalibration, le signal provoqué par la racine persiste. Il n'est pas possible de distinguer la part du signal non perturbé et donc d'interpréter l'image en terme de pH. Le second exemple montre que le signal parasite augmente au cours du temps, pouvant s'étendre au-delà de la racine. L'encrassement biologique des optodes en condition marine est évoqué dans certains articles (Farhat et al. 2015), mais pas de commentaires sur d'éventuels encrassements par des activités biologiques du sol ou des racines.

Figure 2. Photo d'une optode tachée (marques oranges) après avoir été mise en contact avec une racine.

La question de l'humidité : Dans les expérimentations en rhizobox, ceux-ci sont saturés en eau. Dans notre expérimentation, les sols ont un pourcentage massique d'humidité très faible (<8%). Or, la solution du sol doit jouer le rôle de la phase d'équilibration. Dans le cas de sols avec une trop faible teneur en eau, cette phase d'équilibration ne peut être réalisée sur le lieu de la mesure. Chaque optode, avant mesure, passe donc par la phase d'équilibration décrite dans la partie calibration. Cette phase permet de diminuer le temps de réponse du capteur mais n'a pas résolu le problème d'un signal persistant lors de la recalibration.

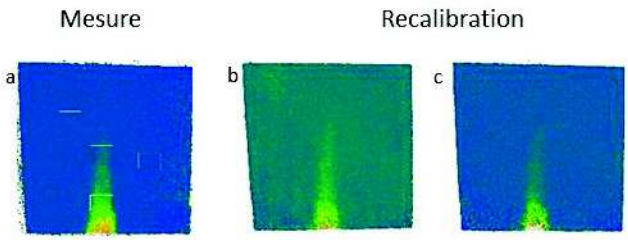
La question de l'espèce ciblée : Nous avons vu sur les mesures présentées qu'un signal parasite le signal des fluorophores au niveau des racines d'eucalyptus. Les eucalyptus semblent produire une substance incompatible avec la matrice des optodes qui émet dans le même domaine ou alors, qui occulte le passage de la réponse du capteur. Des mesures en surface ont été réalisées sur des racines de pin, en comparaison de mesures réalisées dans les mêmes conditions sur des racines d'eucalyptus (planche 6). Il semblerait que le pin ne provoque pas ce signal irréversible sur l'optode. Dans le cas du pin, l'empreinte de la racine correspond donc bien à un changement réversible des propriétés du fluorophore sensible au pH. On retrouve une image homogène lorsque l'optode est en contact avec un milieu de pH homogène. On peut donc conclure que les racines de pin ont acidifié leur rhizosphère.

Planche 5

Mesures optode en fosses

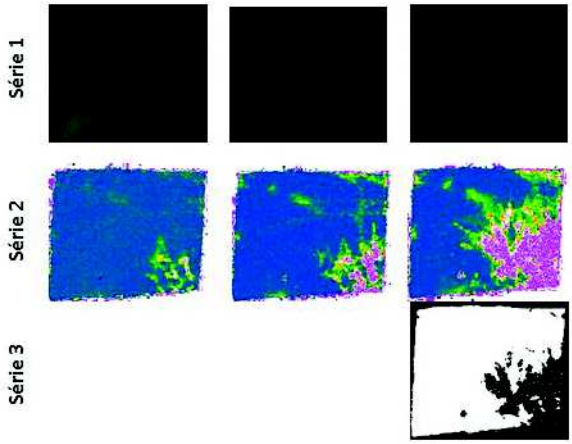
- Signal irréversible produit par la racine

Racine blache mais pas en croissance



Lors de la recalibration, le signal provoqué par la racine persiste. Il n'est pas possible de distinguer la part du signal non perturbé.

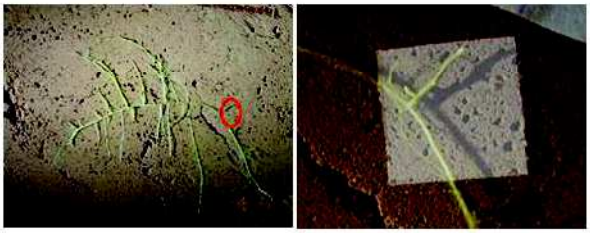
- Signal parasite augmentant au cours du temps



Série 1: Images RGB.
Série 2: Ratio R/V. La couleur violette représente les valeurs pour lesquelles le ratio est égal à 0.
Série 3: canal vert. la couleur noir représente les valeur de gris = 0.

Les fluorophores du canal vert sont détériorés ou obstrués par une molécule parasitant le signal.

- Présence de racines ectomycorhizées



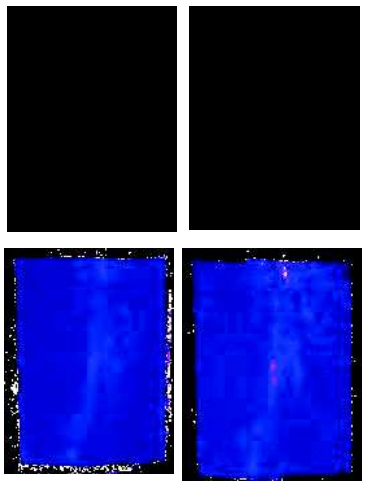
Le signal provoqué par la racine ectomycorhizée persiste lorsque l'optode est mise dans un milieu homogène en pH.

Planche 6

Comparaison mesures sur Pin et sur Eucalyptus

Cas de l'eucalyptus, surface

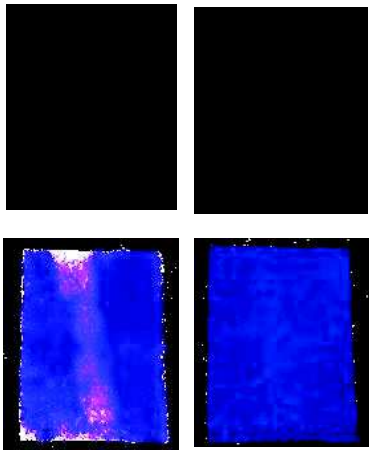
Mesure Recalibration



L'empreinte de la racine persiste lorsque l'optode est exposé à un milieu homogène. On ne peut pas conclure.

Cas du pin, surface

Mesure Recalibration



L'empreinte de la racine correspond bien à un changement réversible des propriétés du fluorophore sensible au pH. On retrouve une image homogène lorsque l'optode est en contact avec un milieu de pH homogène. On peut donc conclure que les racines de pin ont acidifiés leur rhizosphère.

IV. Conclusion – Perspectives

Le dispositif présenté dans cette thèse semble être compatible avec le fonctionnement des optodes. La phase d'activation hors milieu de mesure permet d'améliorer la réponse du capteur à faible humidité. En revanche, l'eucalyptus semble produire une substance ne permettant pas de convertir l'image ratiométrique d'intensités en image pH. Par ailleurs, l'optode acide développée par l'entreprise PreSens semble avoir une plage dynamique légèrement trop acide pour notre étude. Cependant, l'essai sur les racines de pin rend les perspectives d'utilisation des optodes *in situ* en plantation forestière prometteuse.

En perspective pour les futurs essais in situ des optodes, afin de s'affranchir de certaines contraintes, on pourrait proposer :

- De travailler sur une autre espèce que l'eucalyptus
- De travailler en milieu tempéré (ou tropical) avec des sols correspondant parfaitement avec la plage dynamique de l'optode utilisée
- De faire des mesures en période humide
- D'optimiser la calibration en condition au champ

En perspective pour la thèse :

Même s'il est délicat d'interpréter les valeurs de pH obtenues, les résultats vont tout de même dans le sens d'une acidification de la rhizosphère par les racines d'eucalyptus. Nous allons utiliser une méthode classique de collecte puis d'analyse destructive pour confirmer, à l'échelle du système racinaire global, cette tendance d'acidification constatée à l'échelle d'une racine.

Cette phase de développement méthodologique a également permis de constater une présence importante de racines ectomycorhizées derrière les fenêtres rhizotrons. La littérature actuelle sur la mycorhization se limite à l'étude dans les premiers centimètres de sol or il semblerait que des ectomycorhizes soient capables de coloniser des profondeurs importantes (Lambais et al. *in prep.*). Afin de s'assurer que les ectomycorhizes observées derrière les rhizotrons ne sont pas arrivées en profondeur à cause de contaminations, le chapitre 3 de la thèse présente une collecte de racines jusqu'4 m de profondeur dans le but de prouver leur présence en profondeur et d'identifier les espèces présentes, en prêtant attention à un éventuel effet profondeur et réduction des précipitations. D'autre part, le fait que les racines d'eucalyptus tachent les optodes peut laisser penser à une sécrétion par les racines, d'une substance organique. Une collecte d'exsudats racinaires *in situ* et en profondeur a été réalisée jusqu'à 4 m en suivant le protocole illustré annexe 3 (adapté de Michalet et al. 2013). Cependant, les résultats n'ont pas permis de conclure et ne seront donc pas présentés dans cette

thèse. Une des raisons pouvant expliquer que la collecte n'ait pas fonctionnée est l'état des racines en profondeur au moment de la collecte : pas de racines en croissance, beaucoup de racines paraissant mortes. La présence de ces racines sans croissance pose par ailleurs plusieurs interrigations : sont-elles inactives mais non dégradées (flux de décomposition faible) ? Certaines sont-elles au contraire toujours fonctionnelles ? Sont-elles temporairement inactives ? Autant de questions encore en suspend.

REFERENCES

Blossfeld S, Schreiber CM, Liebsch G, et al. (2013) Quantitative imaging of rhizosphere pH and CO2 dynamics with planar optodes. Ann Bot 112:267–276. doi: 10.1093/aob/mct047

Lambais G-R *, Jourdan C *, Piccolo M-C, et al. (*in preparation*) Fine roots dynamics of Eucalyptus trees in a depth tropical soil: effects of soil depth, diameter classes and mycorrhizal status

Michalet S, Rohr J, Warshan D, et al. (2013) Phytochemical analysis of mature tree root exudates in situ and their role in shaping soil microbial communities in relation to tree N-acquisition strategy. Plant Physiol Biochem 72:169–177. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.003

Peixoto P, Pitombo JP (2015) Off-Season Drought Makes 93 Brazilian Cities Cut Off Water. Folha de S.Paulo.

Chapitre 2

Nutrition minérale et altération

ARTICLE 1. La réduction des précipitations affecte les propriétés géochimiques de la rhizosphère en plantation d'eucalyptus sur sols ferralitiques profonds au Brésil.

ARTICLE 2. La réduction des pluies n'affecte pas la disponibilité en aluminium et en nutriments pendant la saison des pluies dans des plantations d'eucalyptus sous climat subtropical humide.

Introduction du chapitre

La thèse vise à évaluer si la profondeur et la modification des précipitations affectent le fonctionnement des racines. Nous avons vu dans le premier chapitre que les racines peuvent interagir avec leur milieu. Nous n'avons pas pu le démontrer à cause des problèmes liés à l'utilisation des optodes pH dans les conditions de notre étude, mais une tendance à l'acidification a été notée. Or nous avons vu que les changements de pH peuvent être déterminant pour la mobilisation des nutriments de la rhizosphère, par le phénomène d'altération. Dans ce chapitre, nous nous proposons de mesurer et comparer, par une méthode destructive, le pH du sol rhizosphérique et non rhizosphérique, afin de confirmer ou non la tendance à l'acidification vue dans le chapitre 1. D'autre part, afin d'avoir des informations sur la nutrition, il s'agissait également de mesurer le sort des nutriments dans la rhizosphère. Pour cela la concentration en cations échangeables (et également en phosphore disponible) du sol rhizosphérique et non rhizosphérique a été mesurée. D'autre part, la quantité de potassium totale du sol (non rhizosphérique) a également été mesurée pour évaluer le stock auquel les racines ont potentiellement accès par altération.

Des échantillons de sol rhizosphérique et non rhizosphérique ont donc été collecté le long d'un profil de sol dans les deux traitements hydriques : régime non modifié (+W) et réduction de 37% des pluviolessivats (-W), de la plantation d'eucalyptus de 5 ans de l'étude. Le protocole de collecte est illustré par l'annexe 1. Deux collectes ont été effectuées à 6 mois d'intervalle : la première (collecte 1) a été réalisée pendant la saison sèche (mai 2015). Les échantillons rhizosphériques et non rhizosphériques ont été collectés à 10 couches de 0 à 4m dans deux fosses (une en –W et une en +W) comportant chacune 4 pseudo répétitions. La seconde (collecte 2) a été réalisée pendant la saison des pluies (décembre 2015). Les échantillons ont été collectés à 6 profondeurs de 0 à 2m. Le but de cette seconde collecte était d'évaluer l'influence de la saison sur les effets de réduction des pluies d'une part, et d'autre part, d'évaluer la variabilité spatiale qu'il existe au sein de la parcelle de 1ha ; 3 répétitions inter bloc ont donc été échantillonnées par traitement.

Le chapitre se décompose en 2 manuscrits d'article :

« Article 1 » correspond aux résultats obtenus pour la première collecte et s'intitule « **Rainfall reduction impacts rhizosphere biogeochemistry in eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil.** Il a été récemment acceptée par la revue *Plant and soil*. Les co-auteurs Philippe Hinsinger, Jean-Paul Laclau, Jean-Pierre Bouillet, Irae Amaral Guerrini, José Leonardo Moraes Gonçalves Verónica Asensio, Cassio H. Abreu-Junior et Christophe Jourdan ont donc relu et contribué à l'écriture de ce manuscrit dont je suis le premier auteur.

« Article 2 » correspond aux résultats obtenus pour la seconde collecte : « **Rainfall reduction does not affect Al and nutrient availability during the wet season in a *Eucalyptus grandis* plantation grown in a deep Ferralsol under humid sub-tropical climate** ». Les co-auteurs Philippe Hinsinger, Jean-Paul Laclau, Jean-Pierre Bouillet, Irae Amaral Guerrini, José Leonardo Moraes Gonçalves et Christophe Jourdan sont associés à ce travail. Ce projet de manuscrit ne sera pas soumis en l'état.

Article 1 *La réduction des précipitations affecte les propriétés géochimiques de la rhizosphère en plantation d'eucalyptus sur sols ferralitiques profonds au Brésil*

Article 1: Rainfall reduction impacts rhizosphere biogeochemistry in eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil

Céline Pradier[1], Philippe Hinsinger[2], Jean-Paul Laclau[1], Jean-Pierre Bouillet[1], Irae Amaral Guerrini[3], José Leonardo Moraes Gonçalves[4], Verónica Asensio[5], Cassio H. Abreu-Junior[5] and Christophe Jourdan[1]

[1]CIRAD, UMR Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France,

[2] INRA, UMR Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France,

[3]FCA, UNESP, CEP 18610-307 Botucatu, SP, Brasil,

[4]LCF, ESALQ, CEP 13400-970 Piracicaba, SP, Brasil

[5]CENA, ESALQ, CEP 13400-970 Piracicaba, SP, Brasil

ABSTRACT

Background and Aims Comparing root functioning under contrasting rainfall regimes can help assessing the capacity of plant species to cope with more intense and frequent drought predicted under climate change context. While the awareness of the need to study the whole root system is growing, most of the studies of root functioning through rhizosphere analyses have been restricted to the topsoil. Our study aimed to assess whether the depth in the soil and the rainfall amount affect root functioning, and notably the fate of nutrients within the rhizosphere.

Methods We compared pH and nutrient availability within the rhizosphere and bulk soil along a 4-m deep soil profile in a 5-year-old eucalypt (*Eucalyptus grandis*) plantation under undisturbed and reduced rainfall treatments.

Results The exchangeable K concentration and the pH of the bulk soil were not influenced by the reduced rainfall treatment. By contrast, the H_3O^+ concentration in the rhizosphere was significantly greater than that of the bulk soil, only in the reduced rainfall plot. The concentrations of exchangeable K in the rhizosphere were significantly larger than those of the bulk soil in both treatments but this difference was higher in the reduced rainfall plot, notably below the depth of 2 m. Both exchangeable K and H_3O^+ concentration significantly increased within the rhizosphere in the reduced rainfall treatment at soil depth down to 4 m.

Conclusions The amount of K brought to the roots by mass flow was estimated and could not explain the observed increase in exchangeable K concentration within the rhizosphere. A more likely explanation was root-induced weathering of K-bearing minerals, partly related to enhanced rhizosphere acidification. Our results demonstrate that root functioning can be considerably altered as a response to drought down to large depths.

Keywords: *Eucalyptus grandis*, fine root, soil depth, pH, exchangeable potassium cation.

INTRODUCTION

The evaluation of ecosystem adaptation under changing environmental conditions has been recently a major focus, climate change being now recognized as a significant threat to sustainable development and crop production. In many parts of the world, climatic anomalies have occurred and will keep on intensifying in the coming future. Altered precipitation and temperature regimes as a result of climate change are expected to exacerbate the intensity and frequency of future droughts and, consequently, the mortality of forests worldwide (Wu et al. 2011). These climate changes challenge the main objectives of forest ecosystem management, which are to provide sustainable ecosystem services to society and to maintain the biological diversity of forests (Thom and Seidl 2015). Higher temperature and atmospheric CO_2 concentration, fewer precipitations, and other climatic factors can all have important impacts on forest soil properties such as soil moisture or organic matter decomposition rate (Davidson and Janssens 2006), and thus on the biogeochemical cycles of major nutrients. In tropical ecosystems, the limiting factor of plant growth is often the availability of soil nutrients (Römheld and Kirkby 2010, Darunsontaya et al. 2012, Santiago et al. 2012). The root system is thus a major compartment that may be particularly affected by climate changes while determining plant growth in tropical conditions, but it is poorly studied given the methodological challenges (Maeght et al. 2013). The functioning of the root system is well known for its considerable plasticity and therefore its role in plant adaptation to adverse conditions, including drought (Huang et al. 1997, Eissenstat et al. 2000, Aroca 2012). Improving our knowledge of root functioning, including deep roots, is therefore especially at stake (Kell 2011, Maeght et al. 2013, Callesen et al. 2016). Concerning drought tolerance, one strategy consists in shedding roots in dry areas and rapidly growing roots in moist areas to maintain plant water status (Huang et al. 1997). In addition, moist soil layers being often deeper than dry ones, hydraulic redistribution can occur resulting in upward movement of water from deeper roots to the upper parts of the root system (Nadezhdina et al. 2010). In tropical ecosystems, in which annual evapotranspirative demand can largely exceed precipitation, water uptake by deep roots plays a major role in sustaining the evapotranspiration during the dry season (Christoffersen et al. 2014).

The functioning of the root system results in a complex combination of root-soil interactions triggered by key belowground processes such as water/nutrient acquisition, rhizodeposition or root respiration (Hinsinger et al. 2005, 2009). Hot spots of microbial activity are generated in the vicinity of roots, i.e. the so-called rhizosphere (Philippot et al. 2013, Reinhold-Hurek et al. 2015). This limited volume of soil is at the crossroad of all soil-plant interactions, and its characteristics, linked to root activities, can be drastically different from those of the bulk soil; i.e. the root-free soil volume, as reviewed by many authors. Root functioning can thus be evaluated through analyzing the properties of the rhizosphere,

in comparison with those of the bulk soil, in order to better understand plant functions (e.g. Bravin et al. 2008, Hinsinger et al. 2009, Blossfeld 2013, Rewald et al. 2014, Sokolova 2015).

Most studies of the root functioning relying on rhizosphere analyses have been conducted in the topsoil, where large root densities are found and thus where rhizosphere sampling is easiest. However, the awareness of the need to study the whole of the root system, including roots at depth, has been growing recently (Maeght et al. 2013, Rewald et al. 2014). While the meta-analyses conducted by Schenk and Jackson (2002) stressed that in many ecosystems, more than 90% of the root biomass was concentrating in the top 0.5 or top 1 m, these authors pointed out that our knowledge of deep roots was truncated as many reports did not investigate deeper soil horizons. There are notable exceptions as it has been recently shown that 60% of the fine roots in an eucalypt plantation in Brazil are located below 1-m depth (Laclau et al. 2013), while fine roots were reported to reach between 8 and 12 m for 2-year-old genotypes (Pinheiro et al. 2016) and 17 m in 3.5-year old trees (Christina et al. 2011).

At the plant point of view, although this has been very little documented, roots may adjust their functioning with depth, especially their capacity for taking up nutrients (Göransson and Rosengren 2006, Göransson et al. 2007, 2008) and be more or less specialized as recently shown for eucalypt trees in Brazilian plantations (da Silva et al. 2011). These authors demonstrated that roots located at 3-m depth had a greater potential to take up Rb^+ (analog of K^+) and Sr^{2+} (analog of Ca^{2+}) than those located in the topsoil, the contrary being observed for nitrate uptake. Fine root functioning has thus to be evaluated along the soil profile, not just in the topsoil.

The pH of the rhizosphere can be a proxy of root functioning as long as the major cause for pH variation in the rhizosphere is the release of protons (or hydroxyl ions) by roots to counterbalance an excess of cations over anions (or anions over cations, respectively) taken up as nutrients (Hinsinger et al. 2003, Blossfeld 2013). Roots can thereby modify the soil pH in their vicinity by up to 2-3 pH units, with considerable feedback effects on plant nutrition as a consequence of the role of pH as a driving factor for numerous biogeochemical processes that determine the fate (desorption/adsorption or dissolution/precipitation processes notably) and ultimately the availability of many nutrients (Hinsinger et al. 2003, 2009). In addition, roots also directly alter nutrient concentrations through their uptake and exudation activities, resulting either in steep depletion and/or accumulation of nutrients, especially for poorly-mobile nutrients such as K (Turpault et al. 2005, 2007, Calvaruso et al. 2011, Collignon et al. 2011) and P (Clegg and Gobran 1997, Hinsinger et al. 2011b). Once more, such rhizosphere effects have been mostly documented for young plants growing in microcosms and, for field-grown plants, essentially for roots growing in the topsoil that are easier to sample, especially in

forest ecosystems. Very fragmented information is available about the rhizosphere of roots down to 1m-depth (Cocco et al. 2013) and virtually no information at all is found for deeper roots.

We present here a study of the root functioning along a 4-m deep soil profile in a eucalypt (*Eucalyptus grandis*) plantation exhibiting a deep root system under undisturbed and reduced rainfall regimes in order to document deep root functioning through rhizosphere versus bulk soil analyses, notably pH and major nutrient concentrations. Our objectives were twofold: (i) evaluate how deep roots were altering soil biogeochemical properties in the rhizosphere, compared to roots in the upper horizons, and (ii) investigate how rainfall reduction was affecting these processes down to 4-m depth.

MATERIAL & METHODS

1.2.1. Study site and soil properties

The experiment was carried out on the heavily instrumented forest research site of Itatinga (Sao Paulo, Brazil, 23°02'S, 48°38'W) owned by the University of São Paulo. Situated at 300 km from the sea, the study area is rather flat (slope ≤ 3%), with an elevation of 860 m. The region has a humid subtropical climate ranked as a Cfa according to the Köppen classification (Peel et al. 2007). Over the 15 years prior to this study, the mean annual rainfall was 1360 mm and the mean annual temperature was 19°C with a cold and dry season occurring between June and September. The soils, called "Latosolos Vermelhos Amarelos distróficos típicos A" (Dystrophic Red-Yellow Latosol), according to the Brazilian classification (EMBRAPA 1999), are deep Ferralsols according to the FAO classification (FAO 1998),with a water table at approx. 17-m depth, developed on Cretaceous sandstone belonging to the Marília formation / Bauru group, and exhibit little horizon differentiation (Maquère 2008). According to Laclau et al. (2010), between the soil surface and the depth of 4 m, the main soil properties range as follows, from top (excluding the top 0-5 cm) to depth: Clay (151 – 256 g kg-1), Silt (29 – 53 g kg-1), Sand (620 – 732 g kg-1), CEC (0.87 – 0.08 cmolc kg-1), organic C (6.4 – 2.0 g kg-1), N (0.47 – 0.11 g kg-1).

1.2.2. Experimental set up

A throughfall reduction experiment was set up in 2010 with a Eucalyptus grandis clone (from the Suzano Company, SP state, Brazil). The experimental design with 6 treatments and 3 blocks was described in detail by Battie-Laclau et al. (2014). Our study was carried out in two treatments selected in one block: (i) +W, control treatment with undisturbed rainfall; (ii) –W, throughfall exclusion treatment. In this treatment, a gutter system was installed two months after planting to simulate a reduction of rainfall, through the exclusion of 37% of the throughfall. Each inter-row of this plot was equipped with two 40-cm wide plastic sheets. The –W plot was mimicking the rainfall reduction forecasted for the end of the 21st century in Brazil (IPCC, 2013).

The fertilization (176 kg K ha-1, 80 kg N ha-1, 75 kg P ha-1) applied at planting in both treatments was not limiting tree growth (Laclau et al. 2009). Herbicides were applied in order to avoid the presence of other roots than eucalypt roots in the two plots. A total of 144 trees were planted at a spacing of 3 m x 2 m in each plot. The circumferences and biomass of the trees in April 2015 are given in Supplementary material (Table S1). The stocking density in our experiment was 1666 tree ha-1 without tree mortality.

Monitoring of soil water contents and foliar potentials in this experiment showed that the low soil water availability in –W led to a sharp decrease in leaf gas exchange and biomass production, relative to +W, during dry periods from 2 years after planting onward (Battie-Laclau et al. 2014; Christina et al. 2015; Epron et al. 2016). Time series of volumetric soil water content (SWC) are shown in Supplementary material (Figure S1) along the soil profile down to a depth of 4 m. SWCs were measured from March 2015 to October 2015 at half-hourly intervals, with CS616 probes (Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA), installed at 6 depths down to 4 meters (0.15, 0.5, 1, 2, 3, 4 m; three probes at different distances from trees per depth). In both treatments, rainfall events led to large variations of SWC in the upper 1m (from 6.5% to 19% in +W and from 5.5% to 14% in -W). Below 1 m depth, SWCs were much less influenced by rainfall events. In +W, there was a difference of about 3% between mean SWC at a depth of 2 m and mean SWC at a depth of 3 and 4 m, and the end of the rainy period (March to June) was marked by a slight decrease in SWC at the depth of 4 m. By contrast, SWCs between the depths of 2 and 4 m in –W remained around 10% over the study period.

1.2.3. Soil sampling and analyses

Soil samples were collected between May and June 2015. A 1.5-m wide square pit was dug in the 3-m wide inter-row of the exclusion and control plots. The pits were dug by hand, as this soil is very cohesive and never provokes any wall collapse. The security of individuals was ensured by a scaffolding system installed in the pit, when reaching a depth greater than 2 m. Rhizosphere and bulk soil were sampled in layers located at 10 depths from the surface, down to a depth of 4 m (Figure 1). At each depth, the four quarters of the pit were collected separately during the excavation in order to create four pseudo-replicates (Figure 1). During the excavation, at each depth, the soil of each replicate was placed in a separate wheelbarrow; all roots and their adhering soil (operationally-defined rhizosphere) were collected in a plastic bag. The rhizosphere was then separated from roots using a paintbrush. In order to be sure not to collect soil that was close to roots, the bulk soil was sampled from root-free zones at various locations on the two walls of each quarter of the pit, at the end of the excavation of each soil depth, and ultimately collected in a 40-cm^3 plastic vial.

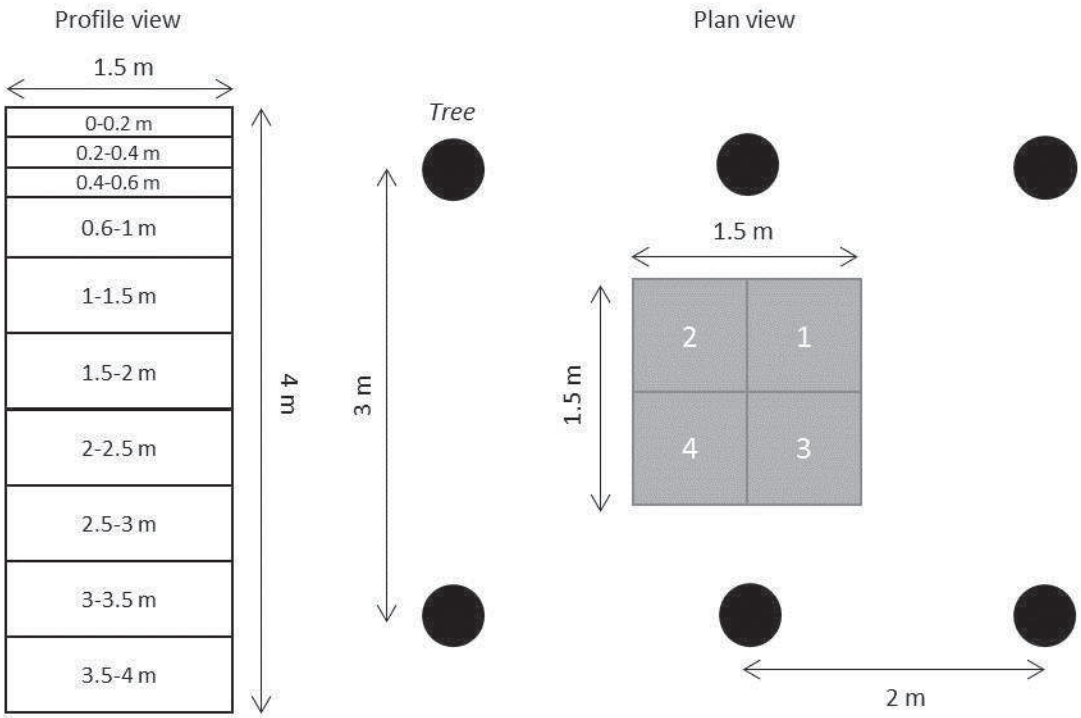


Figure 1. Profile view of the pit, showing the 10 layers of soil. Plan view of the pit, showing the 4 replicate positions and the location of the pit in the eucalypt inter-row.

Rhizosphere and bulk soil samples were air-dried at room temperature and sieved at 2 mm to remove root debris and homogenize the soil prior to analyses. Major nutrient (P, K, Ca and Mg) concentrations and pH were determined at the Soil Department in UNESP (Universidade Estadual Paulista, in Botucatu, Brazil). Major nutrients (P, K, Ca and Mg) were extracted using a 1:1 mixture of an anion exchange resin to assess the available pool of phosphate (strong base type, 20-50 mesh beads, Amberlite IRA-400) and a cation exchange resin to assess the exchangeable pool of K, Ca and Mg (strong acid type, granulometry 20-50 mesh, Amberlite IR-120). A soil suspension prepared with 2.5 g of soil mixed with 25 cm^3 deionized water and 2.5 cm^3 of extracting resin was shaken for 16 hours (van Raij and Quaggio 2001). After the elution of the resins, the concentrations of the extracted cations were determined by Flame Atomic Absorption spectrometer Perkin Elmer 2380 (United States) and the concentration of available phosphorus was determined using a spectrophotometer Femto 600plus (Brazil). For pH measurements, a soil suspension was prepared at a 1:5 soil mass:extracting volume ratio according to the NF ISO 10390 standard, using 0.01M $CaCl_2$ as a background electrolyte that yields a better stability of pH reading. The difficulty of collecting a large quantity of rhizosphere at depth required to slightly adapt the NF ISO 10390 protocol using only 2 g of soil in 10 cm^3 extracting solution, and a micro pH electrode (SenTix Mic-D-300x300).

Subsamples of soil were used for determining pseudo-total K after grinding to <0.2 mm, at the UMR Eco&Sols in Montpellier, France. Pseudo-total K concentration (thereafter called K_{tot}) was determined for the bulk soil only with a composite sample of the four replicates at each depth for both treatments. The extractions were done with 1:1 concentrated HNO_3 and HCl (aqua regia), not with HF; the total K is thereby underestimated in our results, hence called pseudo-total K.

1.2.4. Root sampling and measurements

Firstly, fine roots were sampled down to a depth of 2 m using a 4.5 cm diameter manual auger at four positions relative to the trees in both treatments (+W, -W) and in the three blocks, between February and April 2015. Secondly, a 7 cm diameter mechanical auger was used to collect fine roots down to the watertable at 17 m deep, following the methodology used by Christina et al. (2011). Here we present the results of fine root biomass down to 4-m depth. The roots were carefully washed in a 0.5 mm mesh sieve. Dead roots were discarded and only living roots (light-coloured and flexible) were scanned, and root length was estimated using the WinRHIZO Version Pro V.2013c software (Regent Instruments, QC, Canada). Roots were then dried at 65°C to constant weight. For each soil layer, the ratio between surface area and dry mass of fine roots was used to estimate the specific root area (SRA, $cm^2\ g^{-1}$) (Maurice et al, 2010). Root mass densities (RMD, $g\ dm^{-3}$) were calculated by dividing the dry mass of fine roots by the volume of the sampled soil. Root Area Density (RAD, $cm^2\ dm^{-3}$) was obtained by multiplying the RMD with the SRA.

1.2.5. Statistical analyses

The goal was to assess significant differences between soil compartments (rhizosphere/bulk soil) in each treatment (+W/–W) and at each depth. We investigated the autocorrelation of the depth residues when using a simple linear model and a mixed effects model with two fixed factors (compartment and treatment), one random factor (replicates) and one predictive factor (depth). No relevant predictive function for depth was found (AR(1): autoregressive model that specifies that the output variable depends linearly on its own previous values and on a stochastic term; corEXP: exponential spatial correlation structure). It thus appeared more relevant to use a linear model with four main factors (treatment, depth, compartment, replicates) and their interactions to fit our results. We checked the normal distribution of the residues for the chosen model. To investigate the interaction between each factor, one-factor analysis of variance (ANOVA) was used on the corresponding subset of data. Before analysis, all pH values were converted to H_3O^+ concentrations. Statistical analyses were conducted with the R software (version 3.2.2). For the graphical representations, the mean values were calculated from our replicates (n=4), as well as standard errors.

RESULTS

1.3.1. Bulk soil chemical properties

The available P concentration in the bulk soil was influenced by the throughfall exclusion treatment ($p<0.05$) but not significantly influenced by depth. The values were fairly low throughout the profile though, ranging between 3.1 and 4.2 mg kg^{-1} (Figure 2a). The highest difference between the two treatments was found at the depth of 0.4-0.6 m. Without taking into account this single depth in the ANOVA analysis, the influence of the treatment disappeared. The concentrations of available P in the bulk soils were almost constant along the soil profile down to a depth of 4 m.

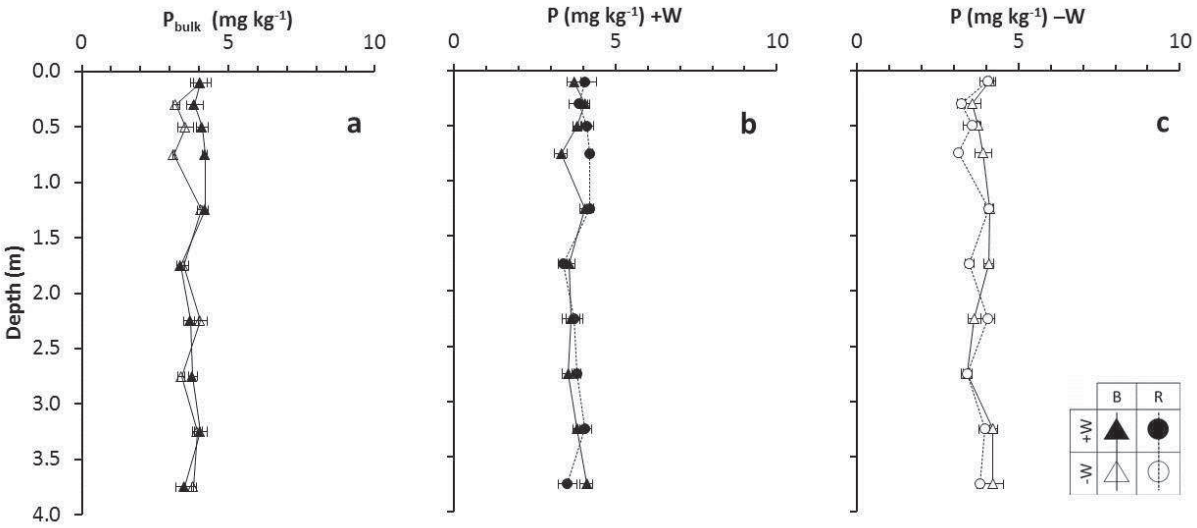


Figure 2. Available P values obtained for the bulk soil (triangles) along the soil profile in the +W (full symbol) and –W treatment (open symbol) (a); Comparison of the values of available P obtained in the bulk soil (triangles) with those obtained in the rhizospheres (circles) in the +W (b) and –W treatments (c). n=4 for the standard errors, B stands for bulk soil and R for rhizosphere.

The exchangeable K concentration in the bulk soil was not influenced by the throughfall exclusion treatment, as we did not find any significant difference between the control and exclusion plots according to one-factor ANOVA analysis. However, the K concentration in the bulk soil was significantly altered with depth (at $p<0.001$). The vertical distribution of the concentrations of exchangeable K in the bulk soil along the soil profile followed a power function for both treatments, with a $R^2 > 0.7$ (Figure 3a). There was a steep, about two-fold decrease of exchangeable K concentration with depth in the top first meter of soil (from 0.55 to 0.25 mg kg^{-1}); the decrease was then more progressive and steady between 1 and 4 m of soil depth, exhibiting again a two-fold decrease. The values of K_{tot} in the bulk soil ranged from 60 to 100 mg kg^{-1} (with an outlier value of 148 mg kg^{-1} at the depth of 1 m in the control treatment) in both +W and –W treatments (Figure S2). The values of K_{tot} in the bulk soil were not influenced by throughfall exclusion or by soil depth.

As for exchangeable K, the pH of the bulk soil was not influenced by throughfall exclusion, as we did not find any significant difference between the control and exclusion plots according to one-factor ANOVA analysis. However, the pH in the bulk soil was significantly altered with soil depth (at $p<0.001$). The significant linear regression ($R^2 > 0.96$) between pH and soil depth found for both control and exclusion treatments (Figure 3b) was indicative of a general acidification along the soil profile, from a mean value around 4.90 at depths of 3.5-4 m to a mean value of 4.16 within the topsoil (0-0.2 m).

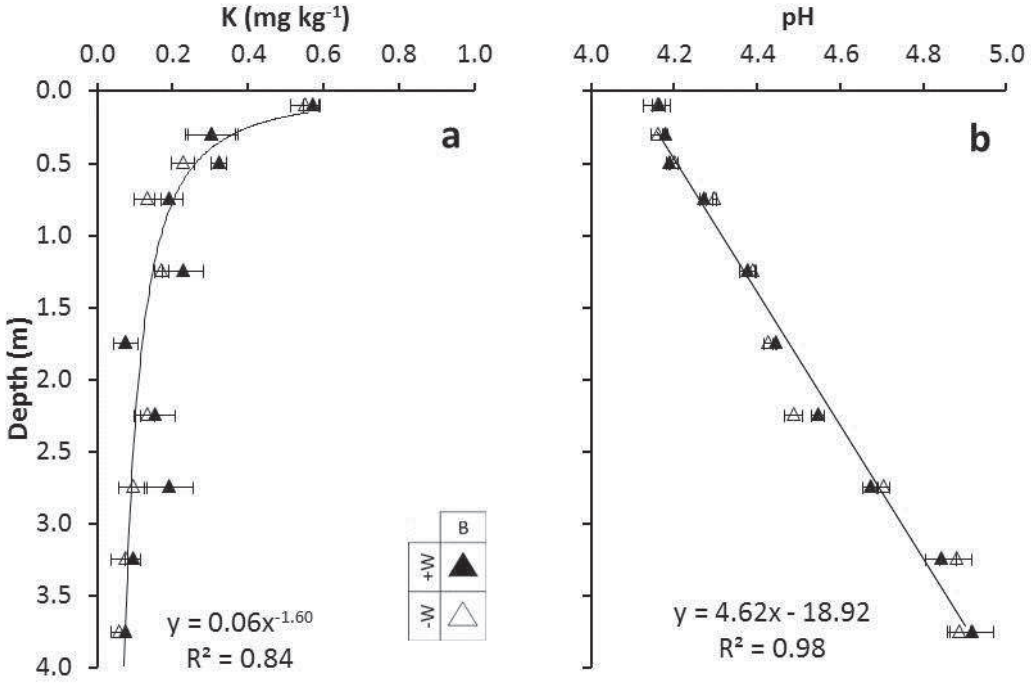


Figure 3. Bulk soil exchangeable K concentration values (a), pH values (b) along the soil profile in the +W (full symbol) and –W treatment (open symbol). n=20 for the regressions, n=4 for the standard errors, B stands for bulk soil.

A large proportion of our bulk soil samples reached the limits of detection of the Atomic Absorption Spectrometer, which were 1.12 mg kg^{-1} for Ca and 0.56 mg kg^{-1} for Mg. An overall effect of the exclusion treatment or soil depth was impossible to detect (Table S2). Concerning available Ca, all the values of the bulk soil were ≤ 2.24 mg kg^{-1} (determination threshold) in both treatments. Concerning available Mg, in the +W treatment all the values were ≤ 1.12 mg kg^{-1} (determination threshold), except the four replicates of the topsoil (in the 0-0.2-m soil layer). In the –W treatment, all the values were ≤ 1.12 mg kg^{-1}, except one replicate of the topsoil.

1.3.2. Rhizosphere chemical properties

Available P concentrations within the rhizosphere (Figures 2b,c) ranged between 3.31 and 4.06 mg kg^{-1} for the +W treatment and between 3.22 and 4.21 mg kg^{-1} for the –W treatment. Available P was lower in the rhizosphere than in the bulk soil in the throughfall exclusion treatment (at $p<0.05$), but the differences were not significant in the +W treatment. Soil depth did not influence significantly

rhizosphere P availability. As for the bulk soil, the 0.4-0.6 m soil layer exhibited the highest difference in P availability between rhizosphere and bulk soil samples.

The concentrations of exchangeable K in the rhizosphere were significantly higher than those of the bulk soil in both +W and –W treatments ($p<0.001$). However, this difference was higher in the –W treatment, notably below the depth of 2 m (Figure 4a, c).

The soil pH was significantly influenced by soil depth within the rhizosphere, as observed in the bulk soil ($p<0.001$). In contrast with the bulk soil, the pH of the rhizosphere was also significantly affected by the throughfall exclusion, along the soil profile (at $p<0.1$). The concentration in H_3O^+ in the rhizosphere was significantly greater than that of the bulk soil in the exclusion plot whereas no such rhizosphere acidification was found in the control plot (Figures 4b and 4d).

As for bulk soils, most of our samples reached the limit of detection of the Atomic Absorption Spectrometer for the concentrations of available Ca and Mg, except in the topsoil, and it was thus impossible to detect a throughfall exclusion, soil depth or rhizosphere effect (Table S2). Concerning available Ca in the +W treatment, all the values were ≤ 2.24 mg kg^{-1}, except the four replicates of the topsoil (depth of 0-0.2 m). In the –W treatment, all the values were ≤ 2.24 mg kg-1, but one replicate at the depth of 0-0.2 m (3.36 mg kg^{-1}). Concerning available Mg, in the +W treatment all the values were ≤ 1.12 mg kg^{-1} except the four replicates of the topsoil (depth of 0-0.2 m). In the –W treatment, all the values were ≤ 1.12 mg kg^{-1} except the four replicates of the topsoil (depth of 0-0.2 m), three replicates at the depth of 0.2-0.4 m and one replicate at the depths of 0.6-1 m.

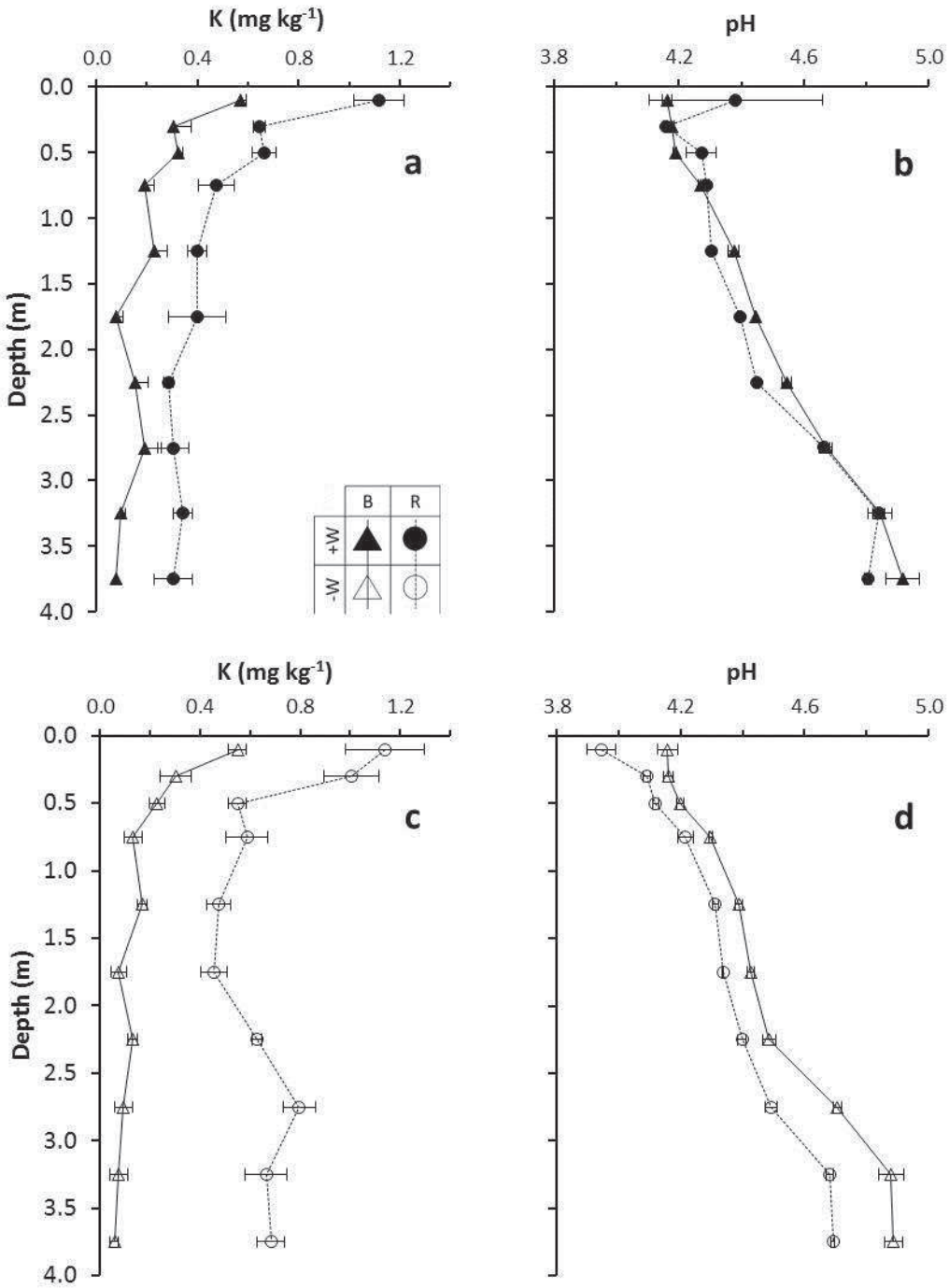


Figure 4. Comparison of the values obtained in the bulk soil (triangles) with those obtained in the rhizospheres (circles) for the exchangeable K (a and c) and the pH (b and d) in the +W (a and b) and –W treatment (c and d). n=4 for the standard errors, B stands for bulk soil and R for rhizosphere.

1.3.3. Influence of soil depth on the difference between rhizosphere and bulk soil chemical properties

Changes in rhizosphere pH relative to the bulk soil along the 4-m deep soil profiles were treatment-dependent. In the +W treatment (Figure 5a), the rhizosphere pH was higher than the bulk soil pH in the topsoil (+0.22 pH unit at the depth of 0-0.2 m), and a slight acidification of the rhizosphere occurred

below the depth of 1 m with a maximum acidification between 3 and 4 m depths (-0.11 pH unit). In the –W treatment, rhizosphere acidification occurred along the whole soil profile (Figure 5c). The rhizosphere experienced the highest acidification (> 0.2 pH unit) both in the topsoil and below the depth of 2.5 m, whereas the acidification in the intermediate layers was around 0.08 pH unit. Given the logarithmic nature of pH, it however makes more sense to assess the difference between rhizosphere and bulk soil in terms of changes of H_3O^+ concentration (Figure 5b). A 0.2 pH unit decrease both in the topsoil and in the soil layers below the depth of 2.5 m did not imply the same amount of protons, starting from a bulk soil pH around 4.4 within the topsoil or around 4.7 below 2.5 m deep. Therefore, a much higher amount of protons (4.59 10^{-5} moles in the topsoil instead of <1.25 10^{-5} moles below the depth of 2.5 m, on a per dm^3 of soil solution basis) was needed within the topsoil to yield a pH shift of 0.2 pH unit. The amount of protons released in the rhizosphere was thus quite homogenous along the soil profile in the -W treatment (around 1 10^{-5} moles, on a per dm^3 of soil solution basis), except in the topsoil where it increased by a factor of 4.5.

In the +W treatment, exchangeable K concentrations increased in the rhizosphere relative to the bulk soil, with a peak in the topsoil, and then a lesser increase with soil depth (Figure 5d). The difference between exchangeable K concentrations in the bulk soil and in the rhizosphere was significantly influenced by soil depth ($p<0.001$). Mean differences between the rhizosphere and the bulk soil could be modeled by a power function ($R^2>0.56$), with a decrease from the topsoil (0.6 mg kg^{-1}) to the depth of 4 m (0.2 mg kg^{-1}). The increase in exchangeable K concentration in the rhizosphere relative to the bulk soil showed in the upper soil layers of the +W treatment was also observed in the –W treatment. In contrast, below a depth of 1 m, the difference between the rhizosphere and the bulk soil increased in the –W, reaching maximal values below a depth of 2 m (0.7 mg kg^{-1}). At such depths, the increase in K availability within the rhizosphere was as large as in the topsoil for this treatment.

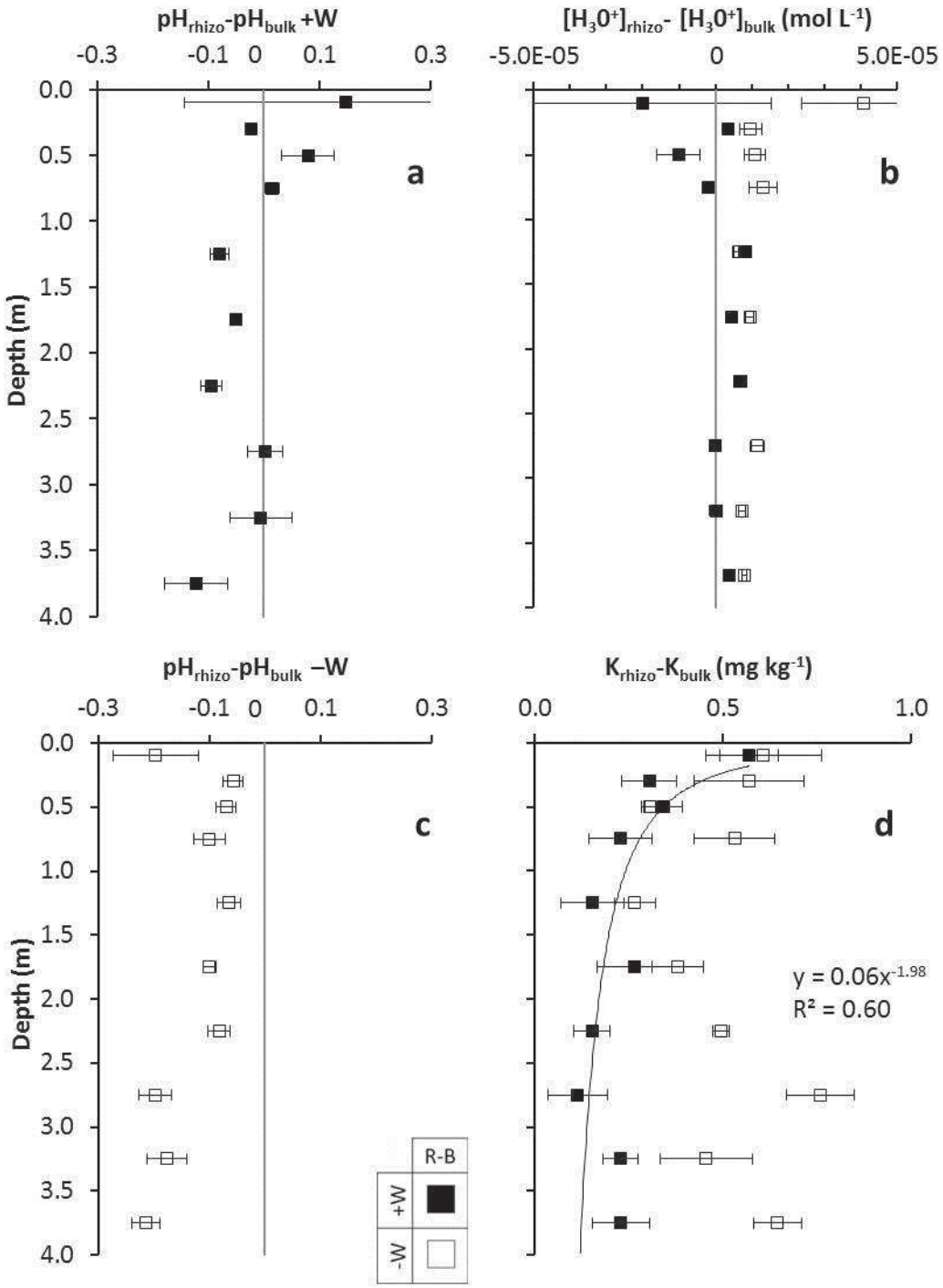


Figure 5. Difference of pH between rhizosphere and bulk soil along the soil profile in the +W (a) and in the –W treatment (c); Difference of concentration between rhizosphere and bulk soil in the +W (full symbol) and the –W treatment (open symbol) for H_3O^+ (b) and K^+ (d). Power equation stands for +W data in (d), n=4 for the standard errors and R-B stands for the difference between rhizosphere and bulk soil values.

For both treatments, we computed the stocks of exchangeable K and K_{tot} in the bulk soil and the rhizosphere for each soil layer and for the whole 4-m soil profile taking into account the fine root distribution (Table 1). The fine root dry mass density (RMD), the root area density (RAD) and hence the volume of the rhizosphere sharply decreased with soil depth but still remained substantial down to a depth of 4 m in both treatments. Consequently, the stock of exchangeable K in the rhizosphere decreased with soil depth, amounting to a total of 1.42 and 2.03 kg ha^{-1} in the whole soil profile of +W and –W treatments, respectively. The accumulation of exchangeable K (K_{exch}rhizo-bulk) in the rhizosphere showed the same pattern, amounting to a total of 0.77 and 1.33 kg ha^{-1} in the whole soil profile of +W and –W treatments, respectively (Table1).

Table 1. Estimation, per soil layer, of the root mass density (RMD), the root area density (RAD), the volume of rhizosphere (V_{rhizo}), the percentage of rhizosphere volume among total soil volume (V_{rhizo}/V_{tot}), the stock of pseudo-total K (K_{tot}) and exchangeable K (K_{exch}) within the bulk soil and the rhizosphere. The volume of rhizosphere has been calculated from the RAD values and using a soil density of 1.4 g kg^{-1} and a rhizosphere thickness of 1 cm. The stock of K_{tot} in the rhizosphere was calculated by multiplying the rhizosphere volume by the K_{tot} content measured in the bulk soil. The accumulation of exchangeable K within the rhizosphere (K_{exch}rhizo-bulk) was calculated by multiplying the rhizosphere volume by the difference of K_{exch} content in the rhizosphere relative to the bulk soil.

Treat.	*Layers*	*RMD*	*RAD*	*V_{rhizo}*	*V_{rhizo}/V_{tot}*	*K_{exch} bulk*	*K_{tot} bulk*	*K_{exch} rhizo*	*K_{tot} rhizo*	*K_{exch} rhizo-bulk*
	cm	g dm^{-3}	cm^2 dm^{-3}	m^3 ha^{-1}	%	kg ha^{-1}	kg ha^{-1}	kg ha^{-1}	kg ha^{-1}	kg ha^{-1}
+W	0-20	0.96	188.05	376.09	18.80	1.59	202	0.59	38	0.29
	20-40	0.22	55.79	111.58	5.58	0.85	167	0.10	9	0.05
	40-60	0.25	55.15	110.30	5.51	0.90	212	0.10	12	0.05
	60-100	0.27	54.50	218.01	5.45	1.06	490	0.14	27	0.09
	100-150	0.04	48.16	240.81	4.82	1.59	697	0.13	34	0.06
	150-200	0.05	57.47	287.34	5.75	0.53	593	0.16	34	0.13
	200-250	0.04	28.42	142.10	2.84	1.06	629	0.06	18	0.03
	250-300	0.10	23.36	116.78	2.34	1.33	490	0.05	11	0.02
	300-350	0.05	18.29	91.46	1.83	0.66	594	0.04	11	0.03
	350-400	0.02	17.70	88.48	1.77	0.53	601	0.04	11	0.03
	Total 0-400					***10.12***	***4676***	***1.42***	***204***	***0.77***
-W	0-20	1.14	240.05	480.10	24.00	1.54	209	0.77	50	0.40
	20-40	0.27	92.97	185.95	9.30	0.85	198	0.26	18	0.18
	40-60	0.30	86.22	172.43	8.62	0.64	276	0.13	24	0.08
	60-100	0.32	79.46	317.82	7.95	0.74	539	0.26	43	0.20
	100-150	0.05	70.12	350.61	7.01	1.20	448	0.23	31	0.15
	150-200	0.05	39.15	195.77	3.92	0.53	520	0.12	20	0.10
	200-250	0.10	20.39	101.93	2.04	0.93	695	0.09	14	0.07
	250-300	0.04	15.50	77.49	1.55	0.66	650	0.09	10	0.08
	300-350	0.06	10.61	53.05	1.06	0.53	644	0.05	7	0.04
	350-400	0.06	6.15	30.73	0.61	0.40	515	0.03	3	0.03
	Total 0-400					***8.02***	***4694***	***2.03***	***221***	***1.33***

1.3.4. Relationship between soil pH and K availability

In the bulk soil, the concentration of exchangeable K was negatively correlated with the pH whatever the treatment (Figure 6a). The relationship between pH and exchangeable K concentration was not significant in the rhizosphere and clearly different between the two treatments (Figure 6b). The concentration of exchangeable K within the rhizosphere was thus not fully explained by the pH as observed in the bulk soil.

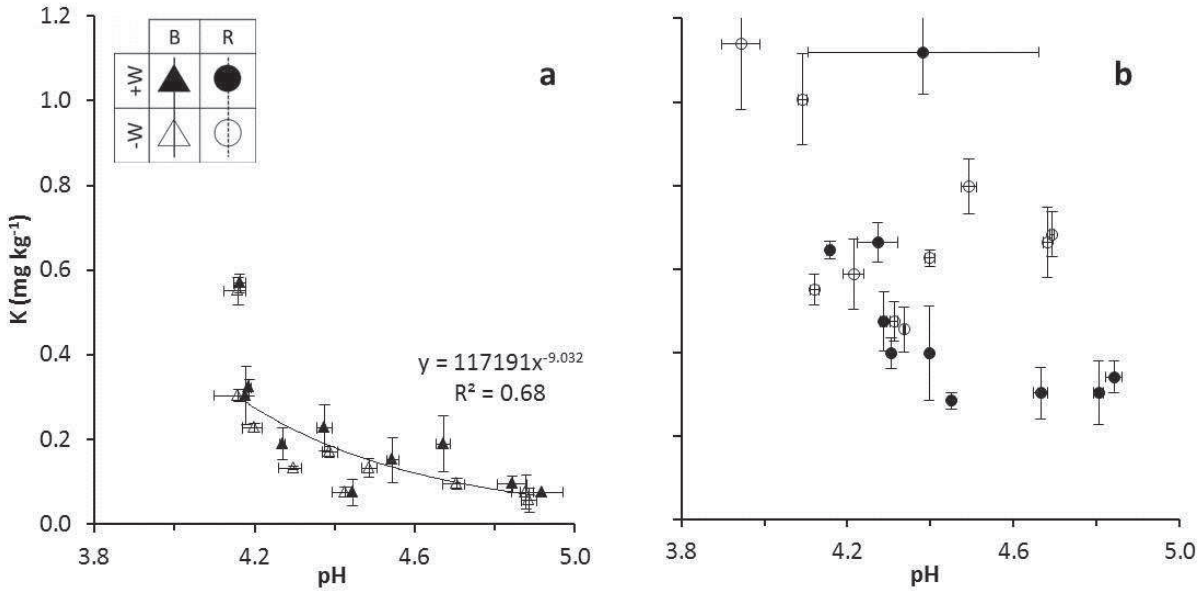


Figure 6. Relationship between exchangeable K concentration and pH for both treatments (+W = full symbol; –W = open symbol) for the bulk soil (a) and the rhizosphere (b). n=4 for the standard errors, n=20 for the regression combining the two treatments (+W and –W) and calculated on the average values in each soil layer in (a), B stands for bulk soil and R for rhizosphere.

DISCUSSION

1.4.1. Acidification of the rhizosphere

The combined action of a number of processes can explain the differences of pH observed between the rhizosphere and the bulk soil (Hinsinger et al. 2003). However, the leading process is commonly the imbalance between nutrient cation and anion uptake by plants. Thereby, pH decrease in the rhizosphere mainly results from the release of protons by roots to counterbalance an excess of cations over anions taken up. According to our results, the throughfall exclusion treatment increased the acidification of the rhizosphere, which could have resulted from higher amounts of cations, notably K, taken up in the throughfall exclusion treatment than in the control treatment. Although an adequate K nutrition greatly enhances the stomatic control of water loss of *E. grandis* trees in response to changes in soil water availability (Battie-Laclau et al. 2014) and stem biomass production (Battie-Laclau et al. 2016), destructive measurements in our experiments showed that K contents in the trees were not higher in –W than in +W (unpublished data), and therefore differences in K uptake cannot explain

the acidification of the rhizosphere in –W. Another major contributor to cation-anion balance is N, rhizosphere acidification being often indicative of a significant contribution of ammonium uptake. However, the data collected in this experiment showed that the N content in the aboveground biomass was lower in the throughfall exclusion treatment than in the control treatment (unpublished data). Nevertheless, N being possibly taken up as both nitrate and ammonium, it is impossible to know the relative contribution of ammonium uptake and whether this was affected by the throughfall exclusion treatment. The release of organic anions by roots can also contribute to the acidification of the rhizosphere, whenever it is accompanied by proton release (Hinsinger et al. 2003). In our experiment, the exudation of complexing compounds such as malate or citrate was probably of major importance for the roots to cope with the toxicity of aluminum, as induced by the ambient low pH of this soil, as shown in many plant species including eucalypt such *E. grandis* (Silva et al. 2004). However, we do not have direct evidence to support this assumption, and the related hypothesis that carboxylate exudation would be higher under rainfall exclusion.

1.4.2. Accumulation of K in the rhizosphere

Two hypothetical processes can be put forward to explain the observed increase in available K concentration in the rhizosphere relative to that in the bulk soil: the mass flow transport of K-ions across the rhizosphere leading to an accumulation at the vicinity of the roots (hypothesis 1) and the weathering of K-bearing minerals in the rhizosphere (hypothesis 2).

The experimental site of Itatinga has been heavily instrumented to study the biogeochemical cycles of nutrients. We can thus discuss hypothesis 1 by evaluating (i) the average quantity of K brought to the roots by mass flow and (ii) the amount of K taken up by the trees. Should the quantity of K brought by the mass flow be much lower than the amount of K actually taken up by the tree (as usually assumed, e.g. Barber 1995), then the mass flow hypothesis would be invalidated, as it could not explain the observed build-up of available K concentration within the rhizosphere.

We estimated these two amounts of K and for the 5th year of the former rotation cycle for which we had a complete dataset for *E. grandis* trees at the same location. Silvicultural practices and biomass production in this former rotation were similar to the +W treatment in the present experiment. The average quantity of K brought to the trees by mass flow, can be estimated by multiplying the volume of water taken up by the trees by the mean concentration of K in the soil solution. The average of annual rainfall can be a conservative estimate of the flux of water taken up by trees, as there is no loss of water by drainage after canopy closure (at age 2 years) in highly productive *E. grandis* plantations at the site (Laclau et al. 2013; Christina et al. 2016). We slightly overestimated the actual transpiration flux as we ignored the soil evaporation in our calculation. We used here the value measured for the

5th year of the former rotation, which amounted to 13510 m^3 ha^{-1} yr^{-1}. The mean value of K concentration over the same period down to the depth of 3 m was 0.16 mg dm^{-3} (Maquère 2008). The quantity of K brought by mass flow to trees was thus amounting to a maximum value of about 2 kg K ha^{-1} yr^{-1}. The amount of K taken up by the trees over the same period (the 5th year of the previous rotation), evaluated using the methodology described in Laclau et al. (2010), amounted approximately to 17.5 kg K ha^{-1}. This value is about an order of magnitude greater than the estimated annual flux of K delivered to trees by mass flow. These rough calculations clearly show that mass flow cannot explain the observed increase in K concentration in the rhizosphere of *E. grandis* trees, which is in line with what is usually expected for poorly mobile nutrients such as K (Barber 1995; Hinsinger et al. 2011a). Such calculations were not conducted for the throughfall exclusion treatment, for which all the data are not available yet, but the conclusion should be the same, given the huge discrepancy between mass flow and K uptake flux. We note that the data available for the 5th year of the actual plantation concerning the accumulation of K in trees are consistent with the data used for the calculation that concerned the previous rotation cycle, for which all data were available.

The weathering of K-bearing minerals in soils can be a significant source of K for plant nutrition, and numerous studies have evidenced across spatial scales, from the rhizosphere to the catchment scale, that the uptake of K by plants can be a major driving force for the release of poorly-available soil K through enhanced weathering of K silicates (Taylor and Velbel 1991, Jaillard and Hinsinger 1993, Hinsinger et al. 1993, Velbel and Price 2007, Barré et al. 2007a). While Hinsinger and Jaillard (1993) demonstrated that K depletion in the rhizosphere was the primary process controlling the release of interlayer K from micas, a number of field studies in temperate and boreal forest ecosystems have rather reported an increase in K concentration in the rhizosphere than a depletion (e.g. Clegg and Gobran 1997, Turpault et al. 2005, Calvaruso et al. 2014). These authors interpreted such phenomenon as a consequence of the root-induced weathering of K-bearing minerals, occurring possibly through other processes than a shift of K exchange equilibria due to K uptake, e.g. rhizosphere acidification as demonstrated by Hinsinger et al. (1993), or the release of metal-complexing exudates.

The soil of the present study is highly weathered so that there are few amounts of easily-weatherable K-bearing minerals, especially 2:1 clay minerals able to retain interlayer K. However, even in tropical soils, small amounts of 2:1 layers can be found in 1:1 clay minerals, which can dramatically influence the fate of soil K (Fontaine et al. 1989, Darunsontaya et al. 2012). Melo et al. (2007) demonstrated the occurrence of significant amounts of dioctahedral micas in the clay (kaolinite-dominated) fraction of Brazilian Ferralsol soils, including one developed on a similar parent material. Moreover, the weathering of primary minerals such as K-feldspars or muscovite, although least weatherable, is also a potential source of K. It is known that the acidity increases the weathering rate of silicates (West et

al. 2005), and the negative relationship between K concentration and pH found in the bulk soil (Figure 6a) of the present experiment is consistent with the occurrence of such proton-promoted dissolution of K-bearing minerals in the studied soil. In addition, rhizosphere acidification has already been shown to be responsible for the release of cations from primary phyllosilicates by Hinsinger et al. (1993) in controlled conditions. The acidification-induced weathering process can thus be part of the explanation for the difference in K concentration found in the rhizosphere of the two treatments, as greater increase in K concentration concurred with greater acidification of the rhizosphere at depth in the throughfall exclusion treatment (–W, Figure 4). The poor relationship between pH and K concentration that we found in the rhizosphere (Figure 6b) is however suggesting that other processes than rhizosphere acidification contributed to increasing K concentration in soil solution through possibly enhanced weathering of K-bearing silicates.

To validate hypothesis 2, the weathering rate should be greater than the actual K uptake rate achieved by roots, thus resulting in increased concentration of available K in the rhizosphere, as observed here in the two treatments and especially at depth for the throughfall exclusion treatment (–W, Figure 4), and in a number of previous field studies on topsoil roots in temperate and boreal forest ecosystems (e.g. Clegg and Gobran 1997, Courchesne and Gobran 1997, Turpault et al. 2005, 2007, Calvaruso et al. 2014). It is not possible to estimate the weathering rate in our study, and such field data are scarce in the literature. Weathering rates have been estimated by Benedetti et al. (1994) in two watersheds of the same region of Brazil, but for basalt substratum instead of cretaceous sandstone. They estimated for labradorite, a K-feldspar present in their watersheds, that the rate of weathering was about 3 kg K $ha^{-1} yr^{-1}$. Such estimates are not available for the cretaceous sandstone substrate present at the studied site and extrapolations shall be cautious as the impact of the vegetation in intensive eucalypt plantation is expected to be different from the sites studied by Benedetti et al. (1994), their watershed being composed of pasture, relict secondary forest and some crops. Given that, as Taylor and Velbel (1991) in their forest watersheds in the USA, Benedetti et al. (1994) stress that there is a considerable impact of the vegetation on the estimated weathering rate for K-bearing silicates, the actual weathering rate of our study site may be slightly bigger than 3 kg K $ha^{-1} yr^{-1}$, especially when considering that the pH of the soils developed on sandstone bedrock in our ecosystem was definitely more acidic than in the basalt watersheds studied by Benedetti et al. (1994). It is however unlikely to be much more than the annual demand of the *E. grandis* trees (17.5 kg K ha^{-1}). As an alternative to local weathering rate estimates, it is worth estimating the size of the stock of K contained in K-bearing silicates that can be potentially weathered. We estimated this stock based on the pseudo-total K analyses that we have conducted in the bulk soil along the soil profiles (Table 1). Based on these fairly low values, as commonly found in highly weathered tropical soils (Melo et al. 2005 and 2007), we

estimated that this pool amounted to about 4700 kg K ha^{-1}, down to a depth of 4 m. When taking into account the distribution of roots and the corresponding rhizosphere volume, assuming a radius of 1 cm (in such sandy soils, K-ion diffusion may probably occur over greater distances), pseudo-total K may amount to 204-221 kg K ha^{-1}, down to a depth of 4 m. Melo et al. (2005) assessed the capacity of soils developed on the same parent material to supply nonexchangeable and structural K from K-bearing silicates through weathering. They concluded that there was a substantial K release potential from the clay fraction of such soils, amounting to much more than the size of the exchangeable pool, amounting to about 3% of total K, based on laboratory dissolution with 0.1M citric acid over about 2 months. One has to be careful when extrapolating to weathering rates under field conditions, but these findings substantiate the feasibility of a release of nonexchangeable or structural K in the order of 6 kg K ha^{-1} (while the stock of exchangeable K in the rhizosphere is amounting to 1.4-2 kg K ha^{-1}, down to a depth of 4 m) to explain the increase of exchangeable K concentration observed in the rhizosphere, amounting to 0.8-1.3 kg K ha^{-1}, down to a depth of 4 m. Thus, hypothesis 2 cannot be rejected, although estimating the actual weathering rate would be needed to fully validate it. Our calculations are based on stocks at a given sampling time and cannot relate directly to the annual flux of K released by weathering.

This study is limited to a depth of 4 meters. However, in the experiment, the deepest roots reached a depth of 17 m depth in both +W and –W treatments. This characteristic is not linked to the studied clone, as such deep rooting depth has been shown also for other clones as well as for seedlings (Pinheiro et al. 2016). These roots have thus a potential access to an important stock of nutrients (very low concentration but on > 10-m deep soil layer). Our results show that the rhizosphere effect seems to be higher at depth. Thus deep and very deep roots are likely to play a major role in tree nutrition in highly weathered tropical soils, and need to be accounted for and further studied.

To conclude, pH and nutrient concentrations in rhizosphere vs. bulk soil seem to be good indicators to evaluate the adaptive changes induced by climate change, notably water regime modification, on root functioning, including deep root functioning. Our study suggests an important role of the rhizosphere acidification process and consequent root-induced silicate weathering to explain the observed increase in K availability in the rhizosphere of *E. grandis*, although we did not provide direct evidence of such proton-promoted dissolution of K-bearing minerals. Interestingly, we pointed out that reduced rainfall resulted in larger rhizosphere effects, based on the fate of available K at depth compared with the topsoil. Potassium being a limiting nutrient in many tropical ecosystems, this study shows that accounting for deep soil layers and deep roots is crucially needed to better understand K nutrition of trees such as the deep-rooted eucalypt species (*E. grandis*) studied in this work.

Acknowledgements

We acknowledge the staff at the Itatinga Experimental Station (ESALQ-USP) as well as Eder Araujo da Silva and Floragro (www.floragroapoio.com.br) for their technical support. This project was funded by the University of São Paulo, the Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), the Agence Nationale de la Recherche (MACACC project ANR-13-AGRO-0005, Viabilité et Adaptation des Ecosystèmes Productifs, Territoires et Ressources face aux Changements Globaux AGROBIOSPHERE 2013 program), USP-COFECUB (Project 2011-25), FAPESP (grant number 2013/25998-4) and AGREENIUM (Plantrotem project). This site belongs to the SOERE F-ORE-T, which is supported annually by Ecofor, Allenvi and the French national research infrastructure ANAEE-F (http://www.anaee-france.fr/fr/).

REFERENCES

Aroca R (2012) Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features. Springer Science & Business Media

Barber SA (1995) Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach, 2 edition. Wiley

Barré P, Montagnier C, Chenu C, et al. (2008) Clay minerals as a soil potassium reservoir: observation and quantification through X-ray diffraction. Plant Soil 302:213–220. doi: 10.1007/s11104-007-9471-6

Battie-Laclau P, Delgado-Rojas JS, Christina M, et al. (2016) Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. For Ecol Manag 364:77–89. doi: 10.1016/j.foreco.2016.01.004

Battie-Laclau P, Laclau JP, Domec JC, et al. (2014) Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in Eucalyptus grandis plantations. New Phytol 203:401–413. doi: 10.1111/nph.12810

Benedetti MF, Menard O, Noack Y, et al (1994) Water-rock interactions in tropical catchments: Field rates of weathering and biomass impact. Chem Geol 118:203–220.

Blossfeld S (2013) Light for the dark side of plant life: Planar optodes visualizing rhizosphere processes. Plant Soil 369:29–32.

Bravin MN, Martí AL, Clairotte M, Hinsinger P (2008) Rhizosphere alkalisation - a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. Plant Soil 318:257–268. doi: 10.1007/s11104-008-9835-6

Callesen I, Harrison R, Stupak I, et al. (2016) Carbon storage and nutrient mobilization from soil minerals by deep roots and rhizospheres. For Ecol Manag 359:322–331. doi: 10.1016/j.foreco.2015.08.019

Calvaruso C, Collignon C, Kies A, Turpault MP (2014) Seasonal Evolution of the Rhizosphere Effect on Major and Trace Elements in Soil Solutions of Norway Spruce (Picea abies Karst) and Beech (Fagus sylvatica) in an Acidic Forest Soil. Open J Soil Sci 4:323–336. doi: 10.4236/ojss.2014.49034

Calvaruso C, N'Dira V, Turpault MP (2011) Impact of common European tree species and Douglas-fir (Pseudotsuga menziesii [Mirb.] Franco) on the physicochemical properties of the rhizosphere. Plant Soil 342:469–480. doi: 10.1007/s11104-010-0710-x

Christina M, Laclau JP, Goncalves JLM, et al. (2011) Almost symmetrical vertical growth rates above and
below ground in one of the world's most productive forests. Ecosphere 2:2710.

Christina M, Le Maire G, Battie-Laclau P, et al. (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. Glob Change Biol 21:2022–2039. doi: 10.1111/gcb.12817

Christina M, Nouvellon Y, Laclau JP, Stape JL, Bouillet JP, Lambais GR, le Maire G (2016). Importance of deep water uptake in tropical eucalypt forest. Funct Ecol, *in press*.

Christoffersen BO, Restrepo-Coupe N, Arain MA, et al. (2014) Mechanisms of water supply and vegetation demand govern the seasonality and magnitude of evapotranspiration in Amazonia and Cerrado. Agr Forest Meteorol 191:33–50.

Clegg S, Gobran GR (1997) Rhizospheric P and K in forest soil manipulated with ammonium sulfate and water. Can J Soil Sci 77:525–533.

Cocco S, Agnelli A, Gobran GR, Corti G (2013) Changes induced by the roots of Erica arborea L. to create a suitable environment in a soil developed from alkaline and fine-textured marine sediments. Plant Soil 368:297–313. doi: 10.1007/s11104-012-1501-3

Collignon C, Calvaruso C, Turpault M-P (2011) Temporal dynamics of exchangeable K, Ca and Mg in acidic bulk soil and rhizosphere under Norway spruce (Picea abies Karst.) and beech (Fagus sylvatica L.) stands. Plant Soil 349:355–366. doi: 10.1007/s11104-011-0881-0

Courchesne F, Gobran GR (1997) Mineralogical Variations of Bulk and Rhizosphere Soils from a Norway Spruce Stand. Soil Sci Soc Am J 61:1245. doi: 10.2136/sssaj1997.03615995006100040034x

da Silva EV, Bouillet JP, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2011) Functional specialization of Eucalyptus fine roots: contrasting potential uptake rates for nitrogen, potassium and calcium tracers at varying soil depths. Funct Ecol 25:996–1006. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01867.x

Darunsontaya T, Suddhiprakarn A, Kheoruenromne I, et al. (2012) The forms and availability to plants of soil potassium as related to mineralogy for upland Oxisols and Ultisols from Thailand. Geoderma 170:11–24. doi: 10.1016/j.geoderma.2011.10.002

Davidson EA, Janssens IA (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. Nature 440:165-173. doi:10.1038/nature04514

Eissenstat DM, Wells CE, Yanai RD, Whitbeck JL (2000) Building roots in a changing environment: implications for root longevity. New Phytol 147:33–42.

EMBRAPA (1999) Sistema brasileiro de classificação de solos. Embrapa Solos, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro.

Epron D, Cabral OMR, Laclau JP, et al. (2016) In situ (CO2)-C-13 pulse labelling of field-grown eucalypt trees revealed the effects of potassium nutrition and throughfall exclusion on phloem transport of photosynthetic carbon. Tree Physiol 36:6–21. doi: 10.1093/treephys/tpv090

FAO (1998) World reference base for soil resources FAO, ISRIC and ISSS, Rome.

Fontaine S, Delvaux B, Dufey JE, Herbillon AJ (1989) Potassium exchange behaviour in Carribean volcanic ash soils under banana cultivation. Plant Soil 120:283–290.

Göransson H, Fransson A-M, Jonsson-Belyazid U (2007) Do oaks have different strategies for uptake of N, K and P depending on soil depth? Plant Soil 297:119–125. doi: 10.1007/s11104-007-9325-2

Göransson H, Ingerslev M, Wallander H (2008) The vertical distribution of N and K uptake in relation to root distribution and root uptake capacity in mature Quercus robur, Fagus sylvatica and Picea abies stands. Plant Soil 306:129–137. doi: 10.1007/s11104-007-9524-x

Göransson H, Rosengren U (2006) Nutrient acquisition from different soil depths by pedunculate oak. Trees-Struct Funct 20:292–298.

Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM (2009) Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. (Special Issue: Rhizosphere: achievements and challenges.). Plant Soil 321:117–152.

Hinsinger P, Betencourt E, Bernard L, et al. (2011a) P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. Plant Physiol 156:1078–1086. doi: 10.1104/pp.111.175331

Hinsinger P, Brauman A, Devau N, et al. (2011b) Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? Plant Soil 348:29–61. doi: 10.1007/s11104-011-0903-y

Hinsinger P, Elsass F, Jaillard B, Robert M (1993) Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. J Soil Sci 44:535–545. doi: 10.1111/j.1365-2389.1993.tb00475.x

Hinsinger P, Gobran GR, Gregory PJ, Wenzel WW (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. New Phytol 168:293–303. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x

Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. (Special issue: Structure and functioning of cluster roots and plant responses to phosphate deficiency). Plant Soil 248:43–59.

Huang B, Duncan RR, Carrow RN (1997) Drought-resistance mechanisms of seven warm-season turfgrasses under surface soil drying: II. Root aspects. Crop Sci 37:1863–1869.

IPCC (2013) Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor MMB, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM. eds. Cambridge, UK & New York, NY, USA: Cambridge University Press.

Jaillard B, Hinsinger P (1993) Root-induced release of interlayer potassium and vermiculitization of phlogopite as related to potassium depletion in the rhizosphere of ryegrass. J Soil Sci 44:525–534.

Kell DB (2011) Breeding crop plants with deep roots: their role in sustainable carbon, nutrient and water sequestration. Ann Bot 108:407–418. doi: 10.1093/aob/mcr175

Laclau JP, Almeida JCR, Gonçalves JLM, et al. (2009) Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in Eucalyptus plantations. Tree Physiol 29:111–124. doi: 10.1093/treephys/tpn010

Laclau JP, Ranger J, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2010) Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations. For Ecol Manag 259:1771–1785. doi: 10.1016/j.foreco.2009.06.010

Laclau JP, da Silva EA, Rodrigues Lambais G, et al. (2013) Dynamics of soil exploration by fine roots down
to a depth of 10 m throughout the entire rotation in Eucalyptus grandis plantations. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00243

Maeght JL, Rewald B, Pierret A (2013) How to study deep roots-and why it matters. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00299

Maquère V (2008) Dynamics of mineral elements under a fast-growing eucalyptus plantation in Brazil. Implications for soil sustainability, Ph.D thesis Agro Paris Tech and USP-ESALQ, Brazil.

Maurice J, Laclau JP, Re DS, et al (2010) Fine root isotropy in *Eucalyptus grandis* plantations. Towards the prediction of root length densities from root counts on trench walls. Plant Soil 334:261–275.

Melo VF, Corrêa GF, Ribeiro AN, et al (2005) Cinética de liberação de potássio e magnésio pelos minerais da fração argila de solos do Triângulo Mineiro. Rev Brasil Ciência Solo 29:533–545. https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832005000400006

Melo VF, Schaefer CEGR, Novais RF, et al. (2007) Potassium and magnesium in clay minerals of some Brazilian soils as indicated by A sequential extraction procedure. Commun Soil Sci Plant Anal 33:2203–2225. doi: 10.1081/CSS-120005757

Nadezhdina N, David TS, David JS, et al. (2010) Trees never rest: the multiple facets of hydraulic redistribution. Ecohydrology 3:431–444. doi: 10.1002/eco.148

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol Earth Syst Sci 11:1633–1644. doi: 10.5194/hess-11-1633-2007

Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nat Rev Microbiol 11:789–799. doi: 10.1038/nrmicro3109

Pinheiro RC, de Deus JC, Nouvellon Y, et al. (2016) A fast exploration of very deep soil layers by Eucalyptus seedlings and clones in Brazil. For Ecol Manag 366:143–152. doi: 10.1016/j.foreco.2016.02.012

Reinhold-Hurek B, Bünger W, Burbano CS, et al. (2015) Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. Annu Rev Phytopathol 53:403–424. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102342

Rewald B, Godbold DL, Falik O, Rachmilevitch S (2014) Root and rhizosphere processes - high time to dig deeper. Front Plant Sci. 5:278.

Römheld V, Kirkby EA (2010) Research on potassium in agriculture: needs and prospects. Plant Soil 335:155–180. doi: 10.1007/s11104-010-0520-1

Santiago LS, Wright SJ, Harms KE, et al. (2012) Tropical tree seedling growth responses to nitrogen, phosphorus and potassium addition. J Ecol 100:309–316. doi: 10.1111/j.1365-2745.2011.01904.x

Schenk HJ, Jackson RB (2002) Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. J Ecol 90:480–494.

Silva, IR, Novais RF, Jham GN, et al. (2004) Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. Tree physiol 24:1267–1277.

Sokolova TA (2015) Specificity of soil properties in the rhizosphere: Analysis of literature data. Eurasian Soil Sci 48:968–980. doi: 10.1134/S1064229315050099

Taylor AB, Velbel MA (1991) Geochemical mass balances and weathering rates in forested watersheds of the southern Blue Ridge II. Effects of botanical uptake terms. Geoderma 51:29–50.

Thom D, Seidl R (2015) Natural disturbance impacts on ecosystem services and biodiversity in temperate and boreal forests. Biol Rev Camb Philos Soc. doi: 10.1111/brv.12193

Turpault M-P, Gobran GR, Bonnaud P (2007) Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. Geoderma 137:490–496. doi: 10.1016/j.geoderma.2006.10.005

Turpault MP, Uterano C, Boudot JP, Ranger J (2005) Influence of mature Douglas fir roots on the solid soil phase of the rhizosphere and its solution chemistry. Plant Soil 275:327–336.

Van Raij B, Quaggio JA (2001) Determinação de fósforo, cálcio, magnésio e potássio extraídos com resina trocadora de íons. In: Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. B. van Raij, J.C. de Andrade, H. Cantarella, J.A. Quaggio (eds), Instituto Agronômico, Campinas, Brazil, pp 189-199.

Velbel MA, Price JR (2007) Solute geochemical mass-balances and mineral weathering rates in small watersheds: Methodology, recent advances, and future directions. Appl Geochem 22:1682–1700. doi: 10.1016/j.apgeochem.2007.03.029

West A, Galy A, Bickle M (2005) Tectonic and climatic controls on silicate weathering. Earth Planet Sci Lett 235:211–228. doi: 10.1016/j.epsl.2005.03.020

Wu Z, Dijkstra P, Koch GW, Peñuelas J, Hungate BA (2011) Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: a meta-analysis of experimental manipulation. Global Change Biology 17:927–942.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

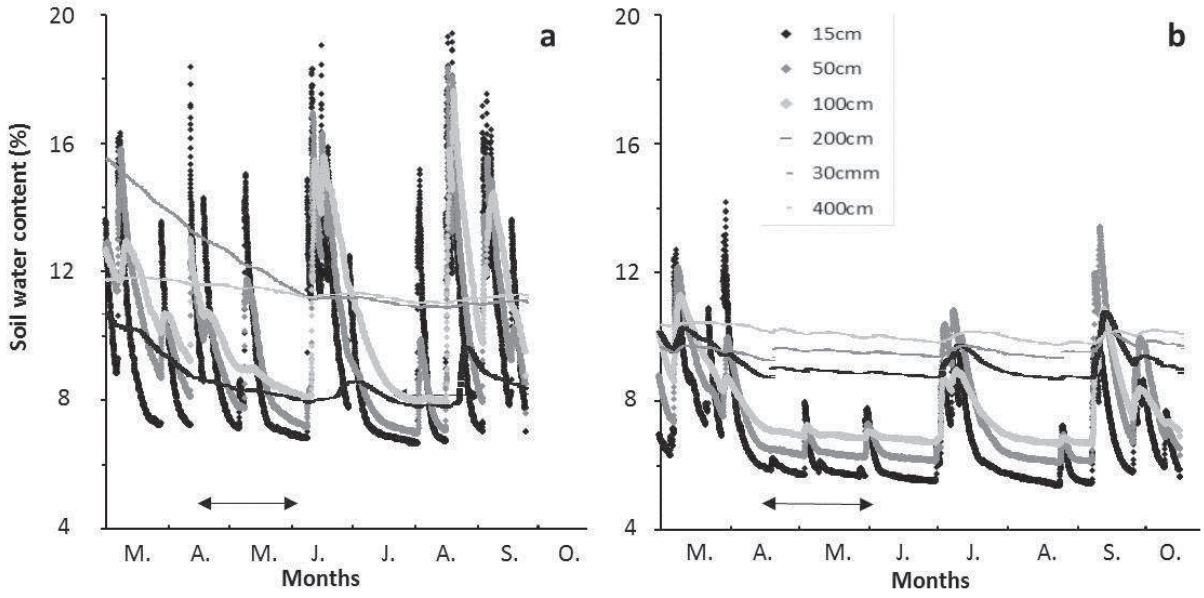


Figure S1. Volumetric soil water content (SWC) in the +W (a) and –W (b) treatments between topsoil and the depth of 4 m, from March 2015 to October 2015. The arrows indicate the collection period.

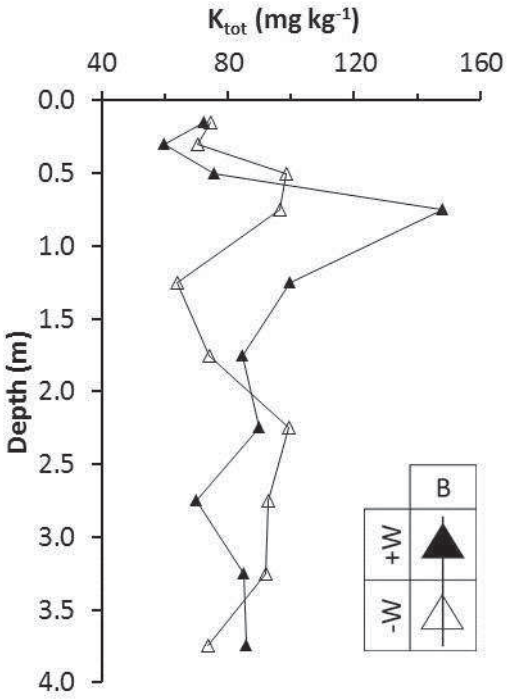


Figure S2. Soil pseudo-total K concentration of the bulk soil along the soil profile for both treatments (+W = full symbol; –W = open symbol) upon sampling time, B stands for bulk soil.

Table S1. Circumference and aboveground biomass of the trees in the three blocks for –W and +W treatments. Data were collected in April 2015. Significant treatment effect were found on circumference ($p<0.01$) and aboveground biomass ($p<0.01$) but not on block. The study was made in the block 3 (bold values).

Block	Treatment	Circumference (cm)			Aboveground biomass (Mg ha^{-1})		
			mean	sd		mean	sd
1		44.5			136.3		
2	+W	43.0	43.6	0.8	125.0	130.4	5.7
3		**43.3**			**130.0**		
1		39.0			95.2		
2	–W	40.4	40.0	0.9	107.0	104.4	8.3
3		**40.7**			**111.1**		

Table S2. Concentrations (mg kg^{-1}) obtained for the available Ca and Mg in the bulk soil (Bulk) and in the rhizosphere (Rhizo) in the +W and –W treatments for the 4 repetitions (Rep). The limit of detection for Ca was 1.12 mg kg^{-1} and 0.56 mg kg^{-1} for Mg. Hence, only the values above the determination threshold are meaningful (2.24 mg kg^{-1} for Ca and 1.12 mg kg^{-1} for Mg). Values below the determination threshold were indicated by a hyphen.

	Depth (m)		+W				–W			
			Rep 1	Rep 2	Rep	Rep 4	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4
Ca	0-0.2	Bulk	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rhizo	91.98	15.70	6.73	25.80	-	-	3.36	-
	0.2-4	Bulk	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rhizo	-	-	-	-	-	-	-	-
Mg	0-0.2	Bulk	1.97	1.41	1.97	1.69	-	-	2.82	-
		Rhizo	49.01	12.39	5.35	16.62	1.69	2.82	3.66	2.53
	0.2-0.4	Bulk	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rhizo	-	-	-	-	1.13	1.13	-	1.13
	0.4-0.6	Bulk	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rhizo	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.6-1	Bulk	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rhizo	-	-	-	-	1.13	-	-	-
	1-4	Bulk	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rhizo	-	-	-	-	-	-	-	-

Article 2 *La réduction des pluies n'affecte pas la disponibilité en aluminium et en nutriments pendant la saison des pluies dans des plantations d'eucalyptus sous climat subtropical humide.*

Article 2: Rainfall reduction does not affect Al and nutrient availability during the wet season in a Eucalyptus grandis plantation grown in a deep Ferralsol under humid sub-tropical climate

Céline Pradier[1], Philippe Hinsinger[2], Jean-Paul Laclau[1], Suzanni Leal, Jean-Pierre Bouillet[1], Irae Amaral Guerrini[3], José Leonardo Moraes Gonçalves[4], Christophe Jourdan[1]

[1]CIRAD, UMR Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France

[2]INRA, UMR Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier, France

[3]LSO, UNESP, Botucatu, Brasil

[4]LCF, ESALQ, Piracicaba, Brasil

ABSTRACT

Rhizosphere biochemistry characterization under various climatic conditions may help to understand the general ability of trees to cope with the climatic anomalies forecasted for the coming years. The aim of this study was to assess the influence of rainfall reduction on the availability of exchangeable nutrients (K, Ca and Mg) and Al in an acidic and nutrient-poor, deep forest soil developed under sub-tropical climate. Rhizosphere and bulk soil samples were collected along six soil layers down to 2-m depth during the wet season. An enrichment of K and protons within the rhizosphere was found and a strong negative linear correlation between pH and Al concentration suggested the likely occurrence of Al tolerance and/or resistance mechanism in eucalypt tree roots, which acidified their rhizosphere, thereby increasing the availability of Al ions. No rainfall reduction effects were found on the availability of nutrients. This study further confirms the enrichment of protons and nutrients within the rhizosphere in the topsoil as well as at large soil depth previously evidenced in the dry season, suggesting that these processes may occur all along the year. However, it shows an effect of the season on the impact of drought events in eucalypt plantation in humid sub-tropical region. Indeed, it does not show that these processes are enhanced under rainfall reduction conditions, as previously observed in the dry season.

INTRODUCTION

Climatic extreme anomalies threaten the ecosystems' stability in many parts of the world and notably in forest ecosystems (Wu et al. 2011). More intense and frequent drought events are expected to occur in the central part of South America (Dai 2013), where natural forest and forest plantations cover a great part of the territory. Planted forest represent 6.5M ha in Brazil and 75% are composed of eucalyptus trees (ABRAF 2012). Eucalypus plantations are in constant expansion, notably in areas known to have acidic soils and a consequently high level of exchangeable aluminium (Gonzalez et al. 2009, de Alcântara et al. 2015). The root plasticity is a key process in the adaptation to soil stress condition (Huang et al. 1997, Eissenstat et al. 2000, Aroca 2012), both in terms of root growth/exploration and root functioning. How these root processes are affected by the season and rainfall reduction is still unknown in the context of (sub-)tropical forest plantations.

Harmless when incorporated into aluminosilicates or other precipitated forms, aluminium can become highly rhizotoxic under its soluble form Al^{3+} under acidic soil conditions (Ryan et al. 1993, Kochian 1995). Indeed, an accumulation of Al^{3+} in root tips can inhibit the root elongation, and consequently, disturb nutrient and water uptake (Samac and Tesfaye 2003, Vitorello et al. 2005). However, some plants growing on acidic soil acidify their rhizosphere without being affected by Al^{3+} toxicity. This is the case for *douglas fir* (Turpault et al. 2007) and *eucalyptus grandis* (Pradier et al. *in revision*) notably in Brazilian eucalypt plantations. Aluminum-resistant species can employ exclusion and/or tolerance mechanisms. Exclusion relates to the secretion of chelating agents (carboxylates such as citrate, malate, and oxalate, …) to prevent aluminum uptake. Tolerance is the production of chelating agents to bind Al in the cell wall or to complex the metal in a nonreactive form in the vacuole of root cells (Kochian, 1995). Concerning eucalypts, the mechanisms of resistance and its efficiency vary among the species but a combination of both exclusion and tolerance seems to be the rule (da Silva et al. 2004).

An acidification of the rhizosphere by root functioning may however have a positive effect for plant nutrition by increasing the availability of some nutrients, e.g. through inducing the weathering of nutrient-bearing minerals (Hinsinger et al. 1993, Courchesne and Gobran 1997, Bakker et al. 2004, Turpault et al. 2005). Better understanding the biogeochemistry of the rhizosphere and biogeochemical processes at such local scale is essential for fully characterizing nutrient availability and stress intensity (Wang et al. 2000) and ultimately to evaluate the global capacity of trees to cope with abiotic stress, possibly linked with more frequent and intense drought events.

Seasonal effects on topsoil rhizosphere biogeochemistry have been repeatedly documented in spruce stand under temperate climate (Turpault 2007, Collignon et al. 2011ab-2012, Calvarusso et al. 2014). The effect of drought events on rhizosphere biogeochemistry under sub-tropical conditions have been

documented during the dry season down to 4-m depth (Pradier et al. *in revision*) for a eucalypt plantation in a humid, sub-tropical climate. The consequences of these drought events have not been yet explored during the wet season.

Here, we investigated the rhizosphere biogeochemistry of a 5.5 year old *Eucalyptus grandis* clonal plantation grown on a ferralitic soil and submitted to either rainfall reduction treatment or not. The objective was to evaluate an eventual impact of the rainfall regime modification during the wet season, considering the pH of the rhizosphere, the availability of nutrients and the exposure of roots to exchangeable aluminum, compared with bulk soil down to 2-m depth.

MATERIAL & METHODS

2.2.1. Study site and soil properties

The experiment was carried out on the heavily instrumented forest site of Itatinga (São Paulo State, Brazil, 23°02'S, 48°38'W), on a research station owned by the University of São Paulo. This site is located at 300 km from the sea, is rather flat (slope ≤ 3%), with an elevation of 860 m, and exhibits a humid sub-tropical climate ranked as a Cfa according to the Köppen classification (Peel et al. 2007), with a cold and dry season occurring between June and September. On average over the past 15 years, the annual rainfall was 1360 mm and the annual temperature was 19°C. There is a water table at approximately 17-m depth on the experimental site. The studied soil is a deep Ferralsol (according to FAO classification) / Typic Hapludox (according to USDA Soil Taxonomy) developed on Cretaceous sandstone, and exhibits little horizon differentiation. According to Laclau et al. (2010), between the soil surface and 4-m soil depth, soil properties are the following (the values range from top excluding the top 0-5 cm to depth) : Clay (151 – 256 g kg^{-1}), Silt (29 – 53 g kg^{-1}), Sand (620 – 732 g kg^{-1}), CEC (0.87 – 0.08 $cmol_c$ kg^{-1}), organic C (6.4 – 2.0 g kg^{-1}), total N (0.47 – 0.11 g kg^{-1}).

2.2.2. Experimental set up

A split-plot experimental design has been installed in June 2010 with a highly productive *Eucalyptus grandis* clone used in the industrial plantations of the Suzano firm. Four treatments have been applied in three blocks (Figure 1a) : 2 K fertilization regimes (+K and –K) x 2 precipitation regimes (+W and –W). The Four treatments are (1) -K-W, without K fertilization and with 37 % of throughfall exclusion, (2) +K-W, with a K fertilization of 0,45 mol $K.m^{-2}$ applied as KCl (non-limiting K nutrition for adequate three growth according to Almeida et al., 2010) and an exclusion of 37 % of the throughfall, (3) -K+W, without K fertilization and without throughfall exclusion and (4) +K+W, with the same K fertilization as treatment 2 and without throughfall exclusion.

The –W modality has been designed using a gutter system installed two months after planting: each inter-row was equipped with two 40-cm wide plastic sheets that intercept 37% of the throughfall and allow mimicking the rainfall reduction forecasted for the end of the 21st century in Brazil (Solomon et al. 2009). The +W received normal rainfall and shall be thus considered as the control treatment.

The present work has been carried out in two of these four treatments: +K +W and +K –W to focus on the impact of the rainfall treatment. For simplification, in the present paper the treatment (+K +W) will be abbreviated +W and the treatment (+K –W) will be abbreviated –W.

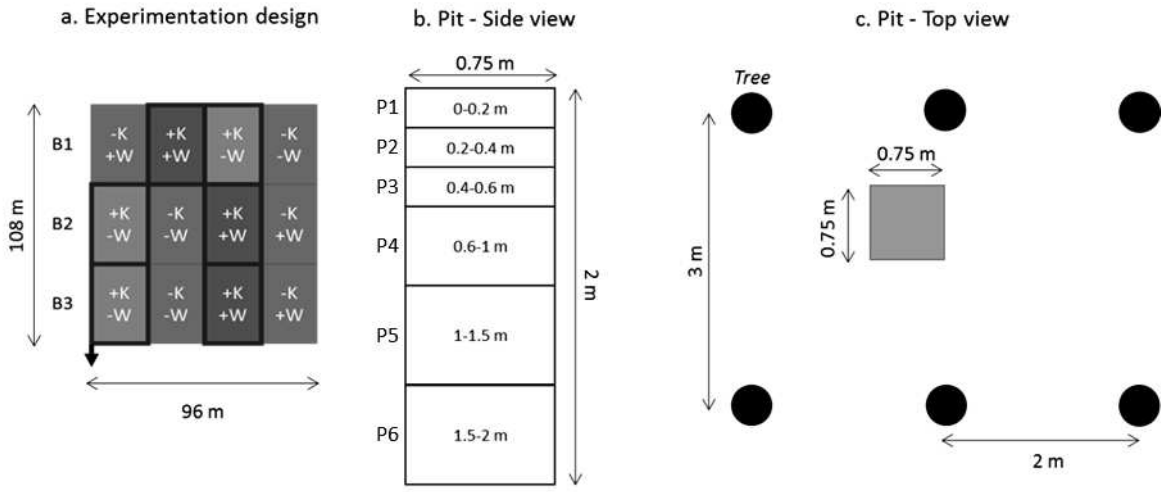


Figure 1: a. Complete experimental design with the three blocks: B1, B2 and B3 and the 6 treatments. The studied treatments (+K, +W) and (+K, -W) are marked with a bold outline. b. Top view of the position of the pit within the row and inter-row of the plantation. c. Side view of the pit with the six sampled depths from 0 to 2-m-depth.

Soil samples were collected in December 2015, which corresponds to the wet season. A 75 cm wide square pit was dug in the 3-m wide inter-row of the two selected treatments (-W and +W) for each of the three blocks (6 pits have been dug in total). Rhizosphere and bulk soils were sampled in layers located at 6 depths from the surface, down to a depth of 2 m (Figures 1b and 1c) following the method described in Pradier et al*. (in revision)*. Briefly, for the rhizosphere, this consisted in gently brushing off the soil adhering to roots, while the bulk soil was collected from root-free zones on the sides of the pit.

2.2.3. Soil analyses

Rhizosphere and bulk soil samples were air-dried at room temperature and sieved at 2 mm to remove root debris and to be homogenized prior to analyses. Concentrations of available elements (resin-P, exchangeable K, Ca, Mg and Al) and pH were determined at the Soil Department of UNESP (Universidade Estadual Paulista, in Botucatu, Brazil). Major nutrients (P, K, Ca and Mg) and exchangeable Al were extracted using a 1:1 mixture of an anion exchange resin to assess the available

pool of phosphate (strong base type, 20-50 mesh beads, Amberlite IRA-400) and a cation exchange resin to assess the exchangeable pool of K, Ca, Mg and Al (strong acid type, granulometry 20-50 mesh, Amberlite IR-120). A soil suspension was prepared at a 1:1 soil mass:extracting resin volume and shaken for 16 hours. After the elution of the resins, the concentrations of the extracted cations were determined by Flame Atomic Absorption spectrometer (Perkin Elmer 2380 United States) and the concentration of available phosphorus was determined using a spectrophotometer (Femto 600plus Brazil). For pH measurements, a soil suspension was prepared at a 1:5 soil mass:extracting volume ratio according to the NF ISO 10390 standard, using 0.01M $CaCl_2$ as a background electrolyte that yields a better stability of pH reading. The difficulty of collecting a large quantity of rhizosphere soil at depth required to slightly adapt the NF ISO 10390 protocol using only 2 g of soil in 10 cm^3 extracting solution, and a micro pH electrode (SenTix Mic-D-300x300).

2.2.4. Statistical analyses

Before statistical analysis, all pH values were converted to H_3O^+ concentrations. Statistical analyses were conducted with the R software (version 3.2.2). For the graphical representations, the mean values were calculated from our replicates (n=3), as well as the standard errors.

We used a linear model with five main factors [treatment (-W/+W), depth (P1-P6), compartment (Rhizosphere/Bulk soil), replicate (B1, B2, B3)]; we also had the factor [H_3O^+] in the model (except for fitting [H_3O^+]). We used a Shapiro-Wilk test to check the normality of the residues before performing the variance analyses using the ANOVA function of the R software.

RESULTS

2.3.1. Biogeochemical properties within each of the two compartments

pH and Al

The values obtained in the rhizosphere compartment for the first depth in the first block, for both –W and +W were very different from those of the two other blocks (+W: 4.21 in B1, 3.83 in B2 and 3.73 in B3; -W: 4.80 in B1, 3.97 in B2 and 4.08 in B3). We thus decided to compute the statistics only for depths P2 to P6. The pH of the bulk soil was not influenced by the rainfall treatment (figure 2a) but it was significantly influenced by depth at p<.001 (see Table 1), linearly increasing with depth (R^2>0.89) from 4.07 at 0.2m to 4.35 at 2-m depth. The pH of the rhizosphere was not influenced by the rainfall treatment neither (Figure 2b). As noted above, the values of pH obtained within the first depth (P1: 0-0.2 m) presented high standard errors (0.45 pH unit in the –W treatment) and could hardly be interpreted. The pH of the rhizosphere between 0.2 to 2-m depth was significantly influenced by soil depth (p<0.001) and followed the same increasing trend as for the bulk soil.

Table 1: Results of the ANOVA analyses applied to the residues of the linear model: lm (variable ~ [H3O+] + depth + compartment + treatment + replicate, data = DF). Signif. Codes: 0 '*' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1. (P2-P6) specifies the variables for which the analyses only for the P2-P6 soil depths, i.e. after excluding the topsoil values (P1: 0-0.2 m).**

	H_3O^+ (P2-P6)	K (P1-P6)	P (P1-P6)	Al (P2-P6)	Mg (P2-P6)
$[H_3O^+]$ (pH)		***	***	***	***
Soil depth	***	***	***	***	
Compartment	***	***	.	*	.
Treatment			.	***	
Replicate	**				
Shapiro-Wilk	0.9433	0.0149	3.62e-09	0.4803	0.0002495

The values obtained for Al within P1 in both treatments in the first block were really lower than those obtained in the two other blocks, which is consistent with pH values: +W: 4.04 mg kg^{-1} in B1, 12.51 mg kg^{-1} in B2, 12.85 mg kg^{-1} in B3; -W: 0.91 mg kg^{-1} in B1, 8.58 mg kg^{-1} in B2, 6.89 mg kg^{-1} in B3. The Figure 2d does not consider this value and the statistical analyses have been conducted from P2 to P6 (Table 1). The Al concentration in the bulk soil was hardly influenced by the rainfall treatment (p<0.05) (Figure 2c) with a maximum difference of 0.97 mg kg^{-1} at P4. Soil depth had a significant effect on Al concentration in the bulk soil, which decreased (following a logarithmic function with a R^2> 0.98) from a mean value around 7 mg kg^{-1} (6.86 and 7.73 mg kg^{-1} for +W and –W respectively) to a mean value

around 2 mg kg^{-1} (2.02 and 1.86 mg.kg^{-1} for +W and –W respectively) at 2-m depth. Concerning the rhizosphere, a slight rainfall treatment effect ($p<0.01$) was found, with slightly higher Al concentration in the +W treatment (Figure 2d). The Al concentrations in the rhizosphere were significantly influenced by soil depth ($p<0.001$), decreasing from a mean value around 7 mg kg^{-1} in P2 (7.43 and 6.57 for +W and –W respectively) to a mean value around 3 mg kg^{-1} at 2-m depth in P6 (3.79 and 2.91 for +W and –W respectively).

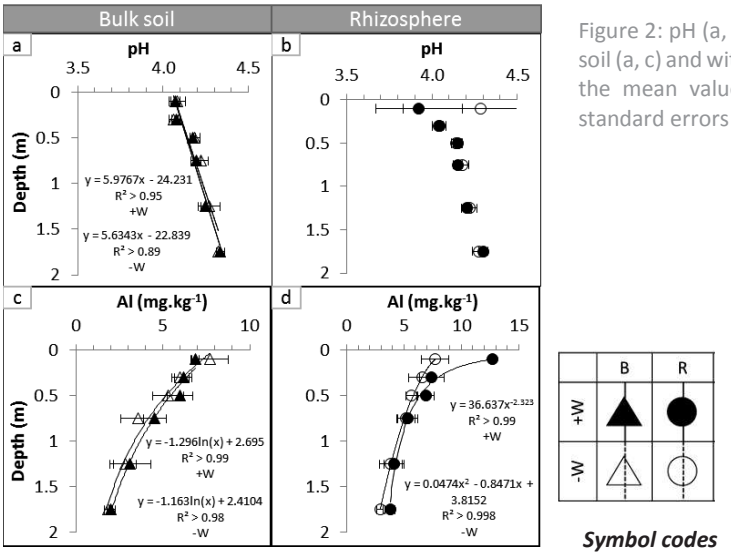


Figure 2: pH (a, b) and Al (c, d) values obtained within the bulk soil (a, c) and within the rhizosphere (b, d). Each point represent the mean value obtained for the 3 blocks; bars represent standard errors (n=3).. In d, n=2 for the first depth.

Nutrients: K, P, Mg

The results obtained for exchangeable Ca are available in sup data 1 and 2. They did not allow any interpretation due to the higher variability of the results within the first depth layer and to the low concentration in the lower parts of the soil profile, reaching the limit of detection (0.72 mg.kg^{-1}). The mean values at P1 depth in the rhizosphere were 3.69 and 3.28 mg kg^{-1} for +W and –W treatment respectively (without considering an outlier found in B1).

Soil depth had a significant effect on the exchangeable K values within the bulk soil (Figure 3a) only when taking into account depth P1 (<0.001). The K values decreased from a mean value of 0.13 mg kg^{-1} and 0.16 mg kg^{-1} for +W and –W respectively in the topsoil (0-0.2 m) to a mean value of 0.06 mg kg^{-1} in both treatments when considering depths P2 to P6 together. The throughfall exclusion treatment had no significant effect. As for the bulk soil, the treatment had no significant effect on the K values within the rhizosphere (Figure 3b). The soil depth had an effect mostly within the top 60 cm where the K values decreased from 0.8 and 0.6 mg kg^{-1} for +W and –W respectively to a value of 0.18 and 0.23 mg kg^{-1} for +W and –W respectively. Below 60 cm the K values of the +W treatment remained quite constant (mean= 0.18 mg kg^{-1}); a slight increase (to a value of 0.26 mg kg^{-1}) was found within the P5 depth (1-1.5 m) in the –W treatment.

For P concentrations, we shall remind here that we have to take into account the ANOVA results with care according to the low value obtained for the Shapiro test (Table 1). The P concentration of the bulk soil (Figure 3c) was significantly influenced by soil depth ($p<0.001$). The values ranged from 5.19 and 3.21 for +W and –W treatment respectively to a value of 1.34 and 1.61 mg kg^{-1} for +W and –W respectively between depth P1 and depth P3. There was a high standard error for the depth P1 (1.84 and 0.69 mg kg^{-1} for +W and –W respectively). Below 0.6 m, the values roughly remained constant in both treatments at a mean value of 1.5 mg kg^{-1} (1.48 and 1.51 mg kg^{-1} for +W and –W respectively). The throughfall exclusion treatment had no significant effect. The P concentration obtained within the rhizosphere of the second block for P3 depth in the +W treatment was almost 3-fold higher than the values obtained in the two other blocks (8.16 mg kg^{-1} in B2 and, 2.60 mg kg^{-1} in B1, 3.01 mg kg^{-1} in B3) and may thus lead towards misinterpretation of the general trend. On Figures 3d, 5d and 5f, the point when considering this value has thus been highlighted with a grey-background circle/square symbol. The following interpretations were made after discarding this outlier. The P concentrations measured within the rhizosphere (Figure 3c) showed roughly the same pattern as found for P concentrations measured in the bulk soil. They significantly decreased within the top 0.6 m (from 7.30 to 1.52 mg kg^{-1} in +W and from 4.81 to 1.49 mg kg^{-1} in –W), while no significant change with depth was observed between 0.6 and 2 m (with a mean value of 1.48 and 1.51 mg kg^{-1} for +W and –W respectively). As for the bulk soil, there was a high standard error for the P1 depth (1.56 and 1.04 mg.kg^{-1} for +W and –W respectively).

The Mg concentrations within the rhizosphere of the first depth of the first block, for both –W and +W, were more than twice larger than those of the two other blocks (+W: 12.63 mg kg^{-1} in B1, 6.39 mg kg^{-1} in B2 and 4.59 mg kg^{-1} in B3; -W: 21.41 mg kg^{-1} in B1, 1.76 mg kg^{-1} in B2 and 5.32 mg kg^{-1} in B3). As the results of the statistical analyses were strongly influenced by this, we thus decided to discard the results obtained in the topsoil and base the statistics on P2 to P6 depths. The soil depth had a significant effect ($p<0.001$) on the values of Mg in the bulk soil, which decreased with depth (Figure 3e). However, we have to consider this result with care according to the low value obtained for the Shapiro test (Table 1). Mg concentrations of the bulk soil decreased with depth from a value of 1.33 and 1.27 mg kg^{-1} for +W and –W, respectively, to a mean value of 0.30 mg kg^{-1} in +W at P6 depth. In the –W treatment, the value obtained in the first block for P3 depth was much higher compared to the values obtained in the two other blocks (1.27 mg kg^{-1} in B1, 0.37 mg kg^{-1} in B2, 0.55 mg kg^{-1} in B3). When discarding this value, the Mg concentration was similar for both rainfall treatments and quite constant below 0.4 m at a mean value of 0.33 mg kg^{-1} for both +W and –W. Concerning Mg concentrations in the rhizosphere, apart from the first depth that presented higher concentrations than at further depths, there was no clear trend in the lower part of the profile where the values

remained low at a mean value of 0.5 mg kg^{-1} (considering both treatments over P2 to P6 depths). When discarding the P1 depth in the first block, we obtained a mean value of 5.49 and 3.54 mg kg^{-1} for +W and –W respectively ; rhizosphere Mg concentration at P1 depth still remained more than 6 times higher than the values obtained in the lower parts of the profile.

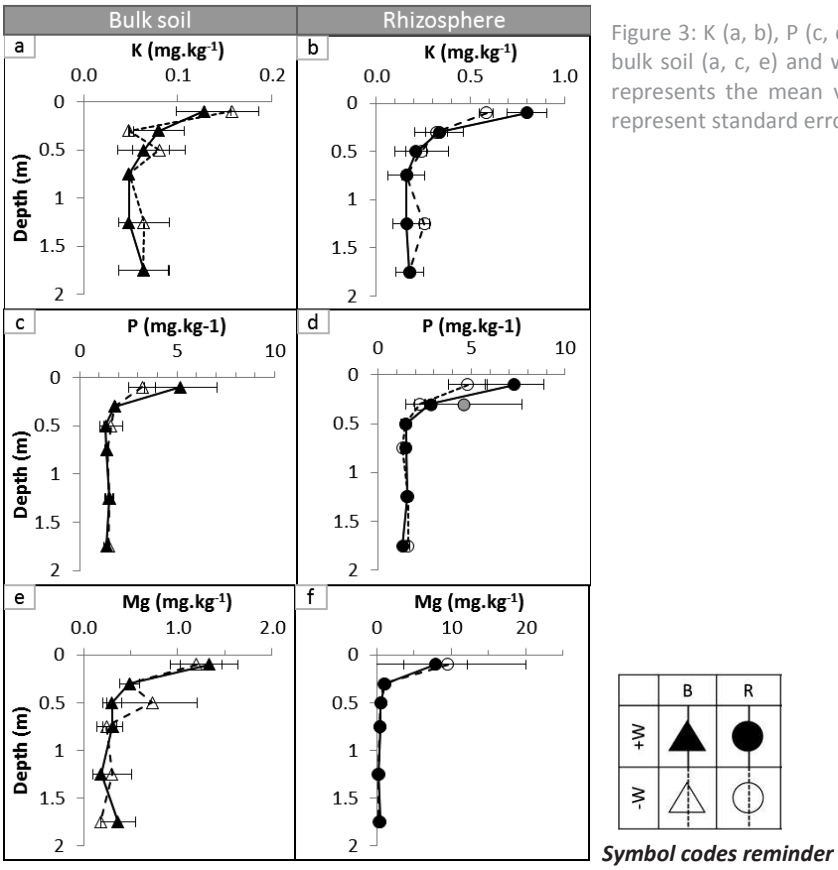


Figure 3: K (a, b), P (c, d) and Mg (e, f) values obtained within the bulk soil (a, c, e) and within the rhizosphere (b, d, f). Each point represents the mean value obtained for the 3 blocks; the bars represent standard error (n=3).

Symbol codes reminder

2.3.2. Rhizosphere effect

pH and Al

A significant acidification ($p<0.001$) of the rhizosphere was found, without a significant effect of the rainfall treatment even though the difference $[H_3O^+]_{bulk} - [H_3O^+]_{rhizo}$ was not the same for both treatments (Figure 4c). The mean value of $[H_3O^+]_{bulk} - [H_3O^+]_{rhizo}$ considering the whole profile (but P1) is indeed amounting to 5.5 10^{-06} and 6.0 10^{-06} for +W and –W respectively. The concentration of available Al was significantly higher within the rhizosphere than within the bulk soil. This rhizosphere effect was observed along the entire profile in the +W treatment and mostly below 0.6 m in the case of –W.

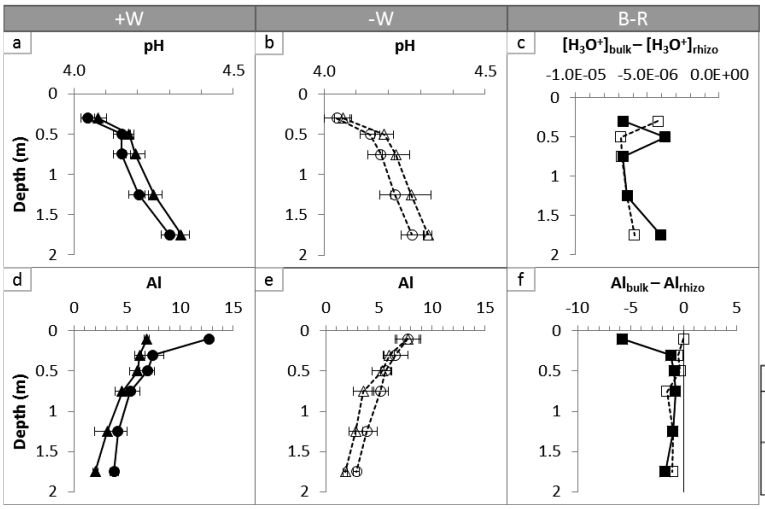


Figure 4: Comparison between results obtained with the bulk soil and the rhizosphere (a,b,d,e) for the pH (a,b) and the available Al (d,e) in both +W treatment (a,d) and –W treatment (b,d). c,d. Differences $[H_30^+]_{bulk} - [H_30^+]_{rhizo}$ (c) and $Al_{bulk} - Al_{rhizo}$ (f) calculated in both rainfall treatment. The bars represent standard errors (n=3).

Symbol codes reminder

Nutrients: K, P, Mg

The concentrations of exchangeable K were significantly higher within the rhizosphere than within the bulk soil (Figure 5a, b, c), along the whole profile ($p<0.001$). Below the depth of 0.6 m the difference amounted to 0.11 and 0.14 mg kg^{-1} for +W and –W respectively. This difference was higher close to the top soil where it reached 0.67 and 0.43 mg kg^{-1} for +W and –W respectively (at P1 depth). The rhizosphere soil showed a significant ($p<0.05$) increase of P concentration relative to the bulk soil (figure 5d, e, f). This effect decreased linearly from the top soil (+2.11 and +1.59 mg kg^{-1} for +W and –W respectively) to become insignificant at the depth of 0.6 m and below. This effect seemed to be slightly higher in the +W treatment even though the level of confidence was low ($p<0.05$). For Mg, a slight rhizosphere effect can be seen in the first meter of the soil where Mg in the rhizosphere soil was a little bit more concentrated than in the bulk soil (Figure 5g, h, i). The particular value concerning the P3 depth as pointed out previously masked this trend for the –W treatment.

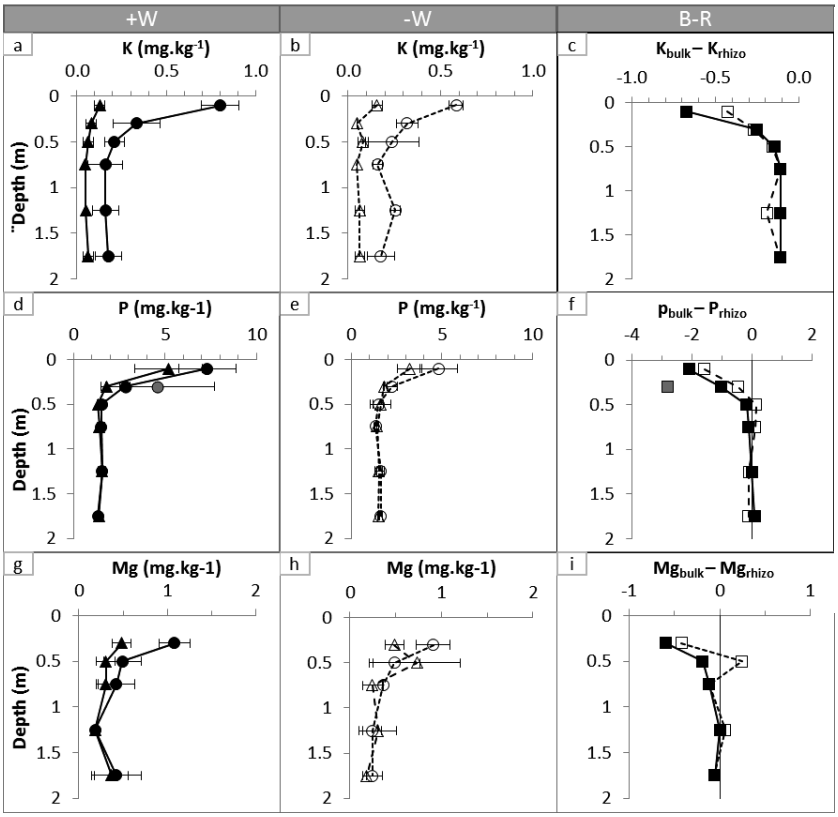
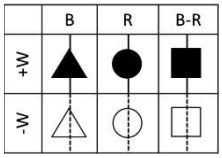


Figure 5: Comparaison between the results obtained with the bulk and the rhizosphere soil for K (a,b), P (d,e) and Mg (g,h) in both +W treatment (a,d,g) and –W treatment (b,e,h). c,f,i. Differences K_{bulk}–K_{rhizo} (c), P_{bulk}–P_{rhizo} (f), Mg_{bulk} –Mg_{rhizo} (i) calculated for both treatments. The grey point in f represents the difference considering the repetition of block 1 (P2). The bars represent standard errors (n=3).



Symbol codes reminder

2.3.3. pH effect on soil biogeochemical properties

All the variables (K, Al, Mg, P) appeared highly influenced by the concentration of H_3O^+ ($p<0.001$). We found a negative linear correlation between Al and the pH with a $R^2>0.86$ when considering both treatments and both soil compartments (Figure 6). No simple trend has been found however for the other variables.

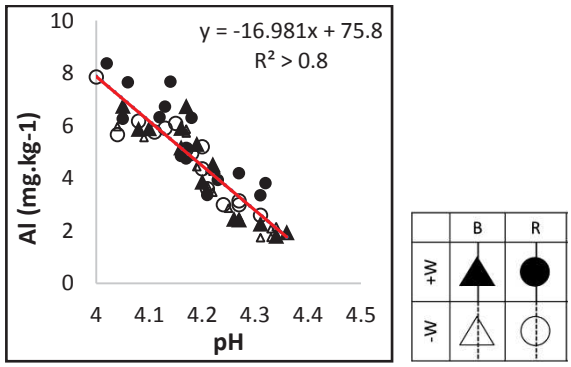


Figure 6: Negative correlation between the Al concentration and the pH within the bulk soil and the rhizosphere in the +W and –W treatments.

DISCUSSION

The root functioning, slightly but significantly decreased the pH within the rhizosphere by a mean value of -0.04 in average for both rainfall treatments. An acidification of the rhizosphere had already been observed in the same eucalypt plantation during the dry season (Pradier et al. *in revision*) as well as on a spruce stand growing in acidic soil conditions under temperate climate (Turpault et al. 2007, Cloutier-Hurteau et al 2011). Changes of pH within the rhizosphere result of a combination of various processes but a decrease in pH mainly results from the root excretion of protons within the rhizosphere to compensate for an accumulation of positive charges within the root because of an excess of cations over anions taken up as nutrients (Hinsinger et al. 2003).

The availability of the major nutrients: K, P, Mg were higher within the rhizosphere as compared to the bulk soil, along the whole soil profile down to 2-m depth for K and only within the 0.6 first m for Mg and P. The enrichment in K in the vicinity was observed in the same plantation during the dry season (Pradier et al. *in revision*) and a study realized on a spruce stand grown on acidic soil already showed an enrichment of K, Ca, and Mg within the rhizosphere during all the seasons under temperate climate, down to 25 cm (Collignon et al. 2011a). Our present results, compared to those of Pradier et al. *in revision,* allow demonstrating that the observed K enrichment and acidification of the rhizosphere are occurring all along the year within the rhizosphere of eucalypts under sub-tropical climate down to 2m depth. As discussed in detail by Pradier et al. *in revision*, such increase of available K is most probably due to weathering of K-bearing silicate minerals exceeding the actual uptake, related partly to root-induced acidification of the rhizosphere. Such root-promoted dissolution of nutrient-bearing minerals may also apply for P and Mg to some extent (as shown e.g. by Hinsinger et al. 1993 and Hinsinger and Gilkes 1996), although increased Mg concentration in the rhizosphere is often considered to be the consequence of mass-flow (Barber 1995).

The accumulation of exchangeable Al was, as expected, strongly linearly correlated with the decrease of pH, leading to a higher potential availability of the rhizotoxic form Al^{3+} within the rhizosphere. Previously largely documented, this linear correlation has been obtained here within a non-perturbed soil along a deep soil profile down to 2-depth. This high level of exchangeable Al in the vicinity of roots confirmed the resistance of the eucalypt trees to Al toxicity. A slight treatment effect was found in the sense of a higher enrichment of Al within the rhizosphere in the +W treatment. A seasonal effect on aluminum toxicity in acid bulk soil for the rhizosphere of Norway spruce have been documented under temperate climate leading to a significant increase of exchangeable Al concentration in winter (Collignon et al. 2012).

The rainfall reduction treatment had no significant impact on the observed rhizosphere effects (changes of pH and nutrient availability), during the wet season, whereas the same rainfall exclusion treatment led to a significantly higher enrichment of exchangeable K and acidification within the rhizosphere during the dry season (Pradier et al. *in revision*). The data of soil humidity over one year in this experiment are available in supplementary data of Pradier et al. *in revision*, and point out the non-recharge of the soil water stock in the –W treatment compared to the control treatment, during the wet season. It is thus quite logical that a 37% throughfall exclusion yielded more visible effects during the dry season when few rain events occurred and lower water stock was available for trees in the soil. In addition, the highest rainfall treatment effect was found below 2-m depth during the dry season. It thus would have been interesting to see if this were still the case during the wet season, which would have required to dig pits below 2-m depth. This would have been too time-consuming for being conducted in all three blocks.

This study confirms under sub-tropical climate and until 2-m depth that processes resulting from interactions between roots and soil influence the availability of nutrients. These processes resut in an increase of available nutrient concentrations within the rhizosphere, an acidification of the root environment and thereby an increase of the potential risk of Al toxicity. This study confirmed the ability of eucalypt trees to cope with such acidic and poor nutrient soil conditions, despite the high availability of Al. This study also completed the rather scarce previous literature in this domain, and allowed concluding that the impact of a rainfall reduction under sub-tropical climate mostly affected root functioning during the dry season. The study shows the ability of the root system to recover after a drought event, with the return of rain. We could not see differences anymore between the two rainfall treatments whereas Pradier et al. (*in revision*) showed significant differences during the dry season between the two rainfall treatments. This result is consistent with the result of Christina et al. (2015) who showed the rapid influence of the return of rain after a drought (dry season combined with the –W treatment) on the GPP (gross primary production), especially during the third year when there was less water available in the soil in the –W treatment.

REFERENCES

ABRAF (2012) Anuário Estatístico da ABRAF. In: Ano Base 2011. Brasilia, DF.

de Alcantara BK, Pizzaia D, Piotto FA, et al. (2015) Temporal dynamics of the response to Al stress in Eucalyptus grandis x Eucalyptus camaldulensis. An Acad Bras Cienc 87:1063–1070. doi: 10.1590/0001-3765201520140322

Aroca R (2012) Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features. Springer Science & Business Media

Bakker MR, George E, Turpault MP, et al. (2004) Impact of Douglas-fir and Scots pine seedlings on plagioclase weathering under acidic conditions. Plant Soil 266:247–259.

Barber SA (1995) Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach, 2 edition. Wiley

Calvaruso C, Collignon C, Kies A, Turpault M-P (2014) Seasonal Evolution of the Rhizosphere Effect on Major and Trace Elements in Soil Solutions of Norway Spruce (<i>Picea abies Karst</i>) and Beech (<i>Fagus sylvatica</i>) in an Acidic Forest Soil. Open J Soil Sci 4:323–336. doi: 10.4236/ojss.2014.49034

Christina M, Le Maire G, Battie-Laclau P, et al. (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. Glob Change Biol 21:2022–2039. doi: 10.1111/gcb.12817

Cloutier-Hurteau B, Sauve S, Courchesne F (2011) Predicting Al, Cu, and Zn concentrations in the fine roots of trembling aspen (Populus tremuloides) using bulk and rhizosphere soil properties. Can J For Res-Rev Can Rech For 41:1267–1279. doi: 10.1139/X11-052

Collignon C, Boudot J-P, Turpault M-P (2012) Time change of aluminium toxicity in the acid bulk soil and the rhizosphere in Norway spruce (Picea abies (L.) Karst.) and beech (Fagus sylvatica L.) stands. Plant Soil 357:259–274. doi: 10.1007/s11104-012-1154-2

Collignon C, Calvaruso C, Turpault M-P (2011a) Temporal dynamics of exchangeable K, Ca and Mg in acidic bulk soil and rhizosphere under Norway spruce (Picea abies Karst.) and beech (Fagus sylvatica L.) stands. Plant Soil 349:355–366. doi: 10.1007/s11104-011-0881-0

Collignon C, Uroz S, Turpault M-P, Frey-Klett P (2011b) Seasons differently impact the structure of mineral weathering bacterial communities in beech and spruce stands. Soil Biol Biochem 43:2012–2022. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.05.008

Courchesne F, Gobran GR (1997) Mineralogical variations of bulk and rhizosphere soils from a Norway spruce stand. Soil Sci Soc Am J 61:1245–1249.

Dai A (2013) Increasing drought under global warming in observations and models. Nat Clim Change 3:52–58. doi: 10.1038/nclimate1633

Eissenstat DM, Wells CE, Yanai RD, Whitbeck JL (2000) Building roots in a changing environment: implications for root longevity. New Phytol 147:33–42.

Gonzalez JAZ, Costa MD, Silva IR, et al. (2009) Acúmulo de ácido oxálico e cristais de cálcio em ectomicorrizas de eucalipto.: I- produção de ácido oxálico e concentração de nutrientes em

raízes laterais finas colonizadas por fungos ectomicorrízicos. Rev Bras Ciênc Solo 33:541–553. doi: 10.1590/S0100-06832009000300007

Hinsinger P, Elsass F, Jaillard B, Robert M (1993) Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. J Soil Sci 44:535–545. doi: 10.1111/j.1365-2389.1993.tb00475.x

Hinsinger P, Gilkes RJ (1996) Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. Eur J Soil Sci 47:533–544. doi: 10.1111/j.1365-2389.1996.tb01853.x

Hinsinger P, Plassard C, Tang CaiXian, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. (Special issue: Structure and functioning of cluster roots and plant responses to phosphate deficiency). Plant Soil 248:43–59.

Huang B, Duncan RR, Carrow RN (1997) Drought-resistance mechanisms of seven warm-season turfgrasses under surface soil drying: II. Root aspects. Crop Sci 37:1863–1869.

Kochian LV (1995) Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 46:237–260. doi: 10.1146/annurev.pp.46.060195.001321

Laclau J-P, Ranger J, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2010) Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations. For Ecol Manag 259:1771–1785. doi: 10.1016/j.foreco.2009.06.010

Pradier C, Hinsinger P, Laclau J-P, et al. (in revision) Rainfall reduction impacts rhizosphere biogeochemistry in eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil. In revision in Plant and soil

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol Earth Syst Sci 11:1633–1644. doi: 10.5194/hess-11-1633-2007

Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV (1993) Aluminium Toxicity in Roots: An Investigation of Spatial Sensitivity and the Role of the Root Cap. J Exp Bot 44:437–446. doi: 10.1093/jxb/44.2.437

Samac DA, Tesfaye M (2003) Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. Plant Cell Tissue Organ Cult 75:189–207. doi: 10.1023/A:1025843829545

Silva IR da, Novais RF de, Jham GN, et al. (2004) Responses of eucalypt species to aluminum: the possible involvement of low molecular weight organic acids in the Al tolerance mechanism. Tree Physiol 24:1267–1277.

Turpault M-P, Gobran GR, Bonnaud P (2007) Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. Geoderma 137:490–496. doi: 10.1016/j.geoderma.2006.10.005

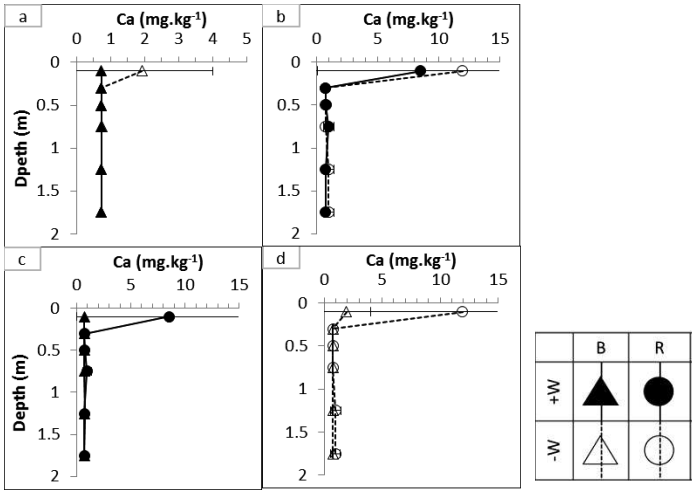
Turpault MP, Uterano C, Boudot JP, Ranger J (2005) Influence of mature Douglas fir roots on the solid soil phase of the rhizosphere and its solution chemistry. Plant Soil 275:327–336. doi: 10.1007/s11104-005-2584-x

Vitorello VA, Capaldi FR, Stefanuto VA (2005) Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. Braz J Plant Physiol 17:129–143. doi: 10.1590/S1677-04202005000100011

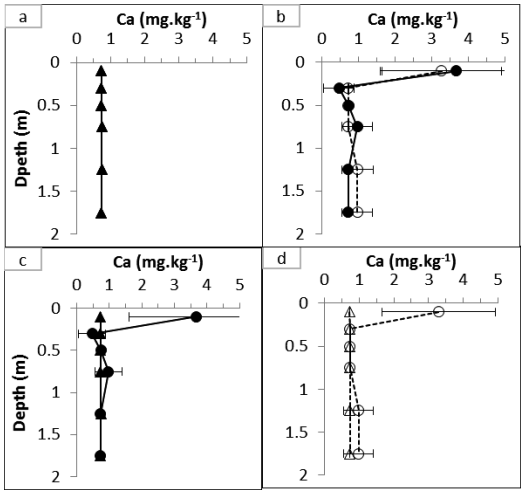
Wang JG, Zhang FS, Cao YP, Zhang XL (2000) Effect of plant types on release of mineral potassium from gneiss. Nutr Cycl Agroecosystems 56:37–44. doi: 10.1023/A:1009826111929

Wu Z, Dijkstra P, Koch GW, et al. (2011) Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: a meta-analysis of experimental manipulation. Glob Change Biol 17:927–942. doi: 10.1111/j.1365-2486.2010.02302.x

SUPPLEMENTARY MATERIALS



Sup mat 1: Exchangeable Ca concentrations obtained within the bulk soil and the rhizosphere soil for both treatments. See symbol codes.



Sup data 2: Exchangeable Ca concentrations obtained within the bulk soil and the rhizosphere soil for both treatments after removing 3 extreme values concerning: P1 rhizo B1 +W, P1 rhizo B1 –W and P1 bulk B3 –W. See symbol codes.

Chapitre 3

Symbioses mycorhiziennes

ARTICLE 3 : Première mise en évidence d'ectomyorhizes asociées à des racines profondes dans une plantation d'eucalyptus au Brésil.

Introduction du chapitre

L'état de l'art du chapitre d'introduction a fait apparaitre l'importance de la symbiose mycorhizienne dans le fonctionnement des racines fines, tant en termes de "foraging" que de « mining » dans le cas des ectomycorhizes. Cependant, comme dans le cas du fonctionnement racinaire, l'étude de la symbiose mycorhizienne en profondeur est encore très restreinte et il est généralement admis que ces associations sont limitées aux premiers centimètres, voire au premier mètre de sol. Des suivis racinaires par minirhizotrons ont déjà permis d'observer des racines ectomycorhizées en profondeur (Lambais et al. *in prep*). Cependant, afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'artéfacts liés à une contamination lors de l'installation des tubes ou à l'oxygénation du milieu, une collecte de racine doit être réalisée. Lors des collectes évoquées dans le chapitre précédent (collecte 1 durant la saison sèche et collecte 2 durant la saison des pluies), les racines fines ayant servi à collecter le sol rhizosphérique ont été conservées. Une partie d'entre elles présentait une symbiose ectomycorhizienne visible à l'œil nu.

« Article 3 » intitulé : « **First evidence for ectomycorrhizae associated with deep roots in an eucalyptus plantation in Brazil »** porte sur les observations des morphotypes d'ectomycorhizes collectés. Il fera l'objet d'une publication actuellement en préparation en collaboration avec Dr Agnès Robin qui a coordonné la partie d'analyse moléculaire des échantillons. Les co-auteurs qui seront associé au projet sont Agnès Robin, en contribution égale avec moi, ainsi que Frédéric Mahé et Hervé Sanguin, qui réalisent l'analyse des résultats du séquençage, Georges R Lambais, Arthur Prudêncio de Araujo Pereira, Jean-Pierre Bouillet, Dini Androte, Claude Plassard, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, Jean-Paul Laclau, Philippe Hinsinger et Christophe Jourdan.

Article 3 *Première preuve d'association ectomycorhizienne sur des racines fines profondes dans une plantation d'eucalyptus au Brésil.*

Article 3: First evidence for ectomycorrhizae associated with deep roots in a eucalyptus plantation in Brazil.

Pradier, C[1]*, Robin A[1,4]*

Mahé F[2], Sanguin, H[2], Lambais GR[3], Prudêncio de Araujo Pereira A[4],, Bouillet JP[1,6], Dini Androte F[4], Plassard, C[7], Jurandy Bran Nogueira Cardoso E[4], Laclau JP[1], Hinsinger P[7], Jourdan C[1].

[1] Centre international de Recherche Agronomique pour le développement (CIRAD), UMR Eco&Sols, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

[2] Centre international de Recherche Agronomique pour le développement (CIRAD), UMR LSTM, F-34398 Montpellier, France

[3] Division of Tropical Ecosystem Functioning, CENA, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil

[4] Department of Soil Sciences, ESALQ, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil

[6] Department of Forest Sciences, ESALQ, University of São Paulo, Piracicaba, SP, Brazil

[7] INRA, UMR Eco&Sols, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

* **These authors contributed equally to this work.**

ABSTRACT

There is a need to understand and quantify the ability of mycorrhizal fungi to colonize the deeper soil layers. Usually, it is admitted that the mycorrhizal symbiosis is limited to the first layers of soil. Before presenting the experimental part, we reviewed the up to date literature about the study of mycorrhizal associations with vertical distribution (remaining within the first centimenters) and with higher depth. We collected fine roots along a 4-m depth profile in a 5-year old *Eucalyptus grandis* plantation in Brazil. After, visual description of ectomycorrhizae, ectomycorrhizal root tips' DNA extraction and analyzes were performed to identify the ectomycorrhizal species, using a Next Generation Sequencing (NGS) approach. Only visual morphological descriptions of the EM were presented in my PhD manuscript as the other analyses were not completed in due time to be included. Two morphotypes were observed: a yellow one, typical of a *Pisolithus*-like type, and a white one, typical of the *Scleroderma*-like type. The two morphotypes were observed from topsoil down to 4-m depth. The capability of very deep fine roots to perform symbioses could totally change the common perspective of soil ecology and the role of the deep fine roots for plant nutrition.

Keywords Deep soil· mycorhizal symbiosis· fine roots · *Eucalyptus grandis*· *Pisolithus* · *Scleroderma*

INTRODUCTION

Mycorrhizal associations are recognized to be a key strategy for the acquisition of nutrients and water, as well as for root protection. It is generally throught that this symbiosis is only occurring in the first layers of soil and that the density of mycorrhizae decreases drastically with depth. Unfortunately, very few studies have investigated the vertical distribution of these symbiotic associations in very deep soil layers. The majority of the publications concern Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and regarding Ectomycorrhizal fungi (EMF), the few studies found are usually limited to a comparison between the organic and inorganic layers.

3.1.1. Vertical distribution of AMF and EMF

Several authors recorded a decrease of AMF density along a vertical gradient: based on spore numbers in soil (Becerra et al. 2014, Oehl et al. 2005, Cuenca et al. 2010, Kabir et al. 1998), root colonization (Kabir et al. 1998, Yang et al. 2010, Taniguchi et al. 2012) or AMF inoculum potential (Shukla et al. 2013, Gai et al. 2015). This decrease was reported under various climates: temperate (Jumpponen et al. 2010), cool-temperate (Taniguchi et al. 2012), as well as tropical (Cuenca et al. 2010) and for various ecosystems: such as agroecosystems (Yang et al. 2010, Oehl et al. 2005, Gai et al. 2015, Kabir et al. 1998), prairie or steppe ecosystems (Jumpponen et al. 2010, Cuenca et al. 2010, Taniguchi et al. 2012, Becerra et al. 2014). Cardoso et al. (2003) found a higher percentage of spores and roots at 60 cm in an agroforestry system than in a monocropped coffee system. Thereby a non-negligible part of the colonization can be found below the topsoil. Fifty percent of the spore biomass was found below 35 cm under soybean rotational systems (Higo et al. 2013) and the colonization rate can remain at about 20% at a depth of 40-50 cm in oat cultivars according to Yang et al. (2010). Moreover, the AMF diversity can be partially maintained along the vertical gradient. The diversity of spores remained the same down to a depth of 45 cm in a tropical shrubland (Cuenca et al. 2010). Oehl et al. (2005) demonstrated in a maize field, that the highest spore species number was situated below the ploughing depth, the AMF communities being affected by tillage within the ploughed layer (Moll et al. 2016). The factors influencing the AMF distribution along the vertical gradient are partly edaphic, and seem to vary according to the case. The pH and moisture cannot explain the AMF distribution in the experimentation of Shukla et al. (2013); instead the concentration of total N in the soil seemed to be a determining factor in their work. The AMF appeared to dominate in the underlying, more decomposed litter and humus, where they apparently mobilized N and made it available to their host plants (Rillig et al. 2003). Phosphorus also impacts the distribution. The AMF colonization generally decreases with increasing soil P. However, some species are not affected. In a context of global change, Rillig et al. (2003) tested the response of AMF to plants exposed to elevated CO_2 as a function of soil depth. The root colonization of the subsoil increased 5-fold in response to CO_2 increase whereas no

significant changes have been observed in the corresponding topsoil. This is an important result in term of C sequestration and nutrient acquisition in deeper soil layers.

Concerning the ectomycorrhizal fungi, several authors recorded a rapid decrease of EMF tip abundance. Most of the studies about EMF are focused on a vertical gradient on the first centimeters of the topsoil. Typically, in the study of Genney et al. (2006), the vertical gradient was explored from 0 to 20 cm of a Scots pine forest soil. The total EMF tip abundance amounted to 600 per 2 cm^3 within the first 2 cm layer and rapidly decrease with depth to reach 0 at 14 cm soil depth. A decrease of activity and diversity (Rawat et al. 2003) as well as mycelium frequency (Anderson et al. 2014) is also generally reported with increasing depth. A segregation of colonization in the different soil layers raised the hypothesis of a niche differentiation. An EMF species segregation was recorded between the first layers in a podzol of boreal forest (Rosling et al. 2003), in cambisol of a 100-year-old forest in France (Courty et al. 2008), in a 160 years old spruce stand in Northern Italy (Scattolin et al. 2008). A specialization towards resource utilization is one hypothesis. Dickie et al. (2002) identified EMF litter-layer specialists, generalists or multilayer generalists, in a pine plantation of Pennsylvania. A distribution led by edaphic properties was also reported. The exploration types of the EMF revealed also segregation related to soil horizon properties (Scattolin et al. 2008; Baier et al. 2006). The short-distance exploration types preferentially colonized the organic soil layer, whereas the contact types together with medium-distance types were primarily associated with the underlying horizons (A) in a Norway spruce stand in the Bavarian Alps (Baier et al. 2006). The importance of hydrophobic/ hydrophilic properties of the EMF hyphae has also been put forward (Hobbie et al. 2014). Furthermore soil moisture and organic matter as well as available N, C:N ratio and available P can also influence the EMF communities' distribution (Rawat et al. 2003, Scattolin et al. 2008, Coince et al. 2013). However, in a pot experiment, Mujic et al. (2016) concluded for the 15 first cm of the topsoil more in favour of a vertical distribution led by competition between EMF fungi rather than edaphic specialization, but recognized that soil heterogeneity may play a key role in promoting EMF diversity.

Only two works were found reporting on the co-occurrence of both AMF and EMF along vertical gradients in the soil. Moyersoen et al. (1998) in rain forest of Cameroon reported a negative relationship between AMF and EMF fractional colonization down to 15 cm soil depth and interpreted the co-occurrence of ectomycorrhizae and arbuscular mycorrhiza by differences between EMF and AMF hosts and fungi in their colonizing abilities. More recently, Neville et al. (2002) in a boreal clear-cut forest, found, similarly, a significant negative correlation between EMF and AMF colonization down to 50 cm. The few number of studies on both AMF and EMF may be partly related to the few number of species that can interact with both types of mycorrhizal fungi, and to the fact that, when it is possible, generally, the interaction cannot be established at the same time. For example, a succession

from AMF to EMF has been more widely reported, for instance for eucalypt trees (Dos Santos et al. 2001, Oliveira et al. 1997, Bellei et al. 1992).

3.1.2. Vertical distribution *vs* depth

The studies presented above investigated a rather shallow "vertical gradient" in the soil, and we cannot really talk about "depth" as these studies concentrated on the topsoil horizons. Pierret et al. (2016), proposed a 1-m depth threshold to define the beginning of the "depth" for root distribution. If we base our previous analysis of the literature considering this 1-m-depth-threshold, then, to our knowledge, only 5 papers reached this threshold depth concerning AMF (Virginia et al. 1986, Zajicek et al. 1986, Taniguchi et al. 2012) including two studies based on an inoculum potential (Dalpe et al. 2000 and Harner et al. 2011). Concerning EMF studies, to our knowledge, no paper has ever been reporting on EMF occurrence below a depth of 1 m. The "deepest" published sampling has been conducted in a boreal forest and based on DNA extractions from soil samples collected down tol a depth of 1 m (Clemmensen et al. 2015). The "deepest" observations of EMF reached 75 cm; in a Norway spruce stand in Italy (Scattolin et al. 2008). The lack of study on mycorrhizal associations at depth is partly linked to the difficulty to collect soil at such depth. It is quite unusual for microbiologist to explore such soil depth because of the dramatic decrease of biological activity with increasing soil depth making studies more difficult and analyses more challenging. However, this decrease may lead to a more specialized enzymatic activity (Stone et al. 2014). However, many recent studies show the interest of the scientific community for biological activities at depth such as that of Gocke et al. (2017) and highlights the interest for these methodological and technical challenges.

Nevertheless, the need to study the entire root profile is not recent. In 1986, Virginia et al. and Zajicek et al. both demonstrated the AM colonization (by microscopic observations), down to a depth of 2.2 m (grasslands, Kansas USA) for the study by Zajicek and co-workers and even down to a depth of 4.8 m (mesquite, Californian desert) for the study by Virginia and co-workers. Virginia et al. (1986) consequently wrote, "*Interferences of plant symbiotic dependence based upon examination of surface roots and soil may be incorrect since deep roots can support the symbioses"*. However, from 1986 to nowadays, works about the effect of depth on mycorrhizal colonization of roots never reached again such depths. As an exception, one work in 2000, by Dalpe et al, studied the entire Senegal soil profile colonized by *Faidherbia lampa* roots, reaching the water table at a depth of 34 m! However, this work focused on the inoculum potential of soil samples rather than on root colonization.

In this context, the need of exploring the mycorrhizal status of fine deep roots is clear. Eucalypts can be a relevant model for this study. Indeed, eucalypts can present a rapid growth, exploring large volumes of soil, down to 15 m. Even if the root density decreases with depth (Laclau et al. 2013), fine

deep roots play a fundamental role for water acquisition notably in dry periods (Christina et al. 2015) and present a potential functional specialization for nutrient acquisition with depth (Da Silva et al. 2011). Concerning the mycorrhizal status of eucalypts, in native forest or in plantations, several authors reported the possible occurrence of both AMF and EMF symbioses successively with AMF being more prominent on seedlings, and EMF in adult trees (dos Santos et al. 2001, Chen et al. 2006, Adams et al. 2006, Oliveira et al. 1997; Bellei et al. 1992). A first observation of mycorrhizal associations at depth in a eucalypt plantation in Brazil was recently made through minirhizotron monitoring (Lambais et al, *in prep*.). However, with this methodology that is well suited for root observations, there is a risk (i) of contamination with spores or mycelium during the installation of the minirhizotron tubes and (ii) of artefact related to oxygenation. That is the reason why a collection, depth per depth, had to be realized to confirm this first observation.

The objective of this chapter was to describe through systematic observations the presence of ectomycorrhizal association in a 5 year-old eucalypt plantation down to a depth of 4 m. To complete these observations, further work was performed to study the molecular diversity of these EMF (and possibly AMF too) along the soil profile, performing DNA sequencing on collected root tips and fine roots.

The molecular analyses that were not made in the context of this PhD but in collaboration with a microbiologist of the Eco&Sols research unit (Dr. Agnès Robin) are still in progress. The corresponding results will thus not appear in this manuscript but should be available in the article Pradier and Robin et al., 2017 in preparation as referred to at the beginning of this chapter.

MATERIALS & METHODS

3.2.1. Study site and soil properties

The experiment was carried out at the forest research site of Itatinga (Sao Paulo, Brazil, 23°02'S, 48°38'W) owned by the University of São Paulo. Situated at 300 km from the sea, the study area is rather flat (slope ≤ 3%), with an elevation of 860 m. The region has a humid subtropical climate ranked as a Cfa according to the Köppen classification (Peel et al. 2007). Over the 15 years prior to this study, the mean annual rainfall was 1360 mm and the mean annual temperature was 19°C with a cold and dry season occurring between June and September. The soils are deep Ferralsols (with a water table at about 17-m depth) developed on Cretaceous sandstone, and exhibit little horizon differentiation. According to Laclau et al. (2010), between the soil surface and the depth of 4 m, the main soil properties range as follows, from top (excluding the top 0-5 cm) to depth: Clay (151 – 256 g kg^{-1}), Silt (29 – 53 g kg^{-1}), Sand (620 – 732 g kg^{-1}), CEC (0.87 – 0.08 $cmol_c$ kg^{-1}), organic C (6.4 – 2.0 g kg^{-1}), N (0.47 – 0.11 g kg^{-1}).

A throughfall reduction experiment was set up in 2010 with a *Eucalyptus grandis* clone (from the Suzano Company, SP state, Brazil). The experimental design with 6 treatments and 3 blocks was described in detail by Battie-Laclau et al. (2014). Our study was carried out in the following two treatments selected in one block: one control treatment with undisturbed rainfall (thereafter called +W) and one rainfall exclusion treatment (thereafter called –W). A gutter system made of two 40-cm wide plastic sheets, was installed in each tree inter-row of the –W plot two months after planting, to simulate coming predicted droughts, excluding 37% of the rainfall (and then throughfall).

3.2.2. Root sampling

Root samples were collected between May and June 2015. A 1.5-m wide square pit was dug in the 3-m wide inter-row of the exclusion and control plots. Fine roots (<2 mm) were sampled layer per layer during the digging of the pit in order to minimize the biases. This technique of collection, although time-consuming, allows to prevent the contaminations between two consecutive soil depths and to collect the maximum of roots at each soil depth layer. Ten soil layers have been sampled from 0 to 400 cm (0-20, 20-40, 40-60, 60-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400 cm). Two types of samples were collected: roots presenting ectomycorrhizal root tips based on naked eye observations and roots without detectable ectomycorrhizae characteristics based on naked eye observations. The roots were then washed with tap water and dried using blotting paper. The roots and the root tips were then stored at -20°C.

3.2.3. Morphological observations of the ectomycorrhizae

Selected morphotypes were observed following some morphological criteria described in Agerer et al. 1991 and photographed using the TG2 Olympus camera (Sensor BSI CMOS 12 Mpx, 1/2,3" , Objective 4x 25-100000000 mm f/2 -4.9, Sensivity (plage ISO) 100 - 6400 ISO ext. 19 mm). A special care was taken in examining the mantle color and texture and the occurrence of emanating elements (rhizomorphs and hyphae).

3.2.4. Fine root coloration for arbuscular mycorrhiza investigation

Parts of collected fine roots were selected (less than 1 mm in diameter) and AMF staining of root tissues was performed following the ink and vinegar technique (Vierheilig et al. 1998) with an additional tissue bleaching step as described by Koske and Gemma (1989). After observations under a binocular to identify areas with fungi colored in blue, microscopic observations were performed to identify any arbuscular or vesicular structures.

RESULTS

The specific objective of this chapter was to provide evidence of the possibility of ectomycorrhizal association occurring along a 4-m-depth soil profile using observations and morphological characteristics. The different structures observed will be presented in this result part, thanks to the large quantity of pictures taken. The general trends observed between treatments and along soil depth could be given but **no quantification has been performed to confirm it**.

3.3.1. Ectomycorrhizae morphotypes and mantle color description *(Figure 1)*

Based on the color of the ectomycorrhizae mantle, two different morphotypes have been found: a yellow one (YM) and a white one (WM). The WM has mainly been found in the –W pit whereas YM have largely been found in both pits. In the –W pit, a white fungus colonization with a different aspect has been found and we cannot affirm that it is an ectomycorrhizal fungus based only on visual criteria. Indeed, we cannot see a delimited mantle at the end of a branched root but a spider web appearance that suggest the possible occurrence of a saprotrophic fungus. The mycorrhizal abundance within a root varies inside a given sampling layer and along the depth profile, for both pits. It can be mostly defined as dense even though isolated structures have been observed. The YM mostly presents a monopodial pyramidal system type whose unbranched ends length seems to decrease when depth increases, as well as its system branching order (Photos 1-6). The WM can present this type of system (Photos 8-9) but can also adopt more complex structures (Photo 11). Both YM and WM fine roots can use a non-mycorrhizal root (of diameter > 10cm (Photo 2), around 2 mm (Photo 3) or < 2 mm (Photos 6, 7, 10)) as support to develop across (Photo 2) or along (Photos 3, 6, 7, 10).

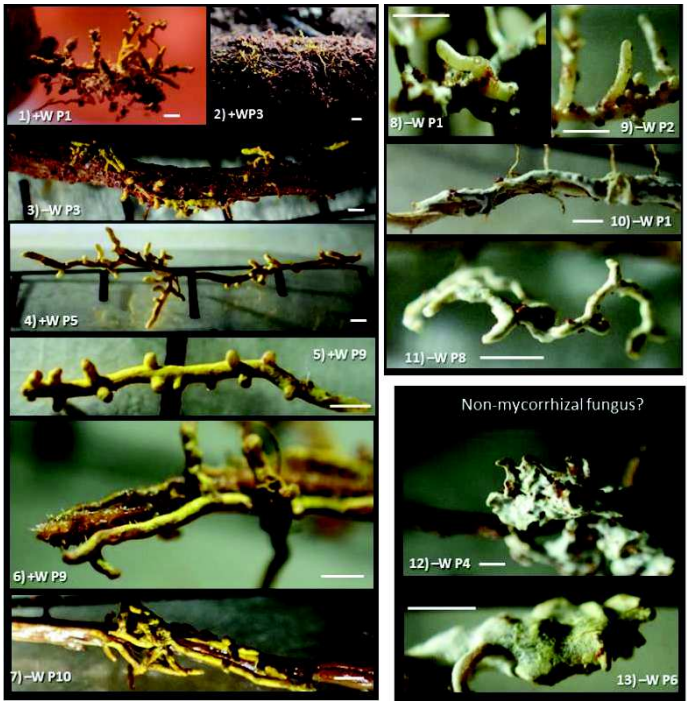


Figure 1. Yellow ectomycorrhizae morphotypes (Photos 1 to 10); White ectomycorrhizae morphotypes (Photos 8 to 11). Photos 12 and 13 illustrate another type of white fungus that better look like a saprophytic fungus. The white bar = 1 mm.

3.3.2. Mantle texture variability *(Figures 2 and 3)*

Concerning the YM (Figure 2), a smooth yellow mantle has been observed in both pits, in majority in the upper layers but not exclusively, with a straight (Photo 4) or twisted (Photo 14) end of branching. On the entire soil profile of the –W pit and only below a depth of 2 m for the +W pit, the yellow mantle surface seems to be partially loose and grainy causing an appearance of sand-paper letting appear the "naked" root (Photos 20-21). In the –W pit, below 60 cm the yellow mantle can present black parts, at the end of the branches (Photo 19) or between two branches. In the –W pit, below 2 m-depth, the YM can have a dehydrated-like appearance (Photo 17).

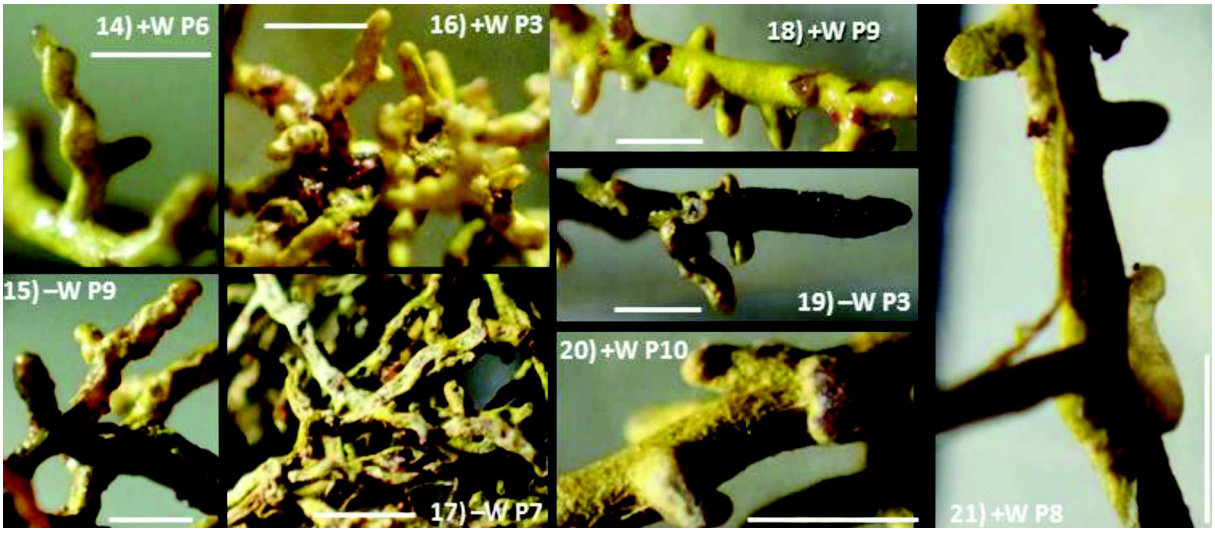


Figure 2. Mantle texture variability among the yellow ectomycorrhizae morphotypes (Photos 14 to 21). The white bar = 1 mm.

Concerning the WM (Figure 3) (and excluding the case of the "saprotrophic" like fungus), two different types of white mantles have been seen: the one represented by the Photo 22 which is a bit transparent and the one represented by the Photos 23, 24 which has more opacity. The mycorrhizal structure of the first type is quite similar to the structure type of the YM.

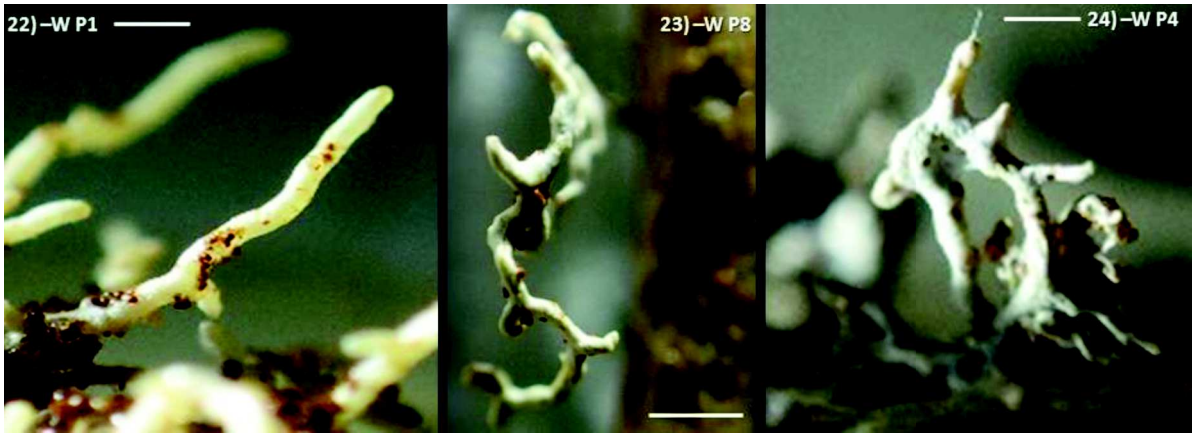


Figure 3. Mantle texture variability among the white ectomycorrhizae morphotypes (Photos 22 to 24). The white bar = 1 mm.

3.3.3. Rhizomorphs and Hyphae *(Figure 4)*

Yellow (Photos 25-26), white (Photos 28-31), and white/transparent (Photo 27) rhizomorphs have been observed. The rhizomorphs can develop along non-mycorrhizal (Photos 25, 26, 27, 28, 30) roots or even inside a dead root (Photos 29, 31). Transparent hyphae have been seen emanating from rhizomorphs (Photos 32, 34) and mantles (Photo 33) (as well as from "orange/transparent-like structures" see next paragraph). Rare cases of co-occurrence of both yellow and white structures have been seen (Photos 35-37).

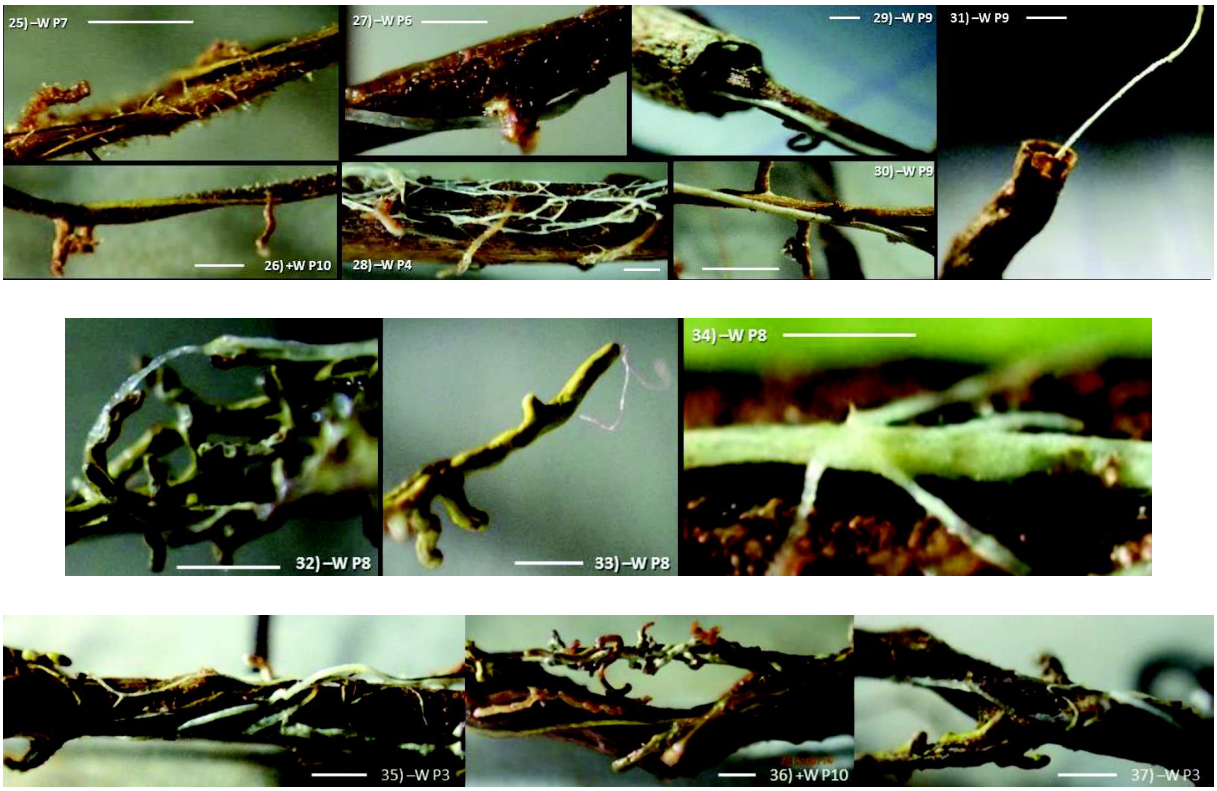


Figure 4. Diversity of rhizomorph (Photos 25 to 31) and hyphae (Photos 32 to 34) structures associated with both white and yellow ectomycorrhizae morphotypes. Cases of co-occurrence of both yellow and white strucures (Photos 25 to 37). The white bar = 1 mm.

3.3.4. Unknown mycorrhizae morphotype *(Figure 5)*

One "orange" morphotype has frequently been observed in both pits. Hyphae have been seen emanating from these structures (Photos 38, 42) which are closely associated with both YM and WM, especially when there are sparse (Photo 41) as well with rhizomorphs (Photo 39). The transitions between YM fine root branching and the roots without ECM of order +1 have the same appearance (Photo 40).

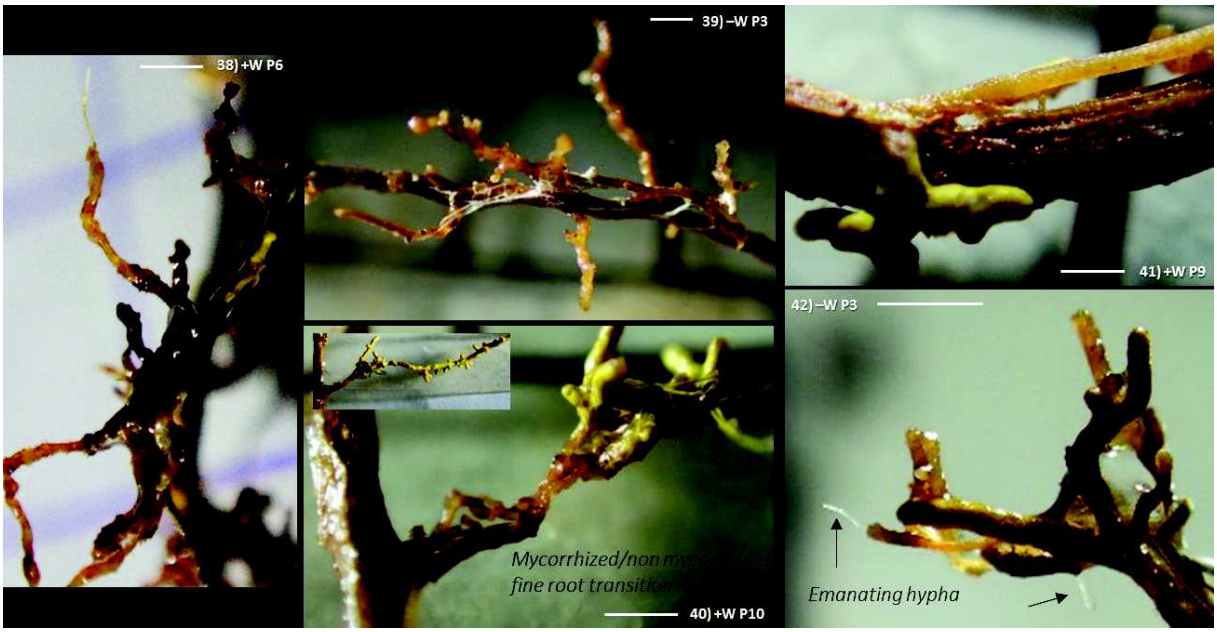


Figure 5. Illustration of a recurrent orange structure associates with ectomycorhizae structures (Photos 38 to 42). The white bar = 1 mm.

3.3.5. Fruiting bodies *(Figure 6)*

Two types of fructification have been observed on the plantation: *Pisolithus*-like fruiting bodies (Photos 48-52) and *Scleroderma*-like fruiting bodies (Photos 43-47). Both types of fruiting bodies were present at different stages of development. Although the fruiting bodies may appear similar when they are young, it is easy to differentiate them by making an observation of the organization of cells within fruiting (as illustrated in the photographs).

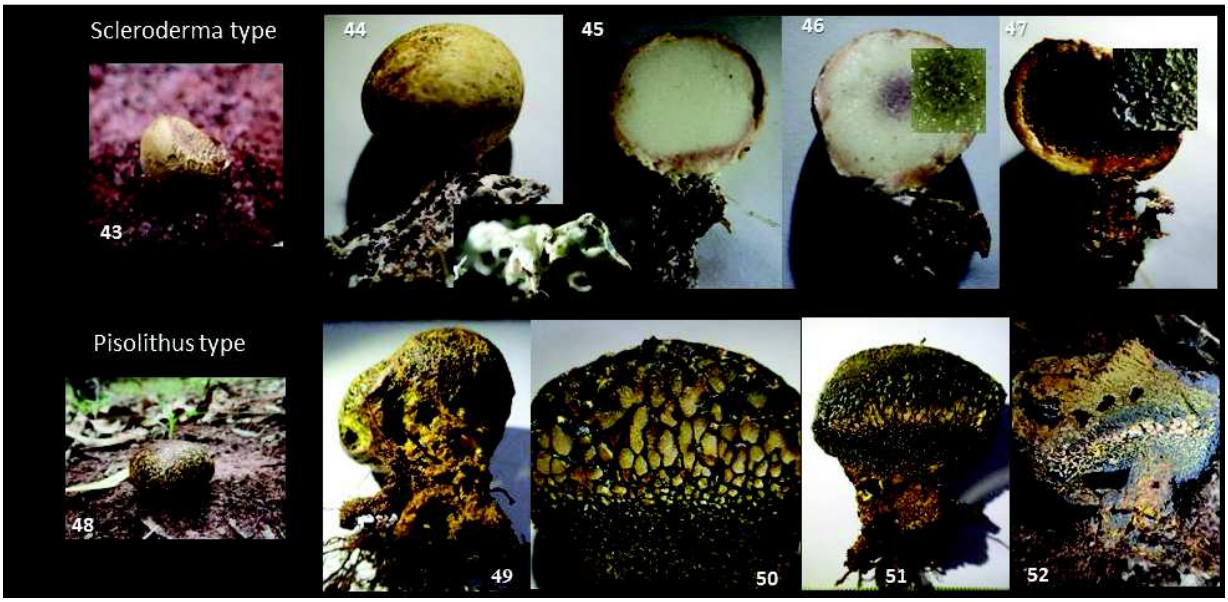


Figure 6. Scleroderma type fruting bodies (Photos 43 to 47) and Pisolithus type fruting bodies (Photos 48 to 52) collected on the eucalypt plantation.

3.3.6. Arbuscular mycorrhizae *(Figure 7)*

Colorations of selected very fine roots (< 1mm) allowed seeing some AMF structures until a depth of 1m. However, only vesicles and hyphae (no arbuscules) were observed.

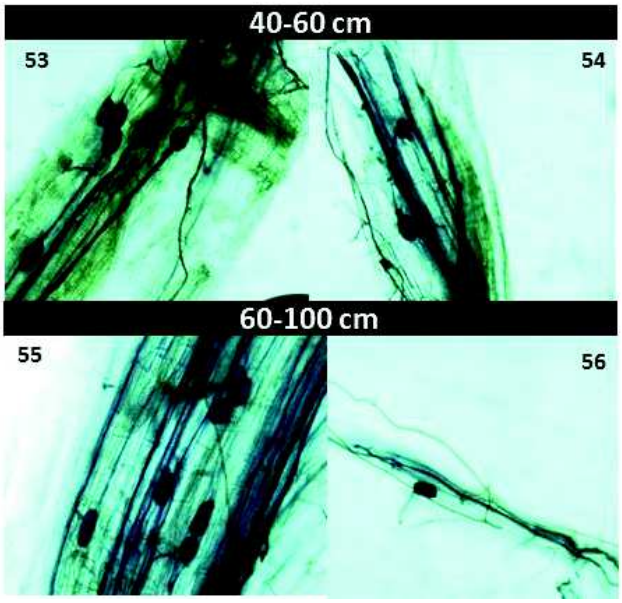


Figure 7. Microscopic observations of *Eucalyptus grandis* fine roots. Areas with AM fungi are colored in blue. Vesicules and hyphaes are observed at both soil depths (40-60 cm and 60-100 cm).

DISCUSSION

3.4.1. First evidence of ectomycorrhizal symbiosis at great depth: new perspectives for the functioning of deep fine roots

The observations presented in this chapter represent a step forward in the microbial ecology with the evidence, for the first time, of the occurrence of ectomycorrhizal roots down to a depth of 4 meters. Two morphotypes have been characterized: a yellow morphotype and a white one. According to morphological criteria and given the presence of their fruiting bodies in the study plot, the yellow morphotype is most probably a *Pisolithus* and the white one can be a *Scleroderma* mycorrhizal fungus (http://www.deemy.de/). The evidence of a mycorrhizal symbiosis, in the very deep layers of the soil could have a major impact on the understanding of the functioning of eucalypt plantations in deep and poor tropical soils. This kind of feature may contribute to explain the behavior of eucalypts with respect to water stress and the capacity of the trees to collect nutrients in very deep layers (da Silva et al, 2011). The root-associated microorganisms may play a key role in the optimization of nutrient acquisition and thus may allow the trees to fully exploit the considerable stock of nutrients present in these soils considering the whole soil profile, down to 17 m in our conditions. In addition, the ectomycorrhizal association could also enhance Al tolerance by inducing some carboxylate secretion (Tahara et al. 2005). The presence of ectomycorrhizae in very deep soil layers raises some ecological questions, as related to the unique edaphic and physical conditions encountered by mycorrhizal associations at depth. One question is about the pathway of dissemination of spores produced above

the soil surface by the fruiting bodies: how could they reach deep soil layers? Several hypotheses may be considered such as the role of water in such vertical dissemination, as well as the direct role of growing roots themselves. The presence of symbiotic associations at depth is also interesting because it shows that the amount of oxygen is sufficient, even at great depth, to allow the germination of spores and the saprotrophic hyphal growth before its interaction with a root.

3.4.2. Complementary observations: repeatability of the results and EMF morphotype successions

Time and space repeatability. Complementary observations have been realized 6 months later on these two treatments (+W and –W). This second collection better integrated the spatial variability as the three blocks of the experiment were investigated: one pit of 2-m depth was dug in each block for each of the two treatments. The observations of ECM root tips presented in this chapter were repeatable in time and space, among the investigated depth of 2 m, in the 3 blocks of the experiment 6 months later (in December 2015) during the rainy season. Contrary to first observations, in this second sampling period, a systematic co-occurrence of both YM and WM had been seen in both the –W and +W treatments.

Presence of a third morphotype in the same plantation. In 2014, during the digging of a 17-m permanent pit, another morphotype, black (colonizing only the very tip of the roots, unlike the YM and WM and without a production of rhizomorphs) was observed on the eucalypt plantation at 3-m depth. According to morphological observation of the black morphotype of ectomycorrhiza, we put forward the hypothesis that it was a *Cenococum*-like type (http://www.deemy.de/). The white morphotype has been observed behind minirhizotrons in a close plantation using the same eucalypt clone, with only rare occurrence of the yellow morphotype. The black and white/yellow morphotypes seem not to be dominant at the same time and it seems that there are cycles of dominance or successions, the black morphotype having been observed again and in great quantity in May 2017 at the end of the rotation (Agnès Robin, personal communication). This black morphotype was probably present in lesser proportion during the collection but, for a question of time, only a few roots have been observed using a binocular. The analysis of the DNA extract of the fine root compartment (without ECM morphotype selection) could enable us to evidence the possible occurrence of other ECM species.

3.4.3. Traits' differences between the 3 hypothetical EMF of the plantation

Based on morphological criteria, we raised the hypothesis about the identity of the 3 morphotypes found within the plantation (yellow = *Pisolithus*-like, white = *Scleroderma*-like, black = *Cenococum*-like), that should be checked by DNA analysis. Theses fungal species could be distinguished according to different functional traits (Koide et al. 2014, Chagnon et al. 2013, Aguilar-Trigueros et al. 2014).

Cenococum is known to have a short distance exploration type whereas *Pisolithus* and *Scleroderma* produce long rhizomorphs. The presence of melanin in Cenococum confers resistance to water stress and increases its lifetime, with potential impact on its survival and resistance towards competition. In the literature, the exploration types of the EMF revealed segregation related to soil horizon properties (Scattolin et al. 2008, Baier et al. 2006). The short-distance exploration types preferentially colonized the organic soil layer, whereas the contact types together with medium-distance types were primarily associated with the underlying A-horizons (Baier et al. 2006). In our study, we have shown the presence of rhizomorphs (corresponding to the exploration types) along all the soil profile. Generally, rhizomophs are known to be hydrophobic and to have a higher C cost for the plants, whereas a fungus like *Cenococcum* is known to have hydrophilic mycelia (which is better for water use efficiency). This observation seems to indicate that the strategy of exploration of the fungus is more important at depth than ecophysicological properties that could be involved in water stress. Moreover, the morphology of the ECM can also inform about the role of the symbiotic association for plants. For instance, ectomycorrhizal short roots with a higher morphological plasticity could allow trees to adjust their water and nutrient uptake to local environmental conditions (Ostonen et al. 2013).

3.4.4. AMF: observations with time needed to confirm an AMF to EMF succession

Concerning AMF, we found the presence of vesicles until 1-m depth but no arbuscules were reported. This observation reveals an AMF association which had been active, but which was not active anymore. This means that the observed fine roots have survived since the time of the AMF active colonization. Only a chronosequence may inform on the succession between AMF and EMF and between the different EMF species. In this context, research will be conducted in the next rotation that started in June 2016 with a coppice management, compared with a new plantation on the same period of time. It would enable us to confirm in plantation conditions and also with depth the trend of AMF-EMF succession reported in the literature (dos Santos et al. 2001, Chen et al. 2006, Adams et al. 2006).

3.4.5. DNA analysis and diversity characterization

Even though Agerer proposed a methodology to identify morphologically EMF (Agerer 1987, 2001) only DNA-analyses will allow identifying the fungi involved at the genus and species levels. A high-throughput sequencing or Next-Generating Sequencing (NGS) approach is currently being performed on these samples to reveal the diversity of mycorrhizae present along the soil profile. Two levels of diversity will be targeted in DNA analysis of our samples: (i) at the population level with a fine characterization of *Pisolithus* and *Scleroderma* diversity from ECM tips separated using morphological criteria, and (ii) at the community level with the characterization of mycorrhizal fungi from the root DNA extract (without tip selection).

3.4.6. Deep rooting and deep mycorrhizal symbiosis: a multidisciplinary challenge:

This work highlighted the urgent need for quantitative studies of deep rooting and rhizosphere microbial ecology at depth, at the crossroad of disciplinary fields and approaches. It points out the richness of the collaboration of field studies with lab studies, foresters with microbial ecologists, in the objective to better link and understand the root dynamic and the mycorrhizal community (AMF and EMF in particular) functioning, the carbon, water and nutrient cycles at depth, notably in a context of global change. It is often thought that roots may need to reach such depth only in extreme ecosystems such as deserts for instance; the rooting depth indeed varies, principally depending on (i) the plant (perennial, annual) species and (ii) the climate. However, the studies conducted by Schenk and Jackson (2002, 2005), and cited in a recent review on deep roots by Pierret el al (2016), tend to limit the role of climate in determining the rooting depth. Indeed, Pierret el al (2016) wrote that “shrubs and trees can be deep-rooted, independent of climate as long as this enables them to reach the groundwater” and that “rooting depths in tropical vegetation were only weakly correlated with climate but strongly correlated with sampling depths, suggesting that sampling is frequently too shallow to capture the actual maximum root density”. This last point raised the same observation made by Virginia et al. in 1986 about the mistakes that result, not taking into account the entire root / soil profile. Field studies of root systems cannot systematically include the entire root / soil profile, for obvious methodological reasons (Maeght et al. 2013), and even more concerning mycorrhizae studies which are even more time consuming. In this, study, the sampling strategy did not allow a quantitative analysis of the mycorrhizal status of roots at depth, although this should be particularly relevant. Actually, this objective appears as a real challenge due to the massive amount of soil that has to be excavated to find a few fine roots, and even less mycorrhizal roots. Although we were not able to quantify precisely the amount of mycorrhizal roots, our visual observations clearly indicate that the number of symbiotic associations seems to be fewer at depth than within the topsoil. However, given the strongest limitation of nutrients at depth, the presence of mycorrhizae may be essential for the nutrition of the trees. A recent work by Stone et al. (2014) has shown a decrease of extracellular microbial activity with increasing soil depth, but interestingly, when normalized to microbial biomass, the specific enzyme activities increased at depth.

To conclude, the proof of the occurrence of ectomycorrhizal associations at great soil depth (more than 1 m) gives rise to the need of better considering a larger soil depth in microbial ecology research. This result gives also a strong argument in favour of a key role of deep fine roots and also rhizosphere microorganisms (associated with those roots) in plant nutrition, particularly in a context of strong nutrient limitation at depth as expected in deeply weathered, tropical soils. This could explain the

benefit for the plant to establish such mycorrhizal symbiosis in spite of the strong C investment it represents.

References

Adams F, Reddell P, Webb MJ, Shipton WA (2006) Arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas on Eucalyptus grandis (Myrtaceae) trees and seedlings in native forests of tropical north-eastern Australia. Aust J Bot 54:271–281. doi: 10.1071/BT05028

Agerer R (1987) Studies on Ectomycorrhizae. X. Mycorrhizae Formed by Cortinarius obtusus and C. venetus on Spruce. Mycologia 79:524–539. doi: 10.2307/3807591

Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. Mycorrhiza 11:107–114. doi: 10.1007/s005720100108

Aguilar-Trigueros CA, Powell JR, Anderson IC, et al. (2014) Ecological understanding of root-infecting fungi using trait-based approaches. Trends Plant Sci 19:432–438. doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.006

Anderson IC, Genney DR, Alexander IJ (2014) Fine-scale diversity and distribution of ectomycorrhizal fungal mycelium in a Scots pine forest. New Phytol 201:1423–1430. doi: 10.1111/nph.12637

Baier R, Ingenhaag J, Blaschke H, et al. (2006) Vertical distribution of an ectomycorrhizal community in upper soil horizons of a young Norway spruce (Picea abies [L.] Karst.) stand of the Bavarian Limestone Alps. Mycorrhiza 16:197–206. doi: 10.1007/s00572-006-0035-z

Barnola LG, Montilla MG (1997) Vertical distribution of mycorrhizal colonization, root hairs, and belowground biomass in three contrasting sites from the Tropical high Mountains, Merida, Venezuela. Arct Alp Res 29:206–212. doi: 10.2307/1552047

Battie-Laclau P, Laclau J-P, Domec J-C, et al. (2014) Effects of potassium and sodium supply on drought-adaptive mechanisms in Eucalyptus grandis plantations. New Phytol 203:401–413. doi: 10.1111/nph.12810

Becerra A, Bartoloni N, Cofre N, et al. (2014) Arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils: Vertical distribution at different soil depth. Braz J Microbiol 45:585–594.

Bellei M, Garbaye J, Gil M (1992) Mycorrhizal Succession in Young Eucalyptus-Viminalis Plantations in Santa-Catarina (southern Brazil). For Ecol Manag 54:205–213.

Cardoso IM, Boddington C, Janssen BH, et al. (2003) Distribution of mycorrhizal fungal spores in soils under agroforestry and monocultural coffee systems in Brazil. Agrofor Syst 58:33–43. doi: 10.1023/A:1025479017393

Chagnon P-L, Bradley RL, Maherali H, Klironomos JN (2013) A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. Trends Plant Sci 18:484–491. doi: 10.1016/j.tplants.2013.05.001

Chen YL, Dell B, Malajczuk N (2006) Effect of Scleroderma spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized Eucalyptus globulus and E-Urophylla seedlings. New For 31:453–467. doi: 10.1007/s11056-005-0880-1

Christina M, Le Maire G, Battie-Laclau P, et al. (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. Glob Change Biol 21:2022–2039. doi: 10.1111/gcb.12817

Clemmensen KE, Finlay RD, Dahlberg A, et al. (2015) Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long-term succession in boreal forests. New Phytol 205:1525–1536. doi: 10.1111/nph.13208

Coince A, Cael O, Bach C, et al. (2013) Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest. Fungal Ecol 6:223–235. doi: 10.1016/j.funeco.2013.01.002

Courty P-E, Franc A, Pierrat J-C, Garbaye J (2008) Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. Appl Environ Microbiol 74:5792–5801. doi: 10.1128/AEM.01592-08

Cuenca G, Lovera M (2010) Seasonal variation and distribution at different soil depths of arbuscular mycorrhizal fungi spores in a tropical sclerophyllous shrubland. Botany 88:54–64. doi: 10.1139/B09-100

Dalpe Y, Diop TA, Plenchette C, Gueye M (2000) Glomales species associated with surface and deep rhizosphere of Faidherbia albida in Senegal. Mycorrhiza 10:125–129. doi: 10.1007/s005720000069

Dickie IA, Xu B, Koide RT (2002) Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytol 156:527–535. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00535.x

Gai J, Gao W, Liu L, et al. (2015) Infectivity and community composition of arbuscular mycorrhizal fungi from different soil depths in intensively managed agricultural ecosystems. J Soils Sediments 15:1200–1211. doi: 10.1007/s11368-015-1060-3

Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ (2006) Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. New Phytol 170:381–390. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01669.x

Gocke MI, Huguet A, Derenne S, et al. (2017) Disentangling interactions between microbial communities and roots in deep subsoil. Sci Total Environ 575:135–145. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.184

Grishkan I, Nevo E (2008) Vertical divergence of microfungal communities in soil profiles of “Evolution canyon” I, Lower Nahal Oren, Mount Carmel, Israel. Plant Biosyst 142:51–59. doi: 10.1080/11263500701872325

Harner MJ, Opitz N, Geluso K, et al. (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi on developing islands within a dynamic river floodplain: an investigation across successional gradients and soil depth. Aquat Sci 73:35–42. doi: 10.1007/s00027-010-0157-4

Hashimoto Y, Hyakumachi M (1998) Distribution of ectomycorrhizas and ectomycorrhizal fungal inoculum with soil depth in a birch forest. J For Res 3:243–245. doi: 10.1007/BF02762200

Higo M, Isobe K, Yamaguchi M, et al. (2013) Diversity and vertical distribution of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi under two soybean rotational systems. Biol Fertil Soils 49:1085–1096. doi: 10.1007/s00374-013-0807-5

Hobbie EA, van Diepen LTA, Lilleskov EA, et al. (2014) Fungal functioning in a pine forest: evidence from a N-15-labeled global change experiment. New Phytol 201:1431–1439. doi: 10.1111/nph.12578

Jumpponen A, Jones KL, Blair J (2010) Vertical distribution of fungal communities in tallgrass prairie soil. Mycologia 102:1027–1041. doi: 10.3852/09-316

Kabir Z, O'Halloran IP, Widden P, Hamel C (1998) Vertical distribution of arbuscular mycorrhizal fungi under corn (Zea mays L.) in no-till and conventional tillage systems. Mycorrhiza 8:53–55. doi: 10.1007/s005720050211

Karlinski L, Rudawska M, Leski T, Kieliszewska-Rokicka B (2015) Biomass of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in Norway spruce stands in Poland. Acta Mycol. doi: 10.5586/am.1063

Koide RT, Fernandez C, Malcolm G (2014) Determining place and process: functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function. New Phytol 201:433–439. doi: 10.1111/nph.12538

Koske R, Gemma J (1989) A Modified Procedure for Staining Roots to Detect Va-Mycorrhizas. Mycol Res 92:486–505.

Laclau J-P, da Silva EA, Rodrigues Lambais G, et al. (2013) Dynamics of soil exploration by fine roots down to a depth of 10 m throughout the entire rotation in Eucalyptus grandis plantations. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00243

Laclau J-P, Ranger J, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2010) Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations. For Ecol Manag 259:1771–1785. doi: 10.1016/j.foreco.2009.06.010

Lambais G-R *, Jourdan C *, Piccolo M-C, et al. (*in preparation*) Fine roots dynamics of Eucalyptus trees in a depth tropical soil: effects of soil depth, diameter classes and mycorrhizal status

Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, et al (2007) Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. New Phytol 173:611–620. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01936.x

Maeght J-L, Rewald B, Pierret A (2013) How to study deep roots—and why it matters. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00299

Moll J, Hoppe B, Koenig S, et al. (2016) Spatial Distribution of Fungal Communities in an Arable Soil. Plos One 11:e0148130. doi: 10.1371/journal.pone.0148130

Moyersoen B, Fitter AH, Alexander IJ (1998) Spatial distribution of ectomycorrhizas and arbuscular mycorrhizas in Korup National Park rain forest, Cameroon, in relation to edaphic parameters. New Phytol 139:311–320. doi: 10.1046/j.1469-8137.1998.00190.x

Mujic AB, Durall DM, Spatafora JW, Kennedy PG (2016) Competitive avoidance not edaphic specialization drives vertical niche partitioning among sister species of ectomycorrhizal fungi. New Phytol 209:1174–1183. doi: 10.1111/nph.13677

Neville J, Tessier JL, Morrison I, et al. (2002) Soil depth distribution of ecto- and arbuscular mycorrhizal fungi associated with Populus tremuloides within a 3-year-old boreal forest clear-cut. Appl Soil Ecol 19:209–216. doi: 10.1016/S0929-1393(01)00193-7

Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, et al. (2005) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. New Phytol 165:273–283. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01235.x

Oliveira VL, Schmidt VDB, Bellei MM (1997) Patterns of arbuscular- and ecto-mycorrhizal colonization of Eucalyptus dunnii in southern Brazil. Ann Sci For 54:473–481. doi: 10.1051/forest:19970505

Ostonen I, Rosenvald K, Helmisaari H-S, et al. (2013) Morphological plasticity of ectomycorrhizal short roots in Betula sp and Picea abies forests across climate and forest succession gradients: its role in changing environments. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00335

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol Earth Syst Sci 11:1633–1644. doi: 10.5194/hess-11-1633-2007

Pierret A, Maeght J-L, Clément C, et al. (2016) Understanding deep roots and their functions in ecosystems: an advocacy for more unconventional research. Ann Bot mcw130. doi: 10.1093/aob/mcw130

Rawat PS, Ginwal HS, Singh RP, Dubey RC (2003) Vertical distribution of ectomycorrhizae in Deodar and Chir pine forests in relation to their soil characteristics. Indian For 129:624–630.

Rillig MC, Field CB (2003) Arbuscular mycorrhizae respond to plants exposed to elevated atmospheric CO2 as a function of soil depth. Plant Soil 254:383–391. doi: 10.1023/A:1025539100767

Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, et al. (2003) Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. New Phytol 159:775–783. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00829.x

dos Santos VL, Muchovej RM, Borges AC, et al. (2001) Vesicular-arbuscular-/ecto-mycorrhiza succession in seedlings of Eucalyptus spp. Braz J Microbiol 32:81–86.

Scattolin L, Montecchio L, Mosca E, Agerer R (2008) Vertical distribution of the ectomycorrhizal community in the top soil of Norway spruce stands. Eur J For Res 127:347–357. doi: 10.1007/s10342-008-0209-7

Schenk HJ, Jackson RB (2005) Mapping the global distribution of deep roots in relation to climate and soil characteristics. Geoderma 126:129–140. doi: 10.1016/j.geoderma.2004.11.018

Schenk HJ, Jackson RB (2002) Rooting depths, lateral root spreads and below-ground/above-ground allometries of plants in water-limited ecosystems. J Ecol 90:480–494.

Shukla A, Vyas D, Jha A (2013) Soil depth: an overriding factor for distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. J Soil Sci Plant Nutr 13:23–33. doi: 10.4067/S0718-95162013005000054

da Silva EV, Bouillet J-P, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2011) Functional specialization of Eucalyptus fine roots: contrasting potential uptake rates for nitrogen, potassium and calcium tracers at varying soil depths: Functional specialization of Eucalyptus fine roots. Funct Ecol 25:996–1006. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01867.x

Soteras F, Cofre N, Bartoloni J, et al (2013) Arbuscular fungi (Glomeromycota) in the rhizosphere of Atriplex lampa at two saline environments of Cordoba (Argentina): depth influence on root colonization and the presence of morphospecies. Boletin Soc Argent Bot 48:211–219.

Stone MM, DeForest JL, Plante AF (2014) Changes in extracellular enzyme activity and microbial community structure with soil depth at the Luquillo Critical Zone Observatory. Soil Biol Biochem 75:237–247. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.04.017

Tahara K, Norisada M, Tange T, et al. (2005) Ectomycorrhizal Association Enhances Al Tolerance by Inducing Citrate Secretion in *Pinus densiflora*. Soil Sci Plant Nutr 51:397–403. doi: 10.1111/j.1747-0765.2005.tb00045.x

Taniguchi T, Usuki H, Kikuchi J, et al. (2012) Colonization and community structure of root-associated microorganisms of Sabina vulgaris with soil depth in a semiarid desert ecosystem with shallow groundwater. Mycorrhiza 22:419–428. doi: 10.1007/s00572-011-0417-8

Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Appl Environ Microbiol 64:5004–5007.

Virginia RA, Jenkins MB, Jarrell WM (1986) Depth of root symbiont occurrence in soil. Biol Fertil Soils 2:127–130. doi: 10.1007/BF00257591

Voriskova J, Brabcova V, Cajthaml T, Baldrian P (2014) Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. New Phytol 201:269–278. doi: 10.1111/nph.12481

Wolfe BE, Mummey DL, Rillig MC, Klironomos J (2007) Small-scale spatial heterogeneity of arbuscular mycorrhizal fungal abundance and community composition in a wetland plant community. Mycorrhiza 17(3):175-83. DOI: 10.1007/s00572-006-0089-y

Yang FY, Li GZ, Zhang DE, et al. (2010) Geographical and plant genotype effects on the formation of arbuscular mycorrhiza in Avena sativa and Avena nuda at different soil depths. Biol Fertil Soils 46:435–443. doi: 10.1007/s00374-010-0450-3

Zajicek J, Hetrick B, Owensby C (1986) The Influence of Soil Depth on Mycorrhizal Colonization of Forbs in the Tallgrass Prairie. Mycologia 78:316–320. doi: 10.2307/3793184

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Sup mat 1: References of works studying AMF colonization along a soil profile. Studies that crossed the 1-m depth threshold are inside the orange frame.

Ref.	*Depth (cm)*	*Soil*	*Region*	*Plants*	*Method*
Wolfe et al. 2007	12	calcareous	New York, USA	Hummocks *Sphagnum warnstorfii*	Inoculum potential
Kabir et al. 1998	25	sandy loam soil	Quebec, Canada	*Zea mays* L.	Grid-line intersect method
Moyersoen et al. 1998	35	sandy, acidic, and P depleted	south-west Cameroon	Atlantic coastal forest	Scoring (Hatch's method)
Barnola et al. 1997	30	Bedrock of precambian gneiss (pH 4.1-5.4)	Mérida Venezuela (1300 m)	Shrub-rosette Seasonal Pasture Humid pasture	Grid-line intersect method
Shukla et al. 2013	40	calcareous fen	India	Agroecosystem	spores
Grishkan et al. 2008	43	terra rossa on Upper Cenomanian limestone (pH 7.5-8)	Mount Carmel, Israel	Mediterranean, savannoid, evergreen forest + savanna grasses /Mediterranean maquis-forest (brushwood forest) of evergreen	Inoculum potential
Cuenca et al. 2010	45		Venezuelan Guayana	Shrubland *sclerophyllous*	spores
Rillig et al. 2003	45	synthetic serpentine soil		*Bromus hordeaceus L.* and *Lotus wrangelianus*	grid-line intersect method
Becerra et al. 2014	50	saline soils	Central Argentina	Chenopodiaceae	spores
Yang et al. 2010	50			Avena	Arbuscules/ vesicles observation méthode?
Neville et al. 2002	50	ferro-humic Podzol	northeast of Thunder Bay, Ont.	3-year-old boreal forest clear-cut Populus tremuloides	Line intersect method Microscope observation
Soteras et al. 2012	50	saline conditions	Central Argentina		Spores
Lindah et al. 2007	<50	podzol	Central Sweden	Boreal forest - *Pinus sylvestris L.*	DNA extraction on soil
Jumpponen et al. 2010	60		Weastern Kansas	Tallgrass	DNA extraction on soil
Cardoso et al. 2003	60	Oxisols	Brazil	Agroforestry/ monocultural coffee systems	Spores
Moll et al. 2016	70	Luvisol		Maize	DNA extraction on soil
Oehl et al. 2005	70			Grasslands, vineyard, maize fields	Spores
Gai et al. 2015	90		Northern China	Intensively managed Agricultural ecosystems	Inoculum potential
Higo et al. 2013	100			Soybean	Roots biomarkers
Harner et al. 2011	150		Northeastern Italy	Floodplain islands	Inoculum potential
Taniguchi et al. 2012	180	Mu-Us desert steppe zone	Mongolia, China, cool-temperate	Shrub species	Grid-line intersect method + DNA extractions on roots
Zajicek et al. 1986	220	Mollisols (Low Inorganic P / high organic P)	Kansas, USA	Grasslands	Microscopic observations
Virginia et al. 1986	480		California Sonoran Desert, USA	woody legume *Prosopis glandulosa* mesquite	Microscopic observations (method of Phillips and Hayman 1970)
Dalpe et al. 2000	3400		Senegal	*Faidherbia albida*	Inoculum potential

Sup mat 2: References of works studying EMF colonization along a soil profile (no reference over crossed the 1 m-depth threshold, the deepest EMF observation reached 75cm (Scattolin et al. 2008).

Ref	*Depth (cm)*	*Soil*	*Climate*	*Plants*	*Method*
Voriskova et al. 2014	5		Czech Republic Temperate	Oak forest *Quercus petrae*	DNA extraction from soil
Mujic et al. 2015	15		Oregon Coast range, USA	*Pseudotsuga menziesii*	Inoculum potential
Baier et al. 2006	20	Limestone	Bavarian Alps	17-year-old Norway spruce stand *Picea abies* [L.] Karst.	Anatomotypes (Agerer)
Genney et al. 2006	20		Northeastern Scotland	125-year-old Culbin Forest *Pinus sylvestris* L.	Morphotypes + DNA extraction from soil - T-RFLP
Coince et al. 2013	20		Northeastern France	Beech forest	DNA extraction from soil and roots
Anderson et al. 2014	20		Northeastern Scotland	Culbin forest *Pinus sylvestris*	DNA extraction from soil - T-RFLP
Courty et al. 2008	25	luvic cambisol	Northeastern France	100-year-old oak forest	DNA extraction from soil and roots
Dickie et al. 2002	< 30	lower litter, F-layer, H-layer, and B-horizon (mineral soil)	Pennsylvania, USA.	60-year-old-red pine plantation *Pinus resinosa*	DNA extraction from soil - T-RFLP
Rawat et al. 2003	30		Central Himalayas	Natural forests *Cedrus deodara Pinus roxburghii*	Mycorrhizal counting
Hobbie et al. 2014	30	mafic bedrock / Enon Series well-dev horizons , mixed clay mineralogy, pH = 5.75	Orange County, NC, USA	16-yr-old pine trees *Pinus taeda*	N isotopes
Moyersoen et al. 1998	35	sandy, acidic, and P depleted	south-west Cameroon	Atlantic coastal forest	Scoring (Hatch's method)
Hashimoto et al. 1998 Short Com.	45	1,300 m	Central Japan	Forest 40-year-old *Betula platyphylla* var.j aponica	Inoculum potential
Neville et al. 2002	50			3-year-old boreal forest clear-cut *Populus tremuloides*	Root samples
Rosling et al. 2003	52	podzol		Boreal forest	DNA extraction from individual root tips
Karlinski et al. 2015	60	mountain	Poland	Norway spruce stands	sand-filled mesh-bags method
Scattolin et al. 2008	75	high-mountain	Northern Italy	Norway spruce stands *Picea abies* [L.] Karst. 155–175 years	Microscope root observations
Clemmensen et al. 2015	100		Northern Sweden	5000yr fire-driven boreal forest	DNA extraction from soil

Chapitre 4

Carbone rhizosphérique

ARTICLE 4 : La réduction des précipitations augmente la concentration en carbone du sol rhizosphérique en grande profondeur dans une plantation d'*Eucalyptus grandis* au Brésil.

Introduction du chapitre

La plante alloue une partie significative du carbone qu'elle assimile par photosynthèse vers le système racinaire, pour le développement de son système racinaire ainsi que pour les symbioses mycorhiziennes, et directement vers le sol, sous forme de CO_2 via la respiration racinaire, ainsi que sous forme de molécules organiques par les processus de rhizodéposition : exsudats, lysats cellulaires, mucilage, cellules desquamées (Jones et al, 2009). Ces molécules organiques sont également une source importante d'azote apporté au sol (sous forme d'acides aminés et protéines). La rhizodéposition détermine largement le microbiome de la rhizosphère, promouvant les communautés favorables aux fonctions d'acquisition des racines fines (Morrissey et al. 2004, Carvalhais et al. 2013). Par ailleurs, la rhizodéposition peut avoir une fonction de protection des racines contre les agents biotiques et abiotiques (Huang et al. 2014). Nous soupçonnons la rhizodéposition, dans le cas des plantations d'eucalyptus de l'étude, d'être un phénomène important tant quantitativement, en regard aux « taches » observées sur les optodes pH (chap.1, 2-III), que qualitativement, en regard notamment de l'atténuation nécessaire de la rhizotoxicité de Al^{3+} dont nous avons constaté la forte accumulation dans la rhizosphère dans le chapitre 2 (Article 2).

Cependant la rhizodéposition n'a pas uniquement une répercussion au niveau de la plante. Elle joue également un rôle à l'échelle de l'écosystème, au niveau de la séquestration du carbone atmosphérique dans les sols. En effet, l'augmentation des gaz à effet de serre dans l'atmosphère, comme le dioxyde de carbone, est aujourd'hui reconnue comme une menace à la stabilité du climat mondial. L'une des conséquences est la modification des précipitations qui pourrait conduire, dans plusieurs régions du monde, à une augmentation de la fréquence et de l'intensité des épisodes de sécheresse d'ici la fin du siècle (Solomon et al. 2009). Une perspective pour réduire le CO_2 atmosphérique est d'augmenter le stockage global du carbone dans les sols (http://4p1000.org/), y compris le sous-sol et ses horizons profonds. Les plantations d'eucalyptus semblent favoriser le stockage du carbone dans le sol (Lima et al. 2006, Maquère et al. 2008). Même si la nécessité d'évaluer les stocks de carbone sur l'ensemble du profil de sol est aujourd'hui claire (Rumpel et Koegel-Knabner 2011), il manque encore de données à ce sujet. Dans ce contexte, il est crucial d'évaluer les conséquences de la modification du régime des précipitations sur la capacité des sols tropicaux profonds à stocker le carbone atmosphérique sous plantations.

Le bénéfice de la rhizodéposition sur l'augmentation du stock de carbone des sols, et particulièrement des sols profonds, est controversé (Fontaine et al. 2007). Cet apport de C et N pourrait en effet réveiller/stimuler des communautés microbiennes capables de minéraliser le C organique du sol déjà

stocké (« priming effect »). Quoiqu'il en soit, il est important de quantifier cet apport de matière organique dans le sol, la rhizodéposition étant généralement estimée plutôt que mesurée.

Les objectifs de ce chapitre étaient d'évaluer les stocks de C sous plantation d'eucalyptus le long d'un profil de sol profond et sous deux régimes hydriques (+W et –W), en distinguant deux niveaux d'étude : 1) le C stocké dans le sol non rhizosphérique et 2) l'apport de C et N au sol rhizosphérique par les processus de rhizodéposition. Pour cela une analyse CHN a été réalisée sur les sols rhizosphériques et non rhizosphériques échantillonnés lors des collectes 1 et 2.

« Article 4 » correspond aux résultats de ces analyses CHN obtenus pour les collectes 1 et 2 et s'intitule « **Rainfall reduction increases soil carbon storage capacity at great depth in *Eucalyptus grandis* plantation in a deep ferralsol in Brazil ».** Ce manuscrit d'article ne fera pas l'objet d'une publication en l'état puisqu'il intégrera des mesures d'activités microbiennes (respiration) qui seront prochainement réalisées sur les échantillons rhizosphériques et non rhizosphériques de la collecte 1 (cf partie perspectives -PERSP 2- du chapitre de conclusion). Les co-auteurs associés à ce projet sont Philippe Hinsinger, Jean-Paul Laclau, Suzanny Leal, Jean-Pierre Bouillet, Irae Amaral Guerrini, José Leonardo Moraes Gonçalves et Christophe Jourdan. Josiane Abadie sera également co-auteur de l'article en préparation pour sa contribution aux mesures de respiration microbienne.

Carvalhais LC, Dennis PG, Fan B, et al. (2013) Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. PLOS ONE 8:e68555. doi: 10.1371/journal.pone.0068555

Fontaine S, Barot S, Barre P, et al. (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. Nature 450:277-U10. doi: 10.1038/nature06275

Huang X-F, Chaparro JM, Reardon KF, et al. (2014) Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. Bot-Bot. doi: 10.1139/cjb-2013-0225

Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. Plant Soil 321:5–33. doi: 10.1007/s11104-009-9925-0

Lima AMN, Silva IR, Neves JCL et al. (2006) Soil organic carbon dynamics following afforestation of degraded pastures with eucalyptus in southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, **235**, 219–231.

Maquère V, Laclau JP, Bernoux M et al. (2008) Influence of land use (savanna, pasture, Eucalyptus plantations) on soil carbon and nitrogen stocks in Brazil. *European Journal of Soil Science*, **59**, 863–877.

Morrissey JP, Dow JM, Mark GL, O'Gara F (2004) Are microbes at the root of a solution to world food production? EMBO Rep 5:922–926. doi: 10.1038/sj.embor.7400263

Rumpel C, Koegel-Knabner I (2011) Deep soil organic matter-a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. Plant Soil 338:143–158. doi: 10.1007/s11104-010-0391-5

Solomon S, Plattner G-K, Knutti R, Friedlingstein P (2009) Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **106**, 1704–9.

Article 4 *La réduction des précipitations augmente la concentration en carbone du sol rhizosphérique en grande profondeur dans une plantation d'Eucalyptus grandis au Brésil*

Article 4: Rainfall reduction increases soil carbon concentration around fine roots at great depth in *Eucalyptus grandis* plantation in a deep Ferralsol in Brazil

Céline Pradier[1], Philippe Hinsinger[2], Jean-Paul Laclau[1], Suzanny Leal, Josiane Abadie[2], Jean-Pierre Bouillet[1], Irae Amaral Guerrini[4], José Leonardo Moraes Gonçalves[5], Christophe Jourdan[1]

[1]CIRAD, UMR Eco&Sols, Montpellier, France. [2]INRA, UMR Eco&Sols, Montpellier, France. [4]LSO, USP, Botucatu, Brazil. [5]LCF, ESALQ, Piracicaba, Brazil.

ABSTRACT

The increase of greenhouse gases in the atmosphere such as carbon dioxide is recognized to threaten the world climate stability. One impact is the modification of the precipitation regime that could lead, for the central part of South America, to an increase in both the frequency and the intensity of drought events by the end of the century. One perspective to reduce atmospheric CO_2 is to increase the global storage of C in soils, including the subsoil. In this context, it is crucial to evaluate the consequence of the rainfall regime modification on the ecosystem capacity to store C in the soil.

We studied the capacity of a 5-year old Eucalypt plantation to store C in the soil through its deep root system in an experiment that removes 37% of the actual throughfall relative to the normal rainfall regime. The total soil C and N contents were measured in both regimes within the rhizosphere and bulk soil along a 4-m deep soil profile during the dry season. The experience was repeated during the wet season along 2-m depth soil profiles.

We found that the contribution of the layers below 1-m depth contributed to more than half of the whole soil organic C and total N stocks.The expected accumulation of C and N within the rhizosphere was higher at greter soil depths. Moreover, this accumulation was significantly increased in the rainfall reduction treatment during the dry season where the organic C content at a depth of 4-m was multiplied by 3 compared to the bulk soil value. No treatment effect during the wet season was found, possibly due to the absence of water stress conditions.

Our results suggest a modification of the rhizodeposition pattern and/or of the rhizosphere microbiome with the rainfall regime that leads to different organic matter decomposition and soil organic C storage capacities. Further study is needed on the fate of this fresh organic matter input to evaluate the risk of loss by priming effect. In any case, our study demonstrates the capacity of such fast-growing trees to considerably impact soil organic C storage at greater soil depths.

INTRODUCTION

The eucalypt plantations are in constant expansion in Brazil and may cover more than 10 million of ha by 2020. These intensively managed plantations, with a very short rotation of 6 years may reach a productivity as high as 45 m^3 ha^{-1} yr^{-1} (ABRAF). If this huge production of aboveground biomass is mainly withdrawn from the fields at the end of the rotation by the wood industry, the corresponding belowground production is remaining in the soil. The different possible sources of organic C in the soil, and the subsoil, are detailed in the review of Rumpel and Koegel-Knabner in 2011 and consist of root litter, root exudates, dissolved organic matter, or aerial part residues originating in bioturbation. Some authors are now pointing out the potential root origin of the main part of soil C (Rasse et al. 2005) and the potentially non-negligible contribution of the subsoil for C sequestration (Rumpel et Kögel-Knabner 2011, Pierret et al. 2016). Even though the awareness for the need to take into account the subsoil when studying C sequestration and the role of roots, most studies still focus on the topsoil or, at best, on the first meter of soil. For example, the data produced by the IPCC regarding soil C stocks are considering only the top 30 cm of the soil. The potential impact of belowground production on the C stock in the subsoil can be particularly relevant to evaluate in the Brazilian eucalyptus plantations, given that several studies have reported fine root distribution down to considerable depth in such agroecosystems (Laclau et al. 2013, Silva et al. 2009, Christina et al. 2011).

Most past works evaluating the root contribution to soil C storage mainly measured the contribution of the root litter by estimation of biomass or root length density rather than measuring the extent of the rhizosphere effect. However, rhizosphere processes may be an important driver of soil organic matter decomposition at the ecosystem scale, with potential consequences for global C stocks and vegetation feedbacks to climate (Finzi et al. 2015). The so far published studies remain unclear about the contribution of the rhizodeposition to soil sequestration (Smucker 1984, Hütsch et al. 2002, Xu and Juma, 1994) but agree that this is a clearly a non-negligible source of soil C and a pool that needs to be better evaluated by direct measurements. The term rhizodeposition includes a wide range of processes by which C (and N) enters the soil. These processes are detailed in the review paper of Jones et al, 2009 and include: cell loss (from root cap and border cells), death and lysis of root cells (cortex, root hairs etc), flow of C to root-associated symbionts living in the soil (e.g. mycorrhizas), gaseous losses, leakage of solutes from living cells (root exudates), and insoluble polymer secretion from living cells (mucilage). On top of having consequences on soil organic C stocks, the impacts of rhizodeposits on the water potential gradient in the rhizosphere have also been demonstrated (Ghezzehei and Albalasmeh 2015). The mucilage exuded by roots can indeed profoundly modify the hydraulic properties of the rhizosphere and as a feedback, help plant performance in dry soils (Carminati et al. 2016).

According to the climatic models, a potential high risk of more frequent and severe drought events is expected in the coming years, and in particularly in Brazil. The impact of these drought events on the capacity of eucalypt plantations to play the role of a significant C sink has to be evaluated. The belowground biomass may be affected by the rainfall reduction but the fine root functioning may also be modified under drought conditions and thus lead to a modification of the root exudation, and thus of the rhizosdeposition pattern.

We present here a study of the root functioning along a 4-m deep soil profile in a eucalypt (*Eucalyptus grandis*) plantation exhibiting a deep root system under undisturbed and reduced rainfall regimes. Our objectives were to document the contribution of deep soil layers to the global soil organic C storage as well as the contribution of the root functioning through rhizosphere versus bulk soil N and C analyses. The hypotheses tested here were: 1) an accumulation of organic C and total N within the rhizosphere due to rhizodeposition and 2) a positive impact of depth and rainfall reduction on the amount of organic C stored in the soil, especially for increasing soil depth.

MATERIALS & METHODS

4.2.1. Study site and soil properties

The experiment was carried out in the heavily instrumented forest site of Itatinga (São Paulo State, Brazil, 23°02'S, 48°38'W), in a research station owned by the University of São Paulo. This site is located at 300 km from the sea, is rather flat (slope ≤ 3%), with an elevation of 860 m, and exhibits a humid subtropical climate ranked as a Cfa according to the Köppen classification (Peel et al. 2007), with a cold and dry season occurring between June and September. On average over the past 15 years, the annual rainfall was 1360 mm and the annual temperature was 19°C. There is a water table at approx. 17-m depth at this experimental site. The studied soil is a deep Ferralsol (according to FAO classification) / Typic Hapludox (according to USDA Soil Taxonomy) developed on Cretaceous sandstone, and exhibits little horizon differentiation. According to Laclau et al. (2010), between the soil surface and 4-m depth, soil properties are the following, from top (excluding the top 0-5 cm) to depth: Clay (151 – 256 g kg^{-1}), Silt (29 – 53 g kg^{-1}), Sand (620 – 732 g kg^{-1}), CEC (0.87 – 0.08 $cmol_c$ kg^{-1}), organic C (6.4 – 2.0 g kg^{-1}), total N (0.47 – 0.11 g kg^{-1}).

4.2.2. Experimental set up

A split-plot experimental design has been installed in June 2010 with a highly productive *Eucalyptus grandis* clone (name of the clone) used in the industrial plantations of the Suzano firm. Four treatments have been applied in three blocks: 2 K fertilization regimes (+K and –K) combined with 2 precipitation regimes (+W and –W). The four treatments are (Figure 1a):

1. **-K-W**, without K fertilization and with 37 % of throughfall exclusion
2. **+K-W**, with a K fertilization of 0,45 mol K m^{-2} applied as KCl (non limiting K nutrition for adequate tree growth according to Almeida et al., 2010) and an exclusion of 37 % of the throughfall
3. -**K+W**, without K fertilization and receiving normal rainfall
4. **+K+W**, with the same K fertilization as treatment 2 and receiving normal rainfall

The –W modality has been designed using a gutter system installed two months after planting: each inter-row was equipped with two 40-cm wide plastic sheets that intercept 37% of the throughfall and allow mimicking the rainfall reduction forecasted for the end of the 21st century in Brazil (IPCC, 2013). The +W received normal rainfall.

The present work has been carried out in two of these four treatments: +K +W and +K –W to focus on the impact of the rainfall treatment. For simplification, in the present paper the treatment (+K +W) will thus be abbreviated +W and the treatment (+K –W) will be abbreviated –W.

4.2.3. Sampling

Collection 1: 2015 dry season

Soil samples were collected between May and June 2015. A 1.5-m wide square pit was dug in the 3-m wide inter-row of the exclusion and control plots. Rhizosphere and bulk soil were sampled in layers located at 10 depths from the surface, down to a depth of 4 m (Figure 1c). At each depth, the four quarters of the pit were collected separately during the excavation in order to create four pseudo-replicates (Figure 1b). During the excavation, at each depth, the soil of each pseudo-replicate was placed in a separate wheelbarrow; all roots and their adhering soil (operationally-defined rhizosphere) were collected in a plastic bag. The rhizosphere was then separated from roots using a paintbrush. In order to prevent to collect bulk soil too close to roots, the bulk soil was sampled from root-free zones at various locations on the two walls of each quarter of the pit, at the end of the excavation of each soil depth, using a 40-cm^3 plastic vial.

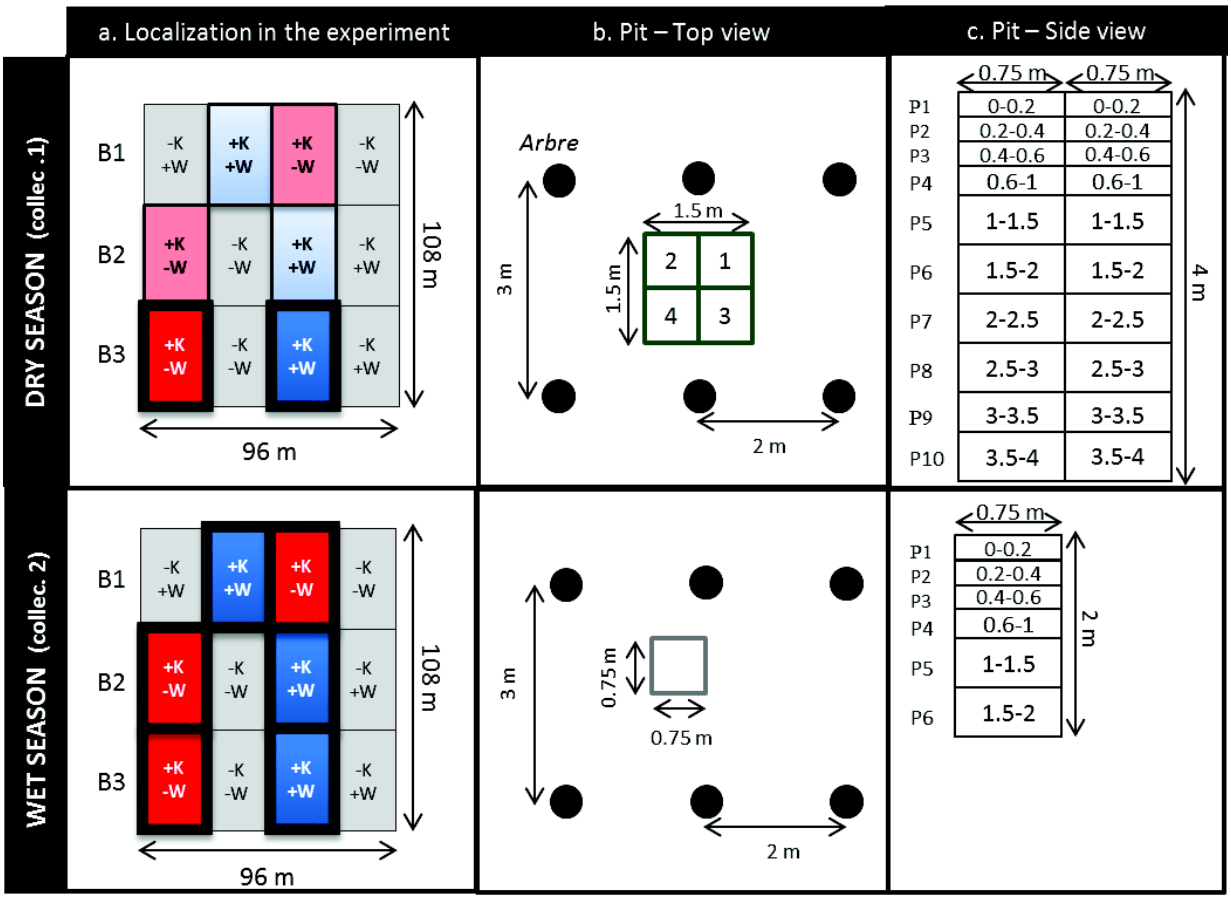


Figure 1: a. Complete experimental design with the three blocks: B1, B2 and B3 and the 6 treatments. The studied treatments (+K, +W) and (+K, -W) are marked with a bold outline: black when no pit had been dug in it and red when one pit had been dug in it during the concerning collection (Collection 1 at the top, Collection 2 at the bottom). b. Top view of the position of the pit within the row and inter-row of the plantation, with the four pseudo-replicates in case of Collection 1. c. Side view of the pit with the ten sampled depths from 0 to 4-m-depth (Collection 1) and the six sampled depths from 0 to 2-m-depth (Collection 2).

Collection 2: 2015 wet season

Soil samples were collected again in December 2015, which corresponds to the wet season. In this case, a 75 cm wide square pit was dug in the 3-m wide inter-row of the two selected treatments (-W and +W) for each of the three blocks (6 pits in total). Rhizosphere and bulk soil were sampled in layers located at 6 depths from the surface, down to a depth of 2 m (Figures 1b and 1c) following the same methodology as for Collection 1.

4.2.4. CHN analyses

Rhizosphere and bulk soil samples were air-dried at room temperature and sieved at 2 mm to remove root debris and homogenize the soil prior to analyses. Samples were ground at <0.2 mm and a 150 mg sub-sample weighted in an aluminum capsule prior to be assayed in the CN Soil analyzer (Flash 2000 Organic Elemental Analyzer). We tested the influence of the root debris contained into the rhizosphere sample on the organic C and total N results. For this, three kinds of sorting were realized on seven samples selected within the six depths and the two treatments of Collection 2:

1. **Normal sorting**, "reasonable" sorting performed on all the samples: only the root debris visible with the naked eye are removed
2. **Total sorting**, containing no more root debris at all
3. **Without sorting** (no sorting is carried out), all the root debris being thus included in the sample prior to CN analysis.

We compared the standard error induced by the sorting with the rhizosphere effect evidenced in the present study (i.e. obtained after “normal” sorting). The results are given in Table 1. The rhizosphere effect is weaker when accounting for this sorting standard error, but it is still higher than the inter block variability and thus, significant. This low contribution of root debris in the results may be explained by the very low weight of such debris in our soil samples. Thus, we will thereafter present the rough data obtained after normal sorting.

Table 1: Inter-block standard errors (s.e.) between the values obtained for the blocks B1, B2 and B3 (with normal sorting); R-B = (mean values obtained within the rhizosphere among the three blocks) - (mean values obtained within the bulk soil among the three blocks); Sorting s.e. between the three values of the test; [(R-B) - Sorting s.e.] = subtraction of the Sorting s.e. from the "R-B" values.

	Inter-block s. e.		*R-B (after normal sorting)*		*Sorting s. e.*	*(R-B) - Sorting s. e.*	
	+W	-W	+W	-W	+W/-W	+W	-W
P1	2.89E-01	1.67E+00	2.28E+00	1.60E+00	4.68E-01	1.82E+00	1.14E+00
P2	7.82E-02	5.55E-02	3.72E-01	2.82E-01	1.06E-01	2.65E-01	1.75E-01
P3	3.19E-02	3.41E-02	2.65E-01	2.88E-01	1.58E-01	1.07E-01	1.29E-01
P4	4.85E-02	1.85E-02	2.18E-01	1.89E-01	6.54E-02	1.52E-01	1.23E-01
P5	7.99E-02	3.05E-02	1.89E-01	1.66E-01	6.54E-02	1.24E-01	1.01E-01
P6	5.15E-02	2.95E-02	1.52E-01	1.69E-01	6.19E-02	9.04E-02	1.07E-01

4.2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted with the R software (version 3.2.2). Concerning the first collection, for the graphical representations, the mean values were calculated from our (pseudo-)replicates (n=4), as well as the standard errors. We used a linear model with four main factors [treatment (-W/+W), depth (P1-P10), compartment (Rhizosphere/Bulk soil), replicate (R1, R2, R3, R4)] and their interactions. Concerning the second collection, for the graphical representations, the mean values were calculated from our 3 replicates (n=3, for the 3 blocks), as well as the standard errors. We used a linear model

with four main factors [treatment (-W/+W), depth (P1-P6), compartment (Rhizosphere/Bulk soil), replicate (B1, B2, B3)] and their interactions. We used a Shapiro-Wilk test to check the normality of the residues before performing the variance analyses using the ANOVA function of the R software.

4.2.6. Graphical representation of the results

A general symbol code has been designed for all the Figures (Figure 2): the bulk soil compartment is represented by triangular symbols and rhizosphere compartment by circular symbols. We used full symbols when talking about the +W treatment and open symbols for the –W treatment. The difference between the values obtained within the rhizosphere compartment and the values obtained within the bulk soil are represented by a square symbol (full in +W treatment and open in –W treatment).

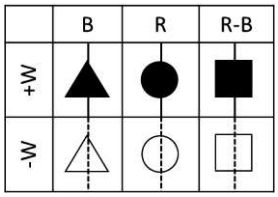


Figure 2: Graphical representation codes: +W [full symbol-solid line], -W [open symbol-dotted line], Bulk soil = B [triangular symbol], Rhizosphere = R [circular symbol], Difference between bulk soil and rhizosphere values, B-R [square symbol].

RESULTS OF COLLECTION 1 – DRY SEASON

4.3.1. Statistical analyses

For “depth P6 +W rhizosphere” and “depth P5 –W bulk” n=3 for the mean value and the standard errors as well as the statistics as there were obvious outliers. The statistical results obtained for the first collection are summarized in Table 2.

Table 2: Results of the ANOVA analyses applied to the residues of the linear model (variable ~ depth + compartment + treatment + replicate + Sample:Treatment + Depth:Compartment + Depth:Treatment, data = DFP1). Signif. Codes: 0 ‘*’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1.**

	C	N	C/N
Depth	***	***	***
Compartement	***	***	
Treatment	***	*	
Replicate			
Sample:Treatment	***	**	
Depth:Compartment	***	.	
Depth:Treatment			
Shapiro-Wilk	2.022e-06	1.405e-07	1.405e-07

4.3.2. Organic C and total N contents within both compartments

The value of organic C obtained within the bulk soil for the topsoil (P1: 0-0.2 m) in the fourth replicate (block) of the +W treatment was more than 3 times higher than the values obtained within the tree other replicates of this treatment (R1 0.86; R2 0.65 R3 0.76 R4 2.57%). A consistent variability was

obtained for total N in the bulk soil for P1 in the fourth block of the +W treatment (R1 0.53E-01; R2 0.40E-01 R3 0.47E-02 R4 1.32E-01 %). The figures 3a and 3c have been drawn without considering these points (a grey point being added to represent the average value when considering the fourth repetition). The statistical analyses have been therefore performed for the soil depth from P2 to P6 (0.2-2 m).

The organic C and total N content within the rhizosphere as well as within the bulk soil were significantly influenced by soil depth (<0.001). The rhizosphere values decreased following a power relationship with a R^2>0.8 (Figure 3) and the organic C and total N content within the bulk soil decreased exponentially (R>94) (Figure 3a and 3c). A significant interaction between sample and treatment (p>0.001 for C and p>0.01 for N) was found. The rhizosphere C and N values in the –W treatment were greater than those of the corresponding rhizosphere in the +W treatment. The organic C and total N contents within the bulk soil decreased from a mean value of 0.70 and 2.48E-02 % (without considering the replicate 4) at P1 to 0.13% and 6.1E-03% at P10 for C and N, respectively. Within the rhizosphere, the organic C content decreased from 2.60 and 1.24% at P1 to 0.26 and 0.41% at P10, for +W and –W, respectively and the total N content decreased from 1.28E-0.1 and 0.65E-01 % at P1 to 1.14E-02 and 1.58E-02 % at P10 for –W and +W, respectively.

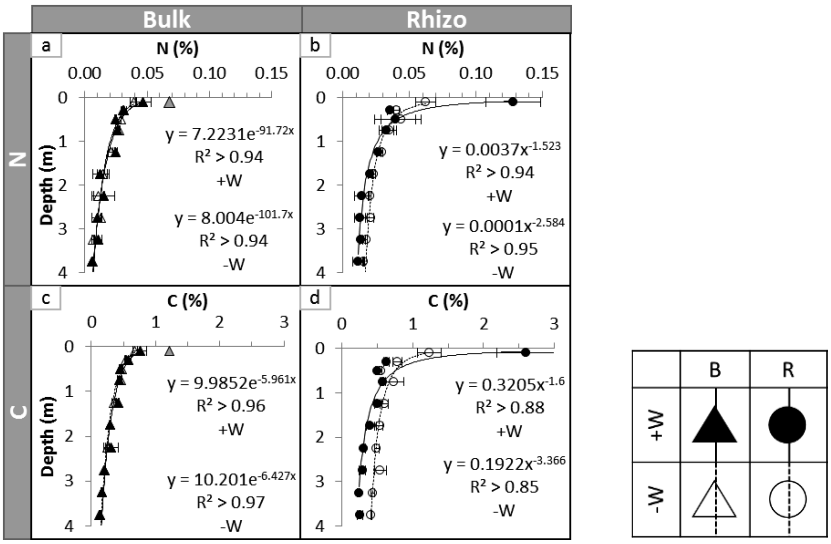
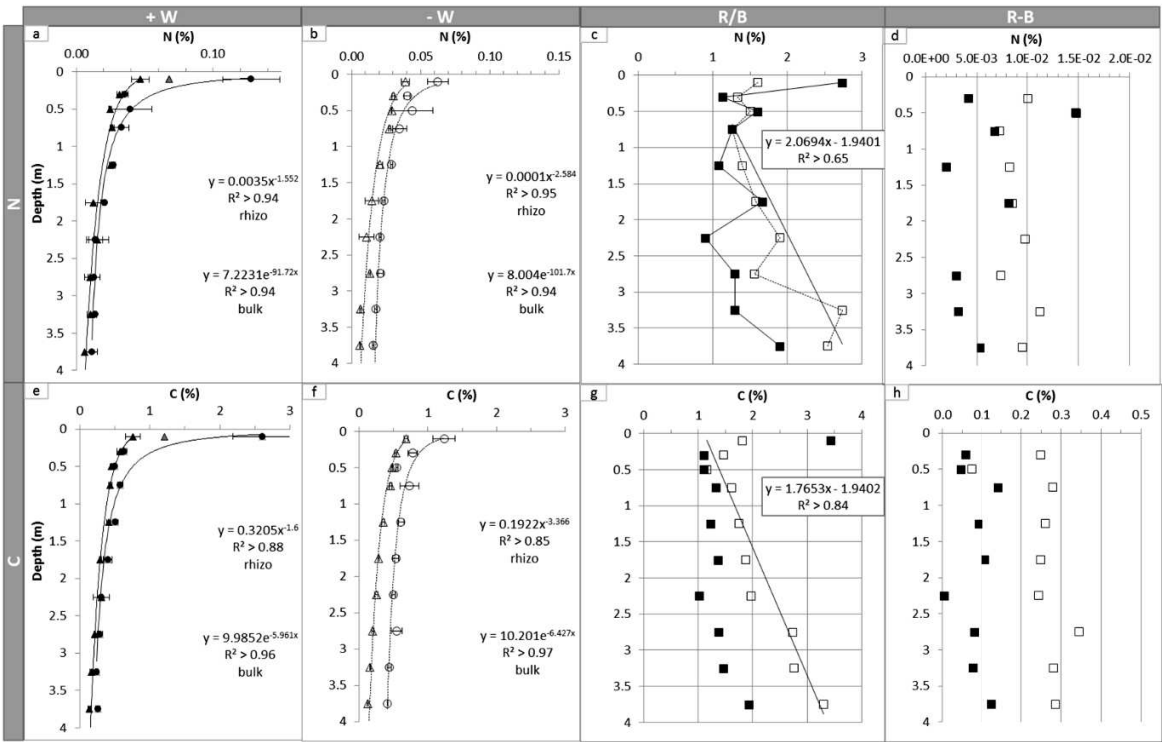


Figure 3: Total N (a, b) and organic C (c, d) content within the bulk soil (a, c) and within the rhizosphere (b, d) according to soil depth during Collection 1. Each point represents the mean value obtained for the 4 replicates; horizontal bars represent the standard error (s. e., n=4). In graph a and c, n=3 (replicate 4 being discarded) for the first depth of the +W treatment and the grey symbol represents the position of the point when considering the value obtained for replicate 4.

4.3.3. Rhizosphere effect on organic C and total N contents

A significant rhizosphere effect was found (<0.001) as total N and organic C contents increased within the rhizosphere compared to the bulk soil (Figure 4). This effect was particularly large in the topsoil of the +W treatment and for the entire soil depth profile investugated in the –W treatment. The

enrichment in organic C between 0 and 20 cm amounted to +1.84 and +0.55 (expressed in C%) in the +W and –W treatment respectively (without considering the fourth repetition for the bulk soil). The enrichment in total N in P1 amounted to +8.12E-02 and +2.34E-02 (expressed in N%) in the +W and –W treatment respectively (without considering the fourth replicate for the bulk soil). Between P2 and P10, the ratio between the mean organic C values within the rhizosphere and the bulk soil significantly increased with depth in the –W treatment, following a linear trend with a R^2>0.84. A similar increase with depth was observed for the ratio of total N values within the rhizosphere and the bulk soil (Figure 4c). The organic C enrichment in the rhizosphere amounted to +0.06 and +0.25 (expressed as C%) at P2 in the +W and –W treatments, respectively, and to +0.12 and +0.29 at P10 in the +W and –W treatment, respectively (Figure 4h). As a result, organic C content within the rhizosphere was multiplied by more than three times at 4-m depth compared to the bulk soil in the –W treatment (Figure 4g). The enrichment in total N amounted to +4.15E-03 and +1.01E-02 (expressed in N%) at P2 in the +W and –W treatments, respectively, and to +5.40E-03 and +9.57E-03 at P10 in the +W and –W treatments, respectively (Figure 4d).



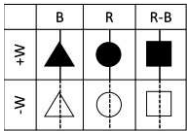


Figure 4: a,b,e,f. Comparison between results obtained within the bulk soil and the rhizosphere (a,b,e,f) for total N (a,b) and organic C (e,f) in both +W treatment (a,e) and –W treatment (b,f). Horizontal bars represent standard errors (n=4). c,g. Ratio Nrhizo / Nbulk (c) and Crhizo / Cbulk (g) calculated for both treatments. d,h. Difference of total N and organic C contents between the rhizosphere and the bulk soil.

4.3.4. C/N ratios

Pattern of the C/N ratio within each compartment

The statistical analyses found a significant effect of depth on the C/N ratio, with a slight increase with depth. However, it was hard to distinguish a clear pattern, notably due to the high standard errors found for the P7 P8 P10 depths in the rhizosphere and for the P6 P7 P8 P10 depths in the bulk soil (Figure 5). Focusing on the rhizosphere (Figure 5b), when the standard errors allowed to significantly distinguishing the results between the two rainfall treatments, i.e. for P2 P3 P4 P5 P9 depths, the C/N ratio was systematically higher in the –W treatment.

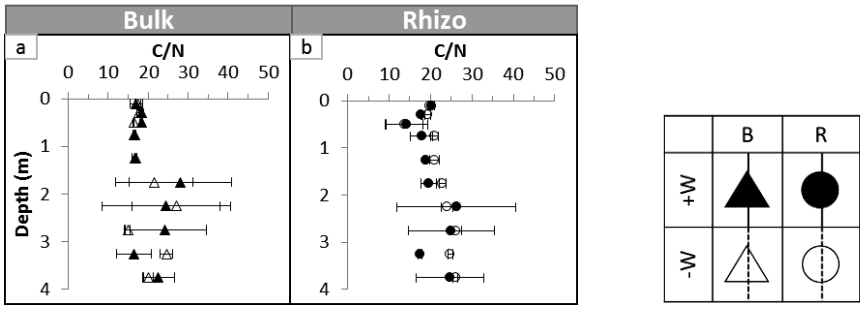


Figure 5: C/N ratios obtained within the bulk soil (a) and within the rhizosphere (b). Each point represents the mean value obtained for the 4 replicates. Horizontal bars represent standard errors (n=4).

Rhizosphere effect on the C/N ratio

No significant rhizosphere effect was found regarding the C/N ratio. However, In the –W treatment, at the depths where we had a significant difference between bulk soil and rhizosphere (P4 P5 P8 P10), we observed a higher C/N ratio within the rhizosphere (Figure 6b).

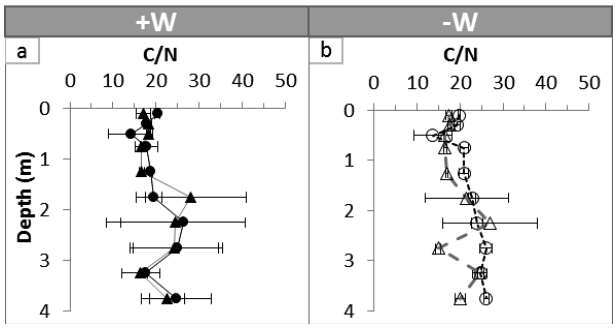


Figure 6: C/N ratios obtained within the bulk soil and the rhizosphere in +W treatment (a) and –W treatment (b). n=4.

RESULTS OF COLLECTION 2 – WET SEASON

4.4.1. Statistical analyses

The statistical results are summarized in Table 3. Because of a high variability in P1, the analyses were performed from P2 to P6.

Table 3: Results of the ANOVA analyses applied to the residues of the linear model: lm (variable ~ depth + compartment + treatment + replicate + Sample:Treatment + Depth:Compartment + Depth:Treatment, data = DFP1). Signif. Codes: 0 '*' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.**

	C	N	C/N
Depth	***	***	***
Compartement	***	***	***
Treatment			
Replicate		.	** 0.04
Sample:Treatment			
Depth:Compartment	***	***	.
Depth:Treatment			
Shapiro-Wilk	0.6776	0.1181	0.0002472

4.4.2. Organic C and total N contents within both compartments

The value of organic C obtained within the rhizosphere of the first block of the –W treatment was almost four times higher than the values obtained in the two other blocks of this treatment (4.41% in B1, 1.23% in B2 and 1.91% in B3). A consistent variability was obtained for total N in the rhizosphere of the first block of the –W treatment (2.31E-01 in B1, 6.58E-02 in B2, 9.91E-02 in B3). The figures 1b and 1d have thus been drawn without considering these points (a grey point represents the mean value when considering the three blocks including Block 1). The statistical analyses have thus been performed from P2 to P6.

The organic C and total N contents within the rhizosphere as well as within the bulk soil were significantly influenced by soil depth (<0.001) and were adjusted by a power relationship with a R^2>0.9 (Figure 7). A treatment effect was only visible for the topsoil (0-0.2 m) for the rhizosphere, showing higher organic C and total N contents in the +W treatment. The total N and organic C contents within the bulk soil decreased from 0.048 and 1% at P1 to 0.013% and 0.3% at P6, for N and C, respectively. Within the rhizosphere, the organic C content decreased from 2.52 and 3.3% at P1 (considering the 3 blocks) to 0.46% at P6 and the total N content decreased from 0.13 and 0.18% at P1 (considering the 3 blocks) to 0.018% at P6, for –W and +W respectively.

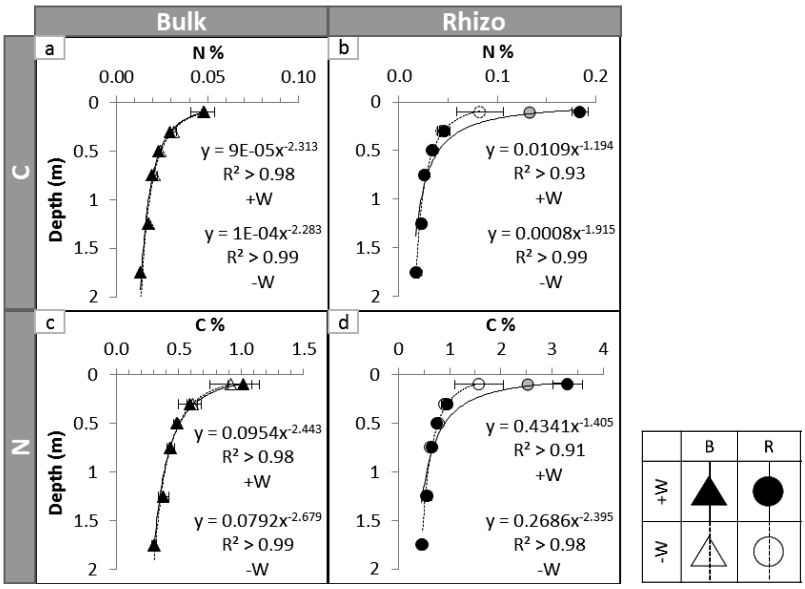


Figure 7: Organic C (a, b) and total N (c, d) content within the bulk soil (a, c) and within the rhizosphere (b, d). Each point represents the mean value obtained for the 3 blocks; horizontal bars represent the standard error (n=3). In graph d, n=2 for the first depth of the –W treatment and the grey round symbol represents the position of the point when also considering the value obtained in Block B1.

4.4.3. Rhizosphere effect on organic C and total N contents

A significant rhizosphere effect was found (<0.001) showing an enrichment in total N and organic C within the rhizosphere compared to the bulk soil (Figure 8). The enrichment in organic C between 0 and 20 cm amounted to +2.28 and +1.60% in the +W and –W treatment, respectively. The enrichment in total N in P1 amounted to +0.14 and +0.08 in the +W and –W treatment, respectively. Figure 7 shows the rhizosphere effect when zooming on the depths P2 to P6.

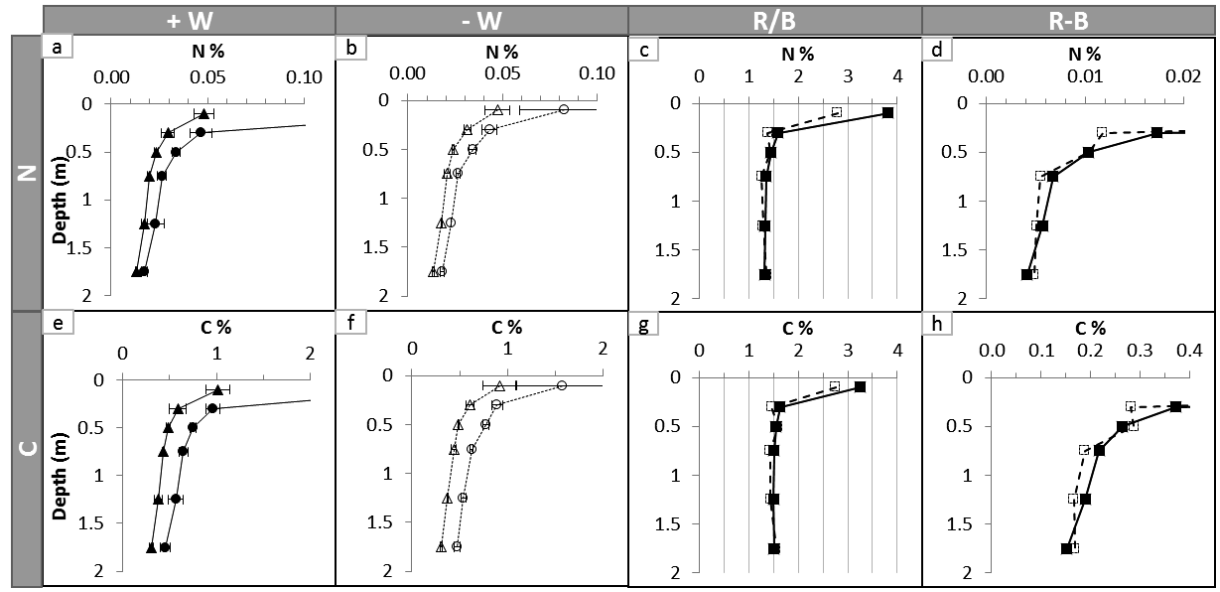


Figure 8 : a,b,e,f. Comparison between results obtained within the bulk soil and the rhizosphere (a,b,e,f) for total N (a,b) and organic C (e,f) in both +W treatment (a,e) and –W treatment (b,f). c,g. Ratios N_{rhizo} / N_{bulk} (c) and C_{rhizo} / C_{bulk} (g) calculated for both treatments. d,h. Difference of total N and organic C contents between the rhizosphere and the bulk soil. Horizontal bars (in a,b,e,f) represent standard errors (n=4).

4.4.4. C/N ratios

*Pattern of C/N ratio **w**ithin each compartment*

The C/N ratio significantly increased with increasing depth (Figure 9) following a linear function within the bulk soil (R^2>0.7 and R^2>0.9 for +W and –W treatment, resp.) and a power function within the rhizosphere (R^2>0.9). The ratio increased from 20 at P2 to 23 at P6 within the bulk soil and from 18 at P1 to 26 at P2 within the rhizosphere. No clear effect of water treatment was found.

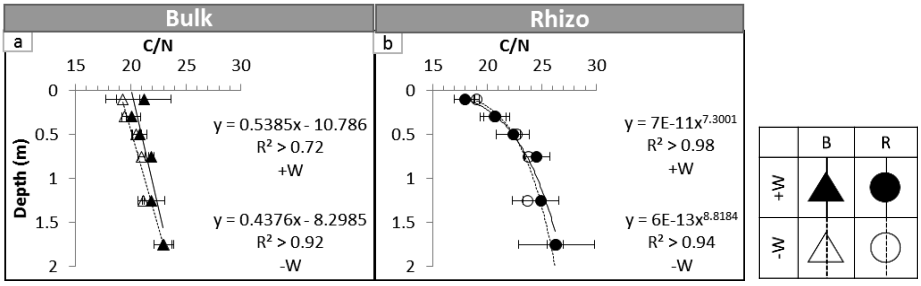


Figure 9 : C/N values obtained within the bulk soil (a) and within the rhizosphere (b). Each point represents the mean value obtained for the 3 blocks; horizontal bar represent the standard error (n=3).

Rhizosphere effect on the C/N ratio

Except for the first depth (P1), there was a rhizosphere effect ($p<0.001$) throughout the soil profile down to a depth of 2 m, with a higher C/N ratio within the rhizosphere than within the bulk soil (Figure 10). The pattern of this effect along the soil profile could be modeled by a positive exponential function with a R^2>0.9 (figure 10c).

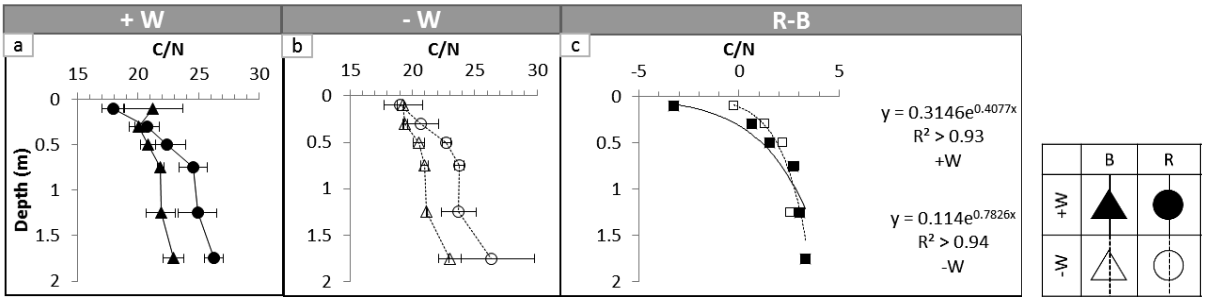


Figure 10 : a,b Comparison between result obtained within the bulk soil and the rhizosphere (a,b) for the C/N in both +W treatment (a) and –W treatment (b). c. Differences C/N_{rhizo} – C/N_{bulk} calculated for both treatments, with the exponential relationships included.

The comparison between the results obtained in Collection 1 and Collection 2 are available in supplementary material (Sup 1). Apart from the different rhizosphere effect, the results were comparable and are indicative of a rather good repeatability of our measurements.

DISCUSSION

4.5.1. More than a half of the bulk soil organic C is stored below 1 m-depth

We found an exponential decrease of soil organic C and total N contents with depth in both seasons and treatments, which is consistent with the literature (Ma et al. 2010, Olson et al. 2014). Moreover, the values obtained are comparable with those obtained on the same experiment in 2008 by Maquere et al. (organic C < 0.6 % and total N < 0.05 % below a depth of 15 cm). The organic C and total N contents within the bulk soil were not affected by the treatment whatever the season. This suggests that the source of organic C and total N of the bulk soil is not directly linked to present-day environmental conditions, nor by a difference in current trees' functioning between the two treatments. However, it would have been surprising to observe a significant effect after only 6 years of rainfall reduction given the huge volume of soil when considering the bulk soil over 4-m depth.

The average soil organic C content when considering the depths between 1 and 4 m was divided by 2.2 compared to the average organic C content within the first meter of soil, but the volume was four times bigger. Using the data of the first collection that reached the depth of 4-m, we estimated the organic C stored in each soil layer per hectare, using a soil density of 1.4g cm^{-3} (sup data 2). We found that 75 t ha^{-1} of organic C is stored in the first meter of soil whereas 107 t ha^{-1} are stored between the depth of 1 and 4 m (in the +W treatement). The organic C stock within the bulk soil below 1 m depth is thus bigger than the organic C stock within the first meter of soil. These deep soil layers, and the deeper ones also, down to the water table at about 17 m (Christina et al. 2011) should thus be taken into account in the global estimation of the soil organic C stocks.

Concerning total N, the non-negligible stock of total N can also have significant consequences in terms of fertility. We note here that the plantation received some N fertilization 3 months after planting (12

g N m^{-2}, i.e. 0.12 t ha^{-1}) to ensure non-limiting conditions for the growth of the trees of this site (Laclau et al. 2009) and that no N leaching had been measured for these plantations.

4.5.2. Up to three times more organic C within the deep rhizosphere under water stress

As expected, the rhizosphere was systematically, significantly enriched in organic C and total N. This is unlikely to be of aboveground origin, and is most probably due to C and N rhizodeposition by roots. Using the volumes of rhizosphere calculated by Pradier et al. 2016 and the difference of C content between the rhizosphere and the bulk soil, we could estimate the surplus of organic C stock induced by rhizodeposition for each layer of soil, over a 1 ha surface area (sup data 3). In both treatments, the higher organic C input to soil was logically found within the first 20 cm with an input almost three fold higher in the +W treatment (Sup mat 2). However, our goal in this study was to focus on the input of organic C to soil through rhizodeposition, without including the contribution of above ground litter decomposition. This objective is particularly difficult to assess within the first centimeters of soil where organic matter coming from aboveground biomass litter is partly aggregated to roots. We thus suspected that the difference between the two treatments in the topsoil was not completely due to differences in C rhizodeposition, given the difficulty to isolate the rhizosphere without including parts of the organic matter originating in leaf litter decomposition. The high standard errors found for this 0-20cm layer, both for rhizosphere and bulk soil further supported this assumption. To unequivocally evaluate the root effect, we thus focused on depths below 20 cm.

If we consider the global soil profile between 0.2 and 4 m depth, then we estimated the input of organic C at 1.7 t ha^{-1} in the +W treatment and 5.1 t ha^{-1} in the –W treatment, almost three times more. These findings raised several questions. At a mechanistic point of view, this difference between treatments and between top and deep horizons may be linked to a different pattern of rhizodeposition induced (i) by the rainfall reduction during the dry season and (ii) by the depth. Soil drying-rewetting effects on organic C and total N dynamics have mostly been studied in the absence of plants. However a recent study demonstrated that rhizodeposition is also affected by these cycles (Canarini and Dijkstra 2015). The treatment effect is certainly a response to a water stress that affected the whole plant, and especially its deep roots, during the dry season.

We found that the rainfall treatment affected the rhizosphere organic C and total N contents only during the dry season. During the wet season, even though trees of the –W treatment received 37% less throughfall, they still received enough water to avoid a stress (Laclau, personal communication). However, the huge difference during this wet period is the quantity of water that can be stored in the soil under normal rainfall condition, between 1 and 3-m deep in particular (see Pradier et al. in revision). In the –W treatment, no such accumulation of stored water could occur. It is thus logical that

the difference between the rainfall reduction treatment and the control treatment was more visible during the dry season when the roots of the –W treatment can only access 63% of the few rain events, and cannot use water stored in the soil as for the roots of the +W treatment. Thus, the absence of treatment effect during the wet season supports the hypothesis of a difference of accumulation of rhizodeposited C and N induced by a difference of root functioning in response to water stress conditions.

4.5.3. Turnover and fate of the fresh organic compounds injected within the rhizosphere

Jones et al. (2009) pointed out the extreme complexity in understanding the C and N flows in the rhizosphere, which are varying both spatially and temporally along the root. However, the estimation of these flows, and notably the fate of these fresh organic compounds, is crucial to evaluate the impact of the rhizodeposits on global soil organic C storage. The input values that we found only account for 1 and 3% of the amount of organic C initially present in the bulk soil (for +W and –W respectively). Nevertheless, the organic C and total N contents were measured at a single point in time; with our destructive analyses, the fate of these rhizodeposits is unknown, and we do not know over which period of time they have been produced. It should thus be crucial to know if the rhizodeposits are more likely to be decomposed or stored or involved in the mineralization of the stable pool of soil organic matter, through a priming effect (Wang et al. 2016). Rasse et al. (2005) argued that “root C has a longer residence time than shoot C does” and reviewed some of the mechanisms for the specific preservation of root C in soils. The chemical recalcitrance, the physico-chemical protection through the interaction with minerals or with metals were pointed out. Even if Rasse et al. (2005) made this comment for both rhizodeposits and dead root biomass, the last explanation for lower decomposability (physico-chemical protection through the interaction with metals) could be particularly at stake in our experimental site as high levels of aluminum were measured, notably within the rhizosphere (Pradier et al. *in prep*.). The absence of toxicity symptoms on the tree growth points out the occurrence of a mechanism of protection that may well be the exudation of organic compounds to complex the aluminum and make it unavailable for the roots (Ma et al. 2001). Moreover, aluminum has been recognized as a potential inhibitor of microbial degradation (Kinraide and Sweeney, 2003) especially when directly bound to organic matter (Frannsson et al. 2004). Another mechanism of preservation of the organic matter in soil is the presence of ectomycorrhizal fungi that may reduce soil C respiration by competition for N between these symbiotic fungi and the free-living microbial decomposers, leading to an increase of soil C storage in ectomycorrhizal ecosystems globally (Averill and Hawkes 2016). It occurs that the eucalypt plantation of this study was highly colonized by ectomycorrhizal fungi whose presence had been detected until at least the depth of 4 m (Pradier* Robin* et al. *in prep*.).

The influence of soil depth on the priming effect has little been studied so far. Karhu et al. (2016) recently found that the priming effect increases with depth in a boreal forest soil. However, there is no such evidence in other types of ecosystems. The C/N ratio can be an index of the mineralization potential. The C/N ratio decreased with depth during the rainy season for both treatment, following a linear function for the bulk soil and a power function for the rhizosphere. During the dry season, because of high standard errors, no clear evolution could be seen even though a trend within the rhizosphere was found, showing higher C/N ratio at depth in the –W treatment. An increase of C/N with depth is not the common trend reported in the literature (Jenjinson et al. 2008, Krull and Skjemstad 2003) even though Dumig et al. (2009) also found an increase of the C/N ratio with depth. A higher C/N ratio could lead to a stronger competition between microorganisms and plants for soil N that potentially may decrease the activity of mineralization and be in favor of a better stability of the soil organic matter.

4.5.4. A main root origin for the organic C and total N in the bulk soil?

We already evidenced the clearly non-negligible amount of organic C found in the bulk soil until great depth. This raises the question of the origin of this organic C found in the bulk soil, especially at such depths. The possible origins of organic C in soil are both the belowground component (root turnover and rhizodeposition) and the aboveground biomass (Kuzyakov et al. 2000). The review by Rasse et al. (2005) provided a number of arguments supporting the hypothesis that “soil C is mostly composed of root C and increasingly so with soil depth”. Obviously, a difference in root functioning during only 6 years (the time of the present experiment of rainfall reduction) is not enough to see any significant effect within the bulk soil. However, as the site has been colonized by forests for years, we could imagine that a great part of the bulk soil volume may have been colonized formerly by some roots, and thus be at this precise moment, a rhizosphere. Although it is likely that a large proportion of deep soil organic C is of root origin, it is however possible that a portion of soil organic C found at depth is also the result of the leaching of dissolved organic C from the upper soil horizons or of bioturbation by soil fauna (eg. termites).

To conclude, the eucalypt plantations are a potential sink for organic C with a particular importance of the deep horizons, notably during drought events, as related to root colonization, turnover and activity, especially rhizodeposition. Even though some hypotheses of preservation mechanisms have been raised for this organic C deposited at depth, further studies are needed about the fate of these fresh organic compounds, using for instance the stable isotopes ^{13}C and ^{15}N. This study focused on rhizosphere properties at a single point in time, and thus on the contribution of rhizodeposition to soil organic C stock, but it would be meaningful to also measure the impact of rainfall reduction on the fine root turnover, eg. by using minirhizotrons.

REFERENCES

ABRAF (2013) Anuário Estatístico da ABRAF. In: *Ano Base 2012*. Brasilia, DF.

Averill C, Hawkes CV (2016) Ectomycorrhizal fungi slow soil carbon cycling. Ecol Lett 19:937–947. doi: 10.1111/ele.12631

Canarini A, Dijkstra FA (2015) Dry-rewetting cycles regulate wheat carbon rhizodeposition, stabilization and nitrogen cycling. Soil Biol Biochem 81:195–203. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.11.014

Carminati A, Kroener E, Ahmed MA, et al. (2016) Water for Carbon, Carbon for Water. Vadose Zone J. doi: 10.2136/vzj2015.04.0060

Christina M, Laclau JP, Goncalves JLM, et al. (2011) Almost symmetrical vertical growth rates above and below ground in one of the world's most productive forests. Ecosphere 2:2710.

Dümig A, Knicker H, Schad P, et al. (2009) Changes in soil organic matter composition are associated with forest encroachment into grassland with long-term fire history. Eur J Soil Sci 60:578–589. doi: 10.1111/j.1365-2389.2009.01140.x

Finzi AC, Abramoff RZ, Spiller KS, et al. (2015) Rhizosphere processes are quantitatively important components of terrestrial carbon and nutrient cycles. Glob Change Biol 21:2082–2094. doi: 10.1111/gcb.12816

Fransson AM, Vinogradoff S, Godbold DL, et al. (2004) Aluminum complexation suppresses citrate uptake by acid forest soil microorganisms. Soil Biol Biochem 36:353–357. doi: 10.1016/j.soilbio.2003.09.015

Ghezzehei TA, Albalasmeh AA (2015) Spatial distribution of rhizodeposits provides built-in water potential gradient in the rhizosphere. Ecol Model 298:53–63. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2014.10.028

Hütsch BW, Augustin J, Merbach W (2002) Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils. J Plant Nutr Soil Sci 165:397–407. doi: 10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C

Jenkinson DS, Poulton PR, Bryant C (2008) The turnover of organic carbon in subsoils. Part 1. Natural and bomb radiocarbon in soil profiles from the Rothamsted long-term field experiments. Eur J Soil Sci 59:391–399. doi: 10.1111/j.1365-2389.2008.01025.x

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

Karhu K, Hilasvuori E, Fritze H, Pumpanen J (2016) Priming effect increases with depth in a boreal forest soil. Soil Biology and Biochemistry 99:104-107. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.05.001

Kinraide TB, Sweeney BK (2003) Proton alleviation of growth inhibition by toxic metals (Al, La, Cu) in rhizobia. Soil Biol Biochem 35:199–205. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00246-8

Krull ES, Skjemstad JO (2003) δ13C and δ15N profiles in 14C-dated Oxisol and Vertisols as a function of soil chemistry and mineralogy. Geoderma 112:1–29. doi: 10.1016/S0016-7061(02)00291-4

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

Laclau J-P, Almeida JCR, Gonçalves JLM, et al (2009) Influence of nitrogen and potassium fertilization on leaf lifespan and allocation of above-ground growth in Eucalyptus plantations. Tree Physiol 29:111–124. doi: 10.1093/treephys/tpn010

Laclau J-P, da Silva EA, Rodrigues Lambais G, et al. (2013) Dynamics of soil exploration by fine roots down to a depth of 10 m throughout the entire rotation in Eucalyptus grandis plantations. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00243

Laclau J-P, Ranger J, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2010) Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations. For Ecol Manag 259:1771–1785. doi: 10.1016/j.foreco.2009.06.010

Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. Trends Plant Sci 6:273–278. doi: 10.1016/S1360-1385(01)01961-6

Ma XZ, Chen LJ, Chen ZH, et al. (2010) Soil glycosidase activities and water soluble organic carbon under different land use types. Rev Cienc Suelo Nutr Veg 10:93–101. doi: 10.4067/S0718-27912010000200001

Maquere V, Laclau JP, Bernoux M, et al. (2008) Influence of land use (savanna, pasture, Eucalyptus plantations) on soil carbon and nitrogen stocks in Brazil. Eur J Soil Sci 59:863–877. doi: 10.1111/j.1365-2389.2008.01059.x

Olson KR, Al-Kaisi MM, Lal R, Lowery B (2014) Experimental Consideration, Treatments, and Methods in Determining Soil Organic Carbon Sequestration Rates. Soil Sci Soc Am J 78:348. doi: 10.2136/sssaj2013.09.0412

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol Earth Syst Sci 11:1633–1644. doi: 10.5194/hess-11-1633-2007

Pierret A, Maeght J-L, Clément C, et al. (2016) Understanding deep roots and their functions in ecosystems: an advocacy for more unconventional research. Ann Bot mcw130. doi: 10.1093/aob/mcw130

Pradier C, Hinsinger P, Laclau JP, Bouillet JP, Guerrini IA, Gonçalves JLM, jourdan C (2016). Rainfall reduction impacts rhizosphere biogeochemistry in Eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil. Plant Soil.

Pradier C, Hinsinger P, Laclau JP, et al. (*in prep*). Rainfall reduction does not affect Al and nutrient availability during the wet season in a *Eucalyptus grandis* plantation grown in a deep Ferralsol under humid sub-tropical climate.

Pradier* C, Robin* A et al. *(in prep*). First evidence for ectomycorrhizae associated with deep roots in a eucalyptus plantation in Brazil.

Rasse DP, Rumpel C, Dignac M-F (2005) Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. Plant Soil 269:341–356. doi: 10.1007/s11104-004-0907-y

Rumpel C, Koegel-Knabner I (2011) Deep soil organic matter-a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. Plant Soil 338:143–158. doi: 10.1007/s11104-010-0391-5

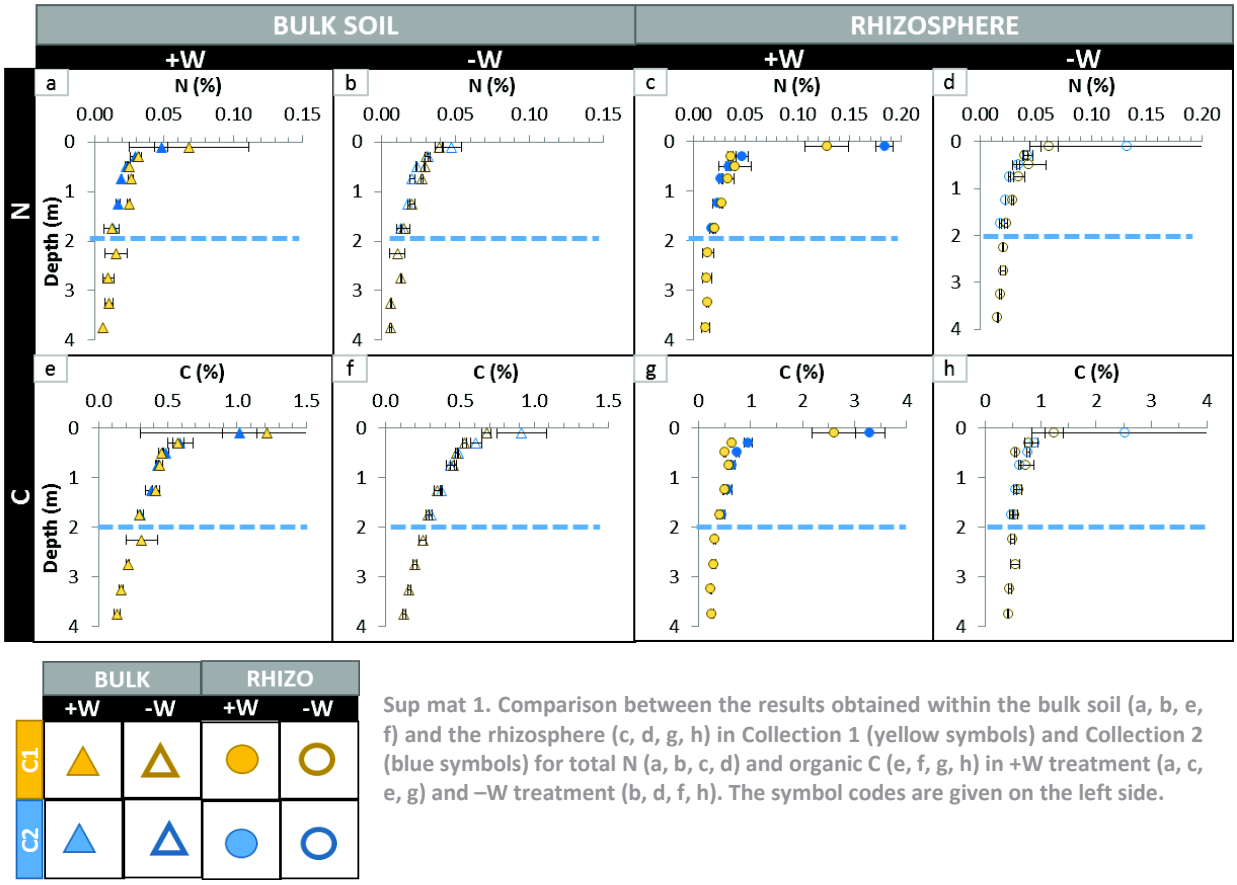
Silva EV, Gonçalves JL, Coelho SR, et al. (2009) Dynamics of fine root distribution after establishment of monospecific and mixed-species plantations of Eucalyptus grandis and Acacia mangium. Plant Soil 325:305–318. doi: 10.1007/s11104-009-9980-6

Smucker AJM (1984) Carbon utilization and losses by plant root systems. ResearchGate 27–46.

Wang X, Tang C, Severi J, et al. (2016) Rhizosphere priming effect on soil organic carbon decomposition under plant species differing in soil acidification and root exudation. New Phytol 211:864–873. doi: 10.1111/nph.13966

Xu JG, Juma NG (1994) Relations of shoot C, root C and root length with root-released C of two barley cultivars and the decomposition of root-released C in soil. Can J Soil Sci 74:17–22. doi: 10.4141/cjss94-002

SUPPLEMENTARY MATERIALS



Sup mat 1. Comparison between the results obtained within the bulk soil (a, b, e, f) and the rhizosphere (c, d, g, h) in Collection 1 (yellow symbols) and Collection 2 (blue symbols) for total N (a, b, c, d) and organic C (e, f, g, h) in +W treatment (a, c, e, g) and –W treatment (b, d, f, h). The symbol codes are given on the left side.

Sup mat 2. Estimation of the organic C stock, within the bulk soil and the rhizosphere and both. C_{rhizo}-C_{bulk} represents the input of C by roots within the rhizosphere for each soil layers. These calculations were based on the volume of rhizosphere given for each layer and per hectare in Pradier et al. (*in revision*).

Treat.	Layers	Stock C (bulk)	Stock C (rhizo)	C_{rhizo}-C_{bulk}	Stock C (bulk +rhizo)
	Cm	t ha^{-1}			
+W	0-20	21.25	13.71	9.71	34.95
	20-40	16.12	0.99	0.09	17.11
	40-60	12.68	0.77	0.07	13.45
	60-100	24.54	1.77	0.43	26.31
	100-150	29.04	1.71	0.31	30.75
	150-200	20.63	1.62	0.43	22.25
	200-250	21.71	0.62	0.01	22.34
	250-300	14.79	0.47	0.13	15.27
	300-350	11.57	0.31	0.10	11.88
	350-400	9.44	0.32	0.15	9.76
Total		182	22.3	11.4	204
-W	0-20	19.09	8.31	3.73	27.40
	20-40	14.91	2.03	0.65	16.95
	40-60	13.38	1.33	0.18	14.71
	60-100	25.56	3.27	1.24	28.83
	100-150	24.48	2.99	1.28	27.47
	150-200	19.97	1.46	0.68	21.44
	200-250	17.51	0.70	0.35	18.22
	250-300	13.95	0.59	0.37	14.54
	300-350	11.15	0.33	0.21	11.48
	350-400	8.73	0.18	0.12	8.91
Total		169	21.2	8.80	190

Discussion générale et Perspectives

Introduction

L'objectif général de la thèse était de franchir la frontière de la profondeur dans l'étude du fonctionnement des racines fines et, indissociablement de la rhizosphère. Plus particulièrement, il s'agissait d'acquérir des données sur le rôle des racines fines profondes en termes de nutrition minérale pour la plante et de stockage de carbone dans le sol via le phénomène de rhizodéposition, dans un contexte de changement climatique. **Pour cette étude**, **nous avons utilisé le modèle de l'eucalyptus en plantation clonale au Brésil** qui s'est déjà imposé comme un excellent modèle d'étude de l'enracinement profond grâce à une production rapide de biomasse racinaire fine dans des sols restant relativement homogènes jusqu'à la nappe située à 17 m dans notre site d'étude (Laclau et al. 2013). Deux régimes hydriques contrastés ont été étudiés pour aborder la question du changement climatique. Le régime hydrique naturel (+W) a été comparé à un régime hydrique réduit (-W), simulant une réduction des précipitations grâce à un dispositif permettant d'exclure 37 % des pluviolessivats.

Ma thèse a reposé sur l'idée que les racines fines sont capables d'adapter leur fonctionnement à leur environnement, notamment pour avoir accès aux ressources qu'il offre. L'étude était alors fondée sur l'hypothèse qu'un changement de fonctionnement pouvait se produire entre la surface et la profondeur ainsi qu'entre le traitement témoin et le traitement de réduction des précipitations en affectant les propriétés de la rhizosphère, de manière significative et détectable. Un schéma conceptuel qui synthétise les processus rhizosphériques abordés dans le cadre de ma thèse est présenté dans la Figure 1.

Mes travaux de thèse se sont organisés en deux grandes étapes. Une démarche de développement méthodologique de la technique optode pour son utilisation *in situ* et en profondeur a fait apparaitre un certain nombre de difficultés ne pouvant être surmontées sur le modèle eucalyptus et sur le temps imparti pour la thèse (chapitre 1). Une démarche expérimentale de collecte de sol rhizosphérique et non rhizosphérique le long de profils de sol de 2 à 4 mètres a finalement permis d'obtenir des résultats originaux sur le fonctionnement des racines fines profondes en situation de stress hydrique.

Dans cette dernière partie de la thèse, les principaux résultats obtenus seront recroisés en les articulant autour des deux grandes problématiques de ma thèse à savoir : (1) l'effet de la profondeur et (2) l'effet de la réduction des précipitations sur le fonctionnement des racines fines. Des perspectives seront proposées afin de compléter les études réalisées. Nous invitons le lecteur à se référer aux schémas de synthèse récapitulant les principaux résultats de la thèse : Figures 2 et 3.

Discussion des résultats

I. Effet de la profondeur sur le fonctionnement racinaire

L'étude de l'effet rhizosphérique induit par le fonctionnement racinaire le long d'un profil de sol de 4 mètres en condition hydrique non modifiée (+W) a permis d'obtenir 3 résultats majeurs :

- **Modification de la physico-chimie**. L'effet rhizosphérique sur le pH ne s'est pas avéré significatif dans le traitement +W. Cependant, une tendance claire à l'acidification a pu être identifiée, notamment sous le premier mètre de sol comme le résume la Figure 2 présentant les moyennes obtenues pour les ratios $[H_3O^+]_{rhizo}/[H_3O^+]_{bulk}$ entre 0.2 et 1 m / 1 et 2 m / 2 et 4 m. Le fonctionnement racinaire se traduit également par une accumulation significative de potassium échangeable dans le milieu rhizosphérique sur l'ensemble du profil de sol. Cette accumulation est légèrement accentuée sous le premier mètre de sol (Figure 2).
- **Rhizodéposition**. Une accumulation de C organique et de N total a été mesurée autour des racines ; cette accumulation est d'autant plus importante que la profondeur augmente (Figure 2). Cette augmentation de C organique et de N total dans la rhizosphère a été interprétée comme la signature de la rhizodéposition.
- **Ectomycorhization.** Un résultat particulièrement marquant de la thèse est la possibilité d'observer des preuves de la symbiose ectomycorhizienne des racines fines jusqu'à 4 mètres de profondeur. Deux morphotypes d'ectomycorhizes ainsi que des rhizomorphes ont pu être collectés sur l'ensemble du profil (Figure 3).

Ces résultats montrent clairement que **les racines fines profondes sont capables de fonctionner et d'interagir avec leur environnement, en s'associant avec des champignons mycorhiziens et en modifiant les propriétés du sol rhizosphérique**. D'autre part, leur fonctionnement semble impacter la rhizosphère selon la **même tendance qu'en surface mais avec un effet légèrement plus marqué**. Nous allons discuter de ce que ces résultats impliquent en termes de nutrition minérale pour la plante et de stockage du carbone dans le sol.

A. Implication de ces résultats en termes de nutrition minérale

L'abaissement du pH dans la rhizosphère est en partie lié à un prélèvement excédentaire de cations par rapport aux anions (Marschner 1995, Hinsinger et al. 2003). Une partie du C apporté par la rhizodéposition correspond cependant à l'exsudation par la racine de composés organiques de faible poids moléculaire pouvant également participer à l'acidification du milieu rhizosphérique (Hoffland 1992). L'acidification peut être une stratégie de « mining » dans le but de mobiliser les éléments

nutritifs des minéraux du sol en favorisant leur altération, notamment dans le cas des minéraux silicatés (West et al. 2005). Une conséquence néfaste de cette stratégie est cependant l'augmentation concomitante de Al^{3+} au sein de la rhizosphère (Chapitre 2_Article 2) pouvant provenir notamment de ces minéraux silicatés (Marschner, 1995). L'exsudation peut alors avoir comme second rôle de contrôler l'effet toxique de Al^{3+} par chélation par exemple (Miyasaka et al. 1991). Une situation similaire d'acidification de la rhizosphère en sol acide a été enregistrée en surface dans une plantation de douglas en milieu tempéré (Turpault et al. 2007). *Une perspective serait d'identifier les exsudats racinaires afin de mieux comprendre l'action de « mining » à laquelle ils participent, ainsi qu'à leur action de protection contre l'aluminium* **PERSP 3.**

L'hypothèse d'une altération par l'acidité s'est également imposée au regard des résultats concernant l'élément potassium. En effet, il s'est avéré que le flux de masse, s'élevant à 2 kg K ha^{-1} an^{-1} ne suffit pas à fournir les 17.5 kg K prélevés par les arbres lors de la $5^{ème}$ année de rotation, en raison d'une très faible concentration en K dans la solution du sol (Laclau et al. 2010). Par conséquent, les arbres doivent forcément puiser dans les ressources en K non mobilisées par flux de masse. Le principe d'apport par diffusion est contradictoire avec l'accumulation de K observée au sein de la rhizosphère. L'hypothèse mise en avant dans le chapitre 2a est donc l'altération des minéraux contenant du K. Le fait que le K échangeable s'accumule dans la rhizosphère pourrait être dû à une vitesse d'altération et d'approvisionnement du K plus importante que la vitesse d'absorption racinaire. Une telle accumulation a déjà été enregistrée en plantation de conifères sur des sols acides tempérés (Clegg and Gobran 1997, Turpault et al. 2005, Calvaruso et al. 2014). Cependant le sol de notre étude est fortement altéré de sorte qu'il contient peu de minéraux potassiques facilement altérables, en particulier de minéraux argileux 2:1 ou de micas abritant du K en position interfoliaire. Néanmoins, même dans les sols tropicaux, de petites quantités de minéraux 2:1 peuvent être trouvées au sein de minéraux argileux 1:1 (type Kaolinite), et peuvent considérablement influer sur la dynamique de K dans le sol (Fontaine et al. 1989, Melo et al. 2002, Darunsontaya et al. 2012). En outre, l'altération des minéraux primaires les plus résistants à l'altération, tels que les feldspaths ou la muscovite, est également une source potentielle de K sous l'effet de l'acidité (West et al. 2005, Hinsinger et al. 1993). *Une détermination classique de la minéralogie du site d'étude (diffraction de rayon X, fraction >2 µm et <2 µm) avait été réalisée lors de la thèse de Valérie Maquère et n'avait pas fait apparaitre de minéraux argileux 2:1, la minéralogie étant largement dominée par le quartz et la kaolinite. Une perspective serait de déterminer plus finement la minéralogie, à la recherche notamment de minéraux argileux interstratifiés dans les fractions les plus fines. La comparaison sol rhizosphérique /bulk soil serait particulièrement intéressante à ce titre, à l'instar des travaux conduits en sols tempérés par Paola et al. 2016* **PERSP 4.**

Les ectomycorhizes sont connues pour l'aide qu'elles apportent à la plante en termes d'acquisition de l'eau et de nutriments, au travers de leurs actions de « foraging » mais également de « mining » (Khalvati et al. en 2005 , Plassard et al. 2002, Mengel et kirkby 1987, Casarin et al. 2003, Becquer et al. 2014). Leur présence en profondeur est donc un indice fort pour appuyer le rôle des racines fines profondes dans la nutrition minérale. La présence de rhizomorphes laisse penser à une exploration mycorhizienne du type « long-distance » ce qui serait logique en réponse à un milieu peu concentré en nutriments (Agerer 2001). *L'analyse moléculaire en cours donnera des informations notamment sur la diversité des espèces mycorhiziennes présentes le long du profil de sol* **PERSP 1.**

B. Implication de ces résultats en termes de stockage du carbone dans le sol

En réponse à un apport de matière organique fraîche, les microorganismes en dormance dans le sol peuvent être réactivés. Des microorganismes spécialisés (stratégie r) se développent rapidement et décomposent la matière organique fraîche (MOF). Leurs métabolites peuvent activer une seconde classe de microorganismes spécialisés (stratégie k), en dormance, pouvant, eux, dégrader la matière organique initialement présente et stockée dans le sol : il s'agit du « priming effect » (Fontaine et al. 2003).

Ainsi, le rôle des MOF apportées par rhizodéposition dans le stockage de C à long terme est encore ambigu. L'originalité de ma thèse sur ce point réside dans l'évaluation quantitative de cet apport le long d'un profil de sol jusqu'à 4 m de profondeur. La variation de la concentration en C organique et N total dans la rhizosphère augmente avec la profondeur. Deux processus peuvent expliquer cette augmentation : (i) l'augmentation de la quantité de composés organiques libérés par les racines profondes, (i) une quantité identique de composés organiques libérés mais une différence dans leur temps de résidence au sein de la rhizosphère (temps de résidence plus long en profondeur dans notre cas). Ce dernier point dépend de conditions intrinsèques aux exsudats (facilement décomposables *vs* récalcitrants) et de conditions extrinsèques : la qualité de la communauté microbienne et sa capacité à minéraliser la MOF et la matière organique ancienne du sol (MOS) dans les conditions de la rhizosphère (« hot spot » d'activité microbienne). Certains composés exsudés par les racines ou certains métabolites issus de l'activité des bactéries peuvent s'avérer toxiques pour les microorganismes et mettre fin à un moment d'activité intense (ou « hot moment » pour reprendre le terme cité par Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015), alors même qu'il reste du C organique labile à décomposer (Kuzyakov et Blagodatskaya, 2015). L'exsudation d'anions organiques (acétate, propionate) ou simplement la diminution intense de pH mesurée en profondeur pourrait dans notre étude s'avérer comme un facteur de conservation des apports de C par inhibition des activités microbiennes. La compétition pour l'énergie et l'acquisition des éléments nutritifs, N notamment, entre les microorganismes et la plante peut également limiter la perte de C par minéralisation. La

compétition entre les microorganismes eux même, entre ceux spécialisés dans la décomposition de la matière organique fraîche (MOF) et ceux se nourrissant de la matière organique ancienne du sol (MOS) pourrait également être un facteur important de régulation du priming effect (Fontaine et al. 2003). *Une meilleure connaissance des communautés microbiennes, en termes de biomasse et de diversité mais surtout en termes de capacité métabolique dans les conditions, de pH notamment, du sol rhizosphérique in situ serait nécessaire. Une perspective consisterait également dans le traçage du C libéré par les racines* **PERSP 2***.* Pour autant, certains microorganismes clés du fonctionnement racinaire semblent s'acclimater aux conditions rhizosphériques en profondeur : les champignons ectomycorhiziens notamment, qui favoriseraient d'ailleurs le stockage du C organique dans le sol (Clemmensen 2015, Averill et Hawkes 2016).

II. Effet d'une reduction des precipitations

Le traitement –W impose un état de stress hydrique sévère pour la plante en saison sèche comme en attestent les données non publiées de biomasse aérienne de 2015 (Laclau et al.). Il faut noter que la saison sèche de 2015 (collecte 1) faisait suite à des conditions exceptionnelles de sécheresse enregistrée en 2014 : une des plus fortes sécheresses au Brésil depuis 84 ans (baisse considérable du réservoir d'eau de l'état de Sao Paulo, mortalité d'eucalyptus dans le Minas Gerais, ou le Nordeste,…). Le stress était d'autant plus grand pour le traitement réduction des pluies. Au contraire l'été 2015 a été particulièrement pluvieux, ce qui a permis de réduire considérablement le stress hydrique en traitement –W (données aériennes non publiées).

La couche de sol autour de 3 m de profondeur stocke normalement de l'eau au cours des fortes précipitations de la saison des pluies. Or ce stockage d'eau n'est pas réalisé en traitement –W (Christina et al. 2015). Donc, en saison sèche, l'eau de pluie ne s'infiltrant pas jusqu'à 3 m et la remontée de la nappe concernant seulement les horizons > 8 m, cet horizon autour de 3 m est particulièrement affecté par le traitement –W.

Les effets rhizosphériques liés au gradient de profondeur, cités précédemment (accumulation de protons, de K échangeable, de C organique et de N total dans la rhizosphère) sont apparus systématiquement exacerbés en traitement –W durant la saison sèche, particulièrement en dessous de 2 m (Figure 2). La concentration en K échangeable au sein de la rhizosphère était 7 fois supérieure à celle mesurée au sein du sol non rhizosphérique, en moyenne, entre 2 et 4 m en traitement –W, alors que le ratio était de 3 en moyenne à ces profondeurs dans le traitement +W. Les concentrations en H_3O^+ et en C organique suivaient la même tendance. L'effet traitement est gommé en saison des pluies, du moins jusqu'à la limite de 2 m imposée par le second échantillonnage. La possibilité

d'ectomycorhization est maintenue en condition de réduction des pluies, quelles que soient la saison et la profondeur (Figure 3).

A. Implication de ces résultats en termes de nutrition minérale

La très forte augmentation de K échangeable dans la rhizosphère observée en condition de stress hydrique pourrait alors être la combinaison de deux phénomènes : (1) une plus forte altération en raison d'un pH encore plus faible (en partie lié à une plus forte accumulation de C et donc probablement d'acides organiques) comparé au traitement +W et (2) un prélèvement plus faible de K par les arbres du traitement –W en condition de stress hydrique. En effet un lien étroit entre le prélèvement de K par les racines et la consommation en eau a été établi dans ces plantations d'eucalyptus (Battie-Laclau et al. 2016). La plante en condition de stress hydrique pourrait avoir une stratégie de diminution du prélèvement de K et de production de biomasse aérienne, dans le but de contrôler sa consommation en eau. *L'effet de la réduction des pluies sur la production de biomasse racinaire sera prochainement analysé grâce aux mesures minirhizotrons réalisées sur les deux traitements jusqu'à la nappe (cf annexe 2 pour illustration du dispositif). Ces résultats qui feront l'objet d'un article (Pradier*, Germon* et al.) permettront également de faire des observations d'ectomycorhizes en profondeur.* Durant la saison des pluies, nous ne retrouvons pas d'effet traitement au niveau du pH, de K échangeable, C organique et N total. Les biomasses aériennes (non publiées, Laclau) sont en cohérence avec ce résultat, ne montrant plus de différences significatives au niveau foliaire. Cet effet saison pourrait être interprété comme une capacité de résilience rapide du système suite à une sécheresse. Cependant, une répétition (nouvelle collecte en saison sèche, puis en saison des pluies) serait nécessaire pour valider l'effet saison mis en évidence.

B. Implication de ces résultats en termes de stockage du carbone dans le sol

En contexte de changement climatique, les sols sont potentiellement des puits important de CO_2 de l'atmosphère à travers le C photosynthétisé par les feuilles qui est alloué ensuite aux racines et au sol. L'effet de la modification du climat sur (1) la mortalité et la décomposition racinaire et (2) la rhizodéposition sont à étudier pour évaluer les possibilités de stockage du C organique dans le sol par les racines. Dans de nombreuses régions du globe, des sécheresses plus intenses et fréquentes sont en effet prédites dans un futur proche (Solomon et al. 2009).

Les hypothèses pour expliquer l'accumulation de C organique dans la rhizosphère plus élevée en profondeur qu'en surface sont les mêmes que celles qui permettent d'expliquer ici les différences observées entre les deux traitements :

- Quantité plus élevée de rhizodépôts
- Rhizodépôts plus récalcitrants
- Microorganismes moins aptes à décomposer la matière organique en condition hydrique limitante (acidité, humidité)

L'humidité du sol non rhizosphérique peut être <5%, et pourtant la racine ne meurt pas et continue à fonctionner comme en attestent les modifications rhizosphériques induites et la présence d'ectomycorhizes. Les racines d'eucalyptus très profondes sont capables de prélever l'eau de la nappe à 17 m (Christina et al. 2011). Pendant la nuit, la redistribution d'une partie de l'eau collectée dans les zones humides vers les zones les plus sèches du sol (« hydraulic lift » Sholtz et al. 2010) pourrait ainsi participer à l'humidification du milieu rhizosphérique permettant ainsi de conserver une activité racinaire et une activité microbienne très localisée. *La mesure de l'humidité du sol rhizosphérique aurait été une donnée particulièrement intéressante à recueillir. Cependant, lors de l'échantillonnage en profondeur l'atmosphère chaude et sèche impacte instantanément les quelques milligrammes de sol rhizosphérique collectés autour d'une racine. Il est ainsi très difficile de faire une mesure d'humidité fiable du sol rhizosphérique. Le développement d'une optode H_2O (ou d'un autre type de sonde non invasive) pourrait être une perspective. D'autre part, comme dans le cas de l'effet profondeur, il est nécessaire d'obtenir des informations sur les communautés bactériennes en conditions hydriques limitantes* **PERSP 2***.*

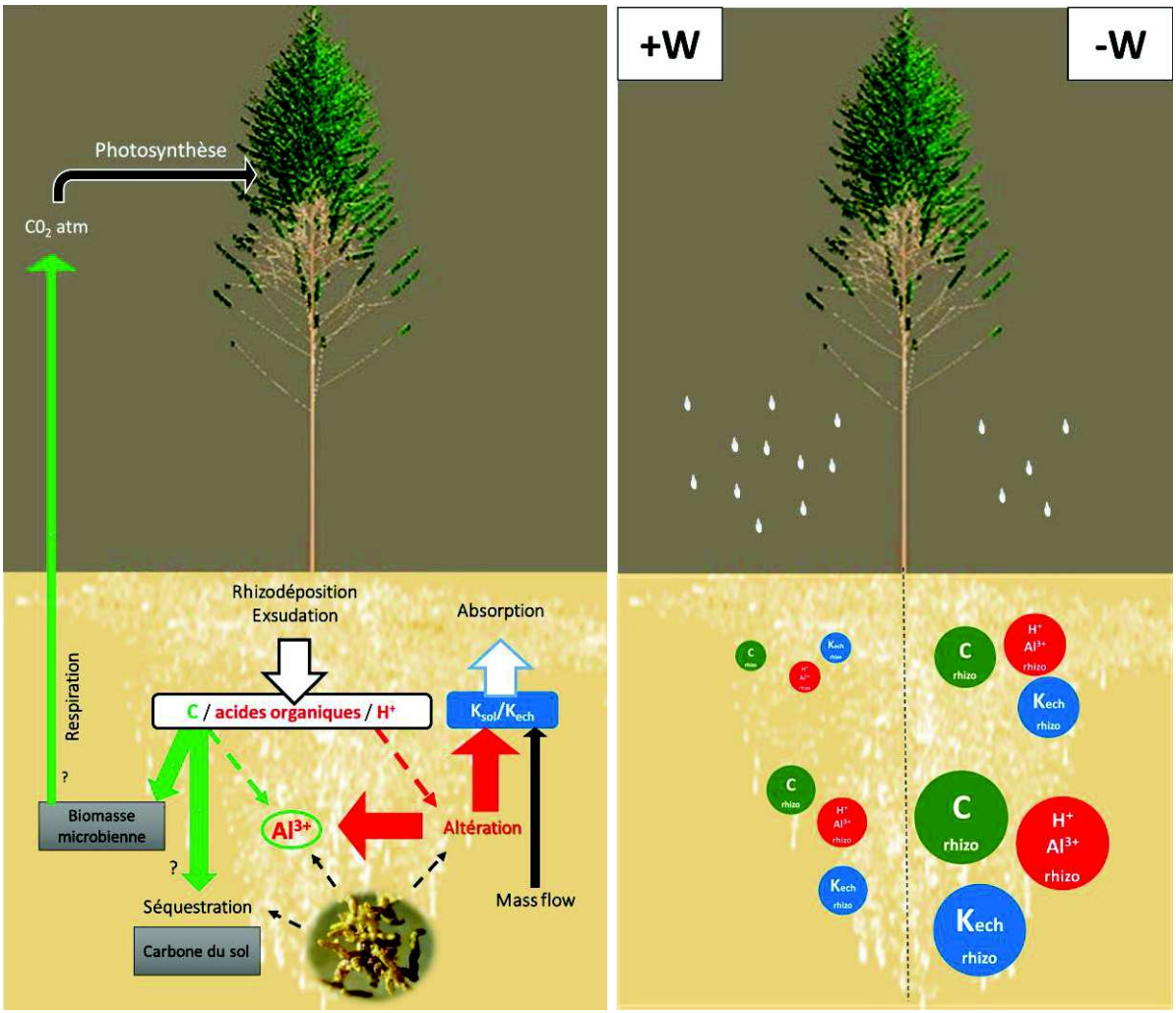


Figure 1 : Gauche : schéma récapitulatif des mécanismes *rhizosphériques* étudiés dans la thèse (les flèches en pointillés indiquent une influence sur un phénomène, les flèches pleines indiquent des transports/apports). Droite : représentation conceptuelle de l'influence de la profondeur et de la réduction des précipitations sur le C organique mesuré dans la rhizosphère (vert), la concentration en protons et en Al^{3+} mesurée dans la rhizosphère (rouge), ainsi que la concentration en K_{ech} mesurée dans la rhizosphère (bleu). *Note : l'échelle de taille des ronds n'est pas respectée. L'idée est simplement de visualiser les tendances entre surface (0.2-1m) et profondeur (1-4) et traitements +W et –W (en saison sèche).*

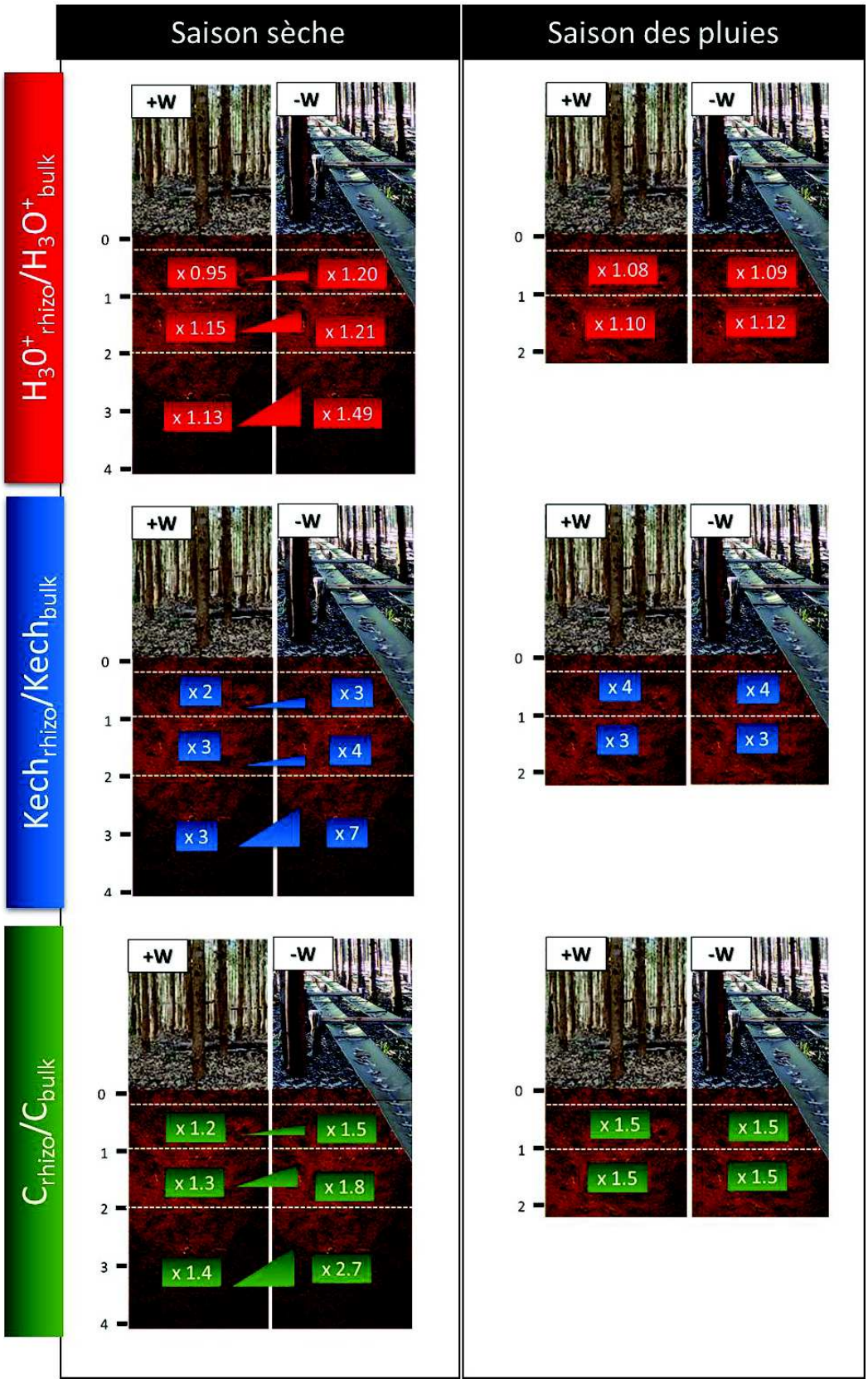


Figure 2 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans la thèse. Ratios $H_3O^+_{rhizo}/H_3O^+_{bulk}$,, $Kech_{rhizo}/Kech_{bulk}$, C_{rhizo}/C_{bulk} obtenus en fonction de la profondeur (0.2-1 / 1-2 / 2-4 m), du traitement (+W / –W) et de la saison (saison sèche/ saison des pluies).

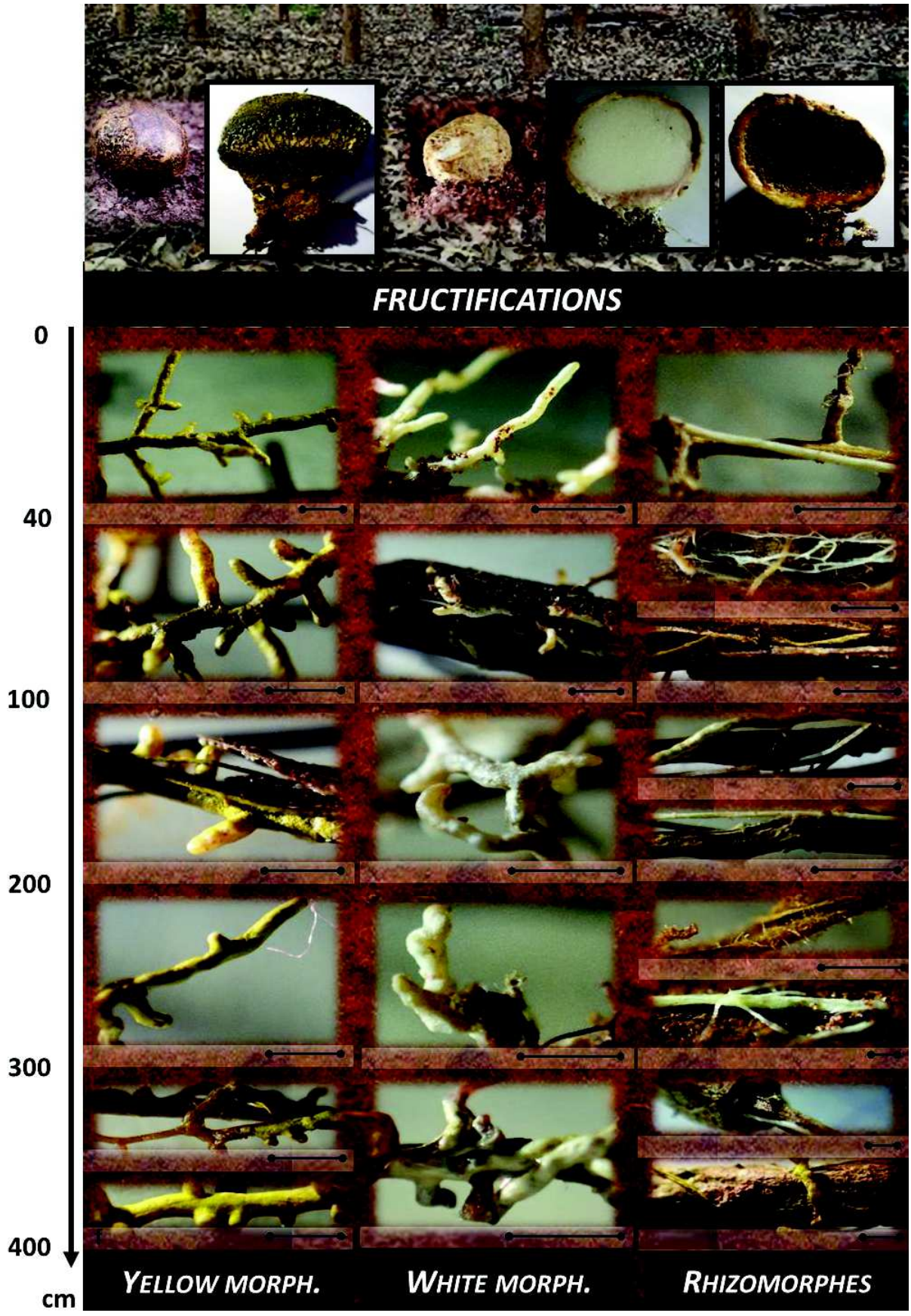


Figure 3 : Planche photo des morphotypes ectomycorhiziens et de leurs fructifications qui sera intégrée dans l'article cité chapitre 3. Barres d'échelles = 1mm.

Perspectives

PERSP 1 : ANALYSE MOLECULAIRE DES MYCORHIZES LE LONG D'UN PROFIL VERTICAL DE 4 M

Des PCR ont été réalisées sur des extraits d'ADN à partir de deux compartiments collectés le long du gradient de profondeur le long du profil de 4 m : un compartiment « apex isolés » (correspondant aux morphotypes jaunes et aux morphotypes blancs des ectomycorhizes) et un compartiment « racines fines » ont été analysés. Les observations de racines réalisées sur le terrain n'ont pas permis de rechercher des apex ectomycorhizés moins « visibles » que ceux correspondant aux deux morphotypes principaux collectés par des observations à l'œil nu. Une analyse moléculaire sans *a priori* à partir d'extraits d'ADN de racines fines permettra d'identifier si d'autres morphotypes minoritaires étaient également présents.

Compte tenu de la faible diversité de morphotypes observés, la résolution taxonomique de la caractérisation moléculaire a été augmentée en utilisant deux couples d'amorces pour amplifier l'ADN des champignons ectomycorhiziens (ciblant les régions ITS1 et ITS2). Il s'agira de décrire d'une façon fine la diversité intra-population à l'intérieur des deux principaux genres suspectés sur la base des observations des apex ectomycorhizés et des fructifications présentes sur la plantation.

Des amorces spécifiques du phylum des Gloméromycètes (mycorhizes à arbuscules, AMF) ont également été appliquées au compartiment « racines fines ». Les amplifications se sont montrées très aléatoires en fonction des échantillons, avec une très faible amplification dans le cas des réactions de PCR positives, rendant difficile l'approche de séquençage. Ce résultat confirme les observations d'AMF après coloration des racines, qui indiquent la présence de mycélium et de vésicules mais en faible quantité, semblant suggérer qu'au moment de l'échantillonnage, la symbiose ectomycorhizienne était la symbiose dominante et fonctionnelle.

La caractérisation moléculaire des champignons ectomycorhiziens le long du gradient de profondeur est actuellement en cours (séquençage haut débit, utilisation de la technologie Mi-Seq) sur la Plateforme GeT-PlaGe (GenoToul) de l'INRA de Toulouse. Les analyses bio-informatiques seront réalisées en collaboration avec Hervé Sanguin et Frédéric Mahé du LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes), CIRAD, Montpellier.

→ *Les résultats de séquençage permettront de compléter les observations présentées dans le chapitre 3 et feront l'objet de la soumission d'un article (Pradier, Robin et al.) début 2017, intégrant la description morphologique des apex ectomycorhiziens (planche photo présentée en annexe).*

PERSP 2 : ETUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES A L'ECHELLE DE LA RHIZOSPHERE, EN PROFONDEUR ET EN CONDITION DE SECHERESSE

RESPIRATION MICROBIENNE SUR SOL RHIZOSPHERIQUE PROFOND

En perspective immédiate à la thèse, sont prévues des mesures de respiration microbienne (avec différents substrats organiques, selon l'approche MicroResp™) sur les sols rhizosphériques et non rhizosphériques issus de la collecte 1 jusqu'à 4 mètres (+W et –W). Nous pourrons alors affirmer ou nuancer l'hypothèse d'une baisse importante notamment de l'activité microbienne et fongique en profondeur et en réduction des pluies et avoir plus d'éléments pour discuter du risque de minéralisation du C organique issu de la rhizodéposition.

→ *Prévision de la manip en 2017. Les résultats viendront compléter l'ébauche d'article présenté dans le chapitre 5 pour une soumission fin 2017.*

ANALYSES MOLECULAIRES SUR SOL RHIZOSPHERIQUE PROFOND

En continuité à la thèse, une analyse moléculaire des sols rhizosphériques et non rhizosphériques collectés jusqu'à 4m (+W et –W) et ayant été congelés directement après récolte, est envisagée. Cette analyse permettrait d'identifier les espèces présentes en profondeur et d'évaluer la chute soupçonnée de diversité et d'abondance.

PERSP 3 : VERS L'IDENTIFICATION DES EXSUDATS RACINAIRES

L'identification des molécules organiques à faibles poids moléculaire exsudées par les racines le long d'un profil de sol permettrait de déceler d'éventuelles différences entre surface et profondeur et régimes hydriques contrastés. Une collecte d'exsudats racinaire a été tentée durant la thèse par deux techniques : collecte de la solution de sol rhizosphérique à l'aide de micro-collecteurs appelés Rhizon© (http://www.rhizosphere.com/microrhizons) et collecte de l'exsudation potentielle de racines suivant le protocole adapté de Phillips et al. (2008) et Michalet et al. (2013). Les essais utilisant cette seconde technique sont illustrés en Annexe 3. La faible densité racinaire, la fragilité des racines fines et, dans le cas des micro-collecteurs, la très faible humidité du sol, n'ont pas permis d'obtenir de résultats exploitables. Une perspective plus simple pour débuter sur l'identification des molécules organiques de la rhizosphère *in situ* et en profondeur serait d'adapter le protocole proposé par Waithaisong et al. (2015) i.e., travailler à partir des sols rhizosphériques collectés.

PERSP 4 : VERS UNE ETUDE APPROFONDIE DE LA MINERALOGIE

Afin de renforcer l'hypothèse de la fourniture possible d'une quantité significative de K par altération d'un sol tropical altéré, deux approches peuvent être envisagées :

1. L'établissement d'isothermes d'adsorption du K selon le protocole proposé par Fontaine et al. (1989) permettrait d'évaluer la capacité du sol à échanger sélectivement du K (présence de feuillets 2 :1).
2. L'extraction des fractions les plus fines de la phase argileuse (0.2-0.02 et <0.05 micromètres) et la modélisation des diffractogrammes de rayons X correspondants (Viennet et al. 2015), pourrait éventuellement permettre de détecter et quantifier directement des minéraux argileux comportant une proportion de feuillets 2:1, et pouvant donc abriter du K interfoliaire.

Dans les deux cas, une comparaison entre la minéralogie de la rhizosphère et celle du sol non rhizosphérique permettrait de mieux comprendre l'impact des racines sur l'altération.

PERSP 5 : DEVENIR DU CARBONE ISSU DE LA RHIZODEPOSITION

Une expérience de « pulse-labelling » permettrait de mieux comprendre le devenir du C issu de la rhizodéposition (Epron et al. 2011, 2012). Ce marquage est cependant lourd à mettre en place *in situ* mais pas impossible à réaliser.

Le ratio $^{13}C/^{12}C$ du carbone issu des plantes de cycle photosynthétique en C4 est différent de celui des plantes en C3. Ainsi, une parcelle ayant subi une succession connue de plantes C4 à C3 par exemple (savane → eucalyptus) est un système particulièrement intéressant pour évaluer la persistance du carbone émis par les racines de la végétation passée qui peut ainsi être distingué du C émis par les racines des plantes actuelles (Choi et al. 2001). Un tel dispositif existe au Brésil où des eucalyptus ont été plantées suite à un pâturage de Braccharia (poacée en C4) et offre un potentiel intéressant (dispositif de Lobo mis en place par l'UMR Eco&Sols).

Conclusion

Cette étude nous a appris que les racines fines sont capables de fonctionner et de créer des symbioses mycorhiziennes en profondeur. Ces racines fines profondes semblent fonctionner différemment des racines de surface dans des conditions hydriques peu limitantes pour la plante. Ces différences sont exacerbées lorsque la plante se trouve en condition de stress hydrique. L'altération semble alors être favorisée par une acidification plus intense induite par l'activité racinaire (absorption et rhizodéposition), menant à une forte accumulation de potassium échangeable dans la rhizosphère. L'accumulation de carbone organique est également favorisée dans la rhizosphère en profondeur en conditions de stress hydrique. Les perspectives se tournent notamment vers l'étude plus fine de la minéralogie et vers l'étude du devenir du carbone issu de la rhizodéposition.

La nécessité de prendre en compte la profondeur s'est imposée récemment dans l'évaluation des stocks de carbone du sol (Fontaine et al. 2007, Rumpel and Koegel-Knabner 2011, Kell 2011, Mathieu et al. 2015, Callesen et al. 2016, Guan et al. 2016), et notre étude confirme que l'essentiel des stocks de carbone peuvent se trouver sous le premier mètre de sol. Pourtant l'IPCC et beaucoup d'autres études continuent à se fonder sur les 30 premiers centimètres de sol. D'autre part, de manière générale l'effet « profondeur » n'est pas systématiquement corrélé à l'effet « rhizosphère » qui est pourtant encore plus nécessaire à prendre en compte en profondeur en raison de la très forte dilution de ces « hotspots » d'activité microbienne, représentant moins de 5% sous 1 mètre (Pradier et al. *in revision*, chapitre 2, Article 1). Ceci semble particulièrement capital concernant l'écologie microbienne des sols, en particulier des horizons profonds qui n'ont quasiment jamais été étudiés sur ce plan. Une difficulté supplémentaire mais nécessaire serait également d'ajouter la notion de variation temporelle dans l'étude des processus *in situ* du sol. Ceci implique de pouvoir mesurer des flux et non pas seulement des concentrations, des turnovers et non pas des stocks, de manière générale des propriétés « dynamiques » et non « statiques ». Les optodes permettent cette approche spatiale et temporelle et sont donc particulièrement prometteuses. Le dispositif de fosse permanente et d'installation de rhizotrons mis en place au Brésil (chapitre 1) reste, par ailleurs, une méthodologie prometteuse pour l'étude du milieu rhizosphérique *in situ* et en profondeur dans le futur.

Ma thèse a permis d'apporter une petite pierre à l'édifice des connaissances actuelles concernant les mécanismes qui régissent la nutrition des arbres en sols pauvres en nutriments et en situation hydrique limitante en incluant spécifiquement le rôle des racines fines profondes. Cependant, il reste encore énormément de choses à découvrir quant au fonctionnement de ces racines fines profondes et à leur

contribution à la survie des arbres face aux sécheresses prédites. Les futures découvertes passeront certainement par des innovations méthodologiques et, assurément, par beaucoup de persévérance.

Références

Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. Mycorrhiza 11:107–114. doi: 10.1007/s005720100108

Averill C, Hawkes CV (2016) Ectomycorrhizal fungi slow soil carbon cycling. Ecol Lett 19:937–947. doi: 10.1111/ele.12631

Battie-Laclau P, Delgado-Rojas JS, Christina M, et al. (2016) Potassium fertilization increases water-use efficiency for stem biomass production without affecting intrinsic water-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. For Ecol Manag 364:77–89. doi: 10.1016/j.foreco.2016.01.004

Becquer A, Trap J, Irshad U, et al. (2014) From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. Front Plant Sci 5:548. doi: 10.3389/fpls.2014.00548

Callesen I, Harrison R, Stupak I, et al. (2016) Carbon storage and nutrient mobilization from soil minerals by deep roots and rhizospheres. For Ecol Manag 359:322–331. doi: 10.1016/j.foreco.2015.08.019

Calvaruso C, Collignon C, Kies A, Turpault M-P (2014) Seasonal Evolution of the Rhizosphere Effect on Major and Trace Elements in Soil Solutions of Norway Spruce (<i>Picea abies Karst</i>) and Beech (<i>Fagus sylvatica</i>) in an Acidic Forest Soil. Open J Soil Sci 4:323–336. doi: 10.4236/ojss.2014.49034

Casarin V, Plassard C, Souche G, Arvieu JC (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. Agronomie 23:461–469.

Choi Y, Wang Y, Hsieh Y-P, Robinson L (2001) Vegetation succession and carbon sequestration in a coastal wetland in northwest Florida: Evidence from carbon isotopes. Glob Biogeochem Cycles 15:311–319. doi: 10.1029/2000GB001308

Christina M, Laclau JP, Goncalves JLM, et al. (2011) Almost symmetrical vertical growth rates above and below ground in one of the world's most productive forests. Ecosphere 2:2710.

Christina M, Le Maire G, Battie-Laclau P, et al. (2015) Measured and modeled interactive effects of potassium deficiency and water deficit on gross primary productivity and light-use efficiency in Eucalyptus grandis plantations. Glob Change Biol 21:2022–2039. doi: 10.1111/gcb.12817

Clegg S, Gobran GR (1997) Rhizospheric P and K in forest soil manipulated with ammonium sulfate and water. Can J Soil Sci 77:525–533.

Clemmensen KE, Finlay RD, Dahlberg A, et al. (2015) Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long-term succession in boreal forests. New Phytol 205:1525–1536. doi: 10.1111/nph.13208

Darunsontaya T, Suddhiprakarn A, Kheoruenromne I, et al. (2012) The forms and availability to plants of soil potassium as related to mineralogy for upland Oxisols and Ultisols from Thailand. Geoderma 170:11–24. doi: 10.1016/j.geoderma.2011.10.002

Epron D, Bahn M, Derrien D, et al. (2012) Pulse-labelling trees to study carbon allocation dynamics: a review of methods, current knowledge and future prospects. Tree Physiol 32:776–798. doi: 10.1093/treephys/tps057

Epron D, Laclau J-P, Almeida JCR, et al. (2011) Do changes in carbon allocation account for the growth response to potassium and sodium applications in tropical Eucalyptus plantations? Tree Physiol tpr107. doi: 10.1093/treephys/tpr107

Fontaine S, Barot S, Barre P, et al. (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. Nature 450:277-U10. doi: 10.1038/nature06275

Fontaine S, Delvaux B, Dufey JE, Herbillon AJ (1989) Potassium exchange behaviour in Carribean volcanic ash soils under banana cultivation. Plant Soil 120:283–290.

Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L (2003) The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? Soil Biol Biochem 35:837–843. doi: 10.1016/S0038-0717(03)00123-8

Guan X-K, Turner NC, Song L, et al. (2016) Soil carbon sequestration by three perennial legume pastures is greater in deeper soil layers than in the surface soil. Biogeosciences 13:527–534. doi: 10.5194/bg-13-527-2016

Hinsinger P, Elsass F, Jaillard B, Robert M (1993) Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. J Soil Sci 44:535–545. doi: 10.1111/j.1365-2389.1993.tb00475.x

Hinsinger P, Plassard C, Tang CaiXian, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. (Special issue: Structure and functioning of cluster roots and plant responses to phosphate deficiency). Plant Soil 248:43–59.

Hoffland E (1992) Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilization of rock phosphate by rape. Plant Soil 140:279–289.

Kell DB (2011) Breeding crop plants with deep roots: their role in sustainable carbon, nutrient and water sequestration. Ann Bot mcr175. doi: 10.1093/aob/mcr175

Khalvati MA, Hu Y, Mozafar A, Schmidhalter U (2005) Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. Plant Biol 7:706–712. doi: 10.1055/s-2005-872893

Kuzyakov Y, Blagodatskaya E (2015) Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. Soil Biol Biochem 83:184–199. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.025

Laclau J-P, da Silva EA, Rodrigues Lambais G, et al. (2013) Dynamics of soil exploration by fine roots down to a depth of 10 m throughout the entire rotation in Eucalyptus grandis plantations. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2013.00243

Laclau J-P, Ranger J, de Moraes Gonçalves JL, et al. (2010) Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations. For Ecol Manag 259:1771–1785. doi: 10.1016/j.foreco.2009.06.010

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, Second edition.

Mathieu JA, Hatté C, Balesdent J, Parent É (2015) Deep soil carbon dynamics are driven more by soil type than by climate: a worldwide meta-analysis of radiocarbon profiles. Glob Change Biol 21:4278–4292. doi: 10.1111/gcb.13012

Melo VF, Schaefer CEGR, Novais RF, et al. (2002) Potassium and magnesium in clay minerals of some Brazilian soils as indicated by A sequential extraction procedure. Commun Soil Sci Plant Anal 33:2203–2225. doi: 10.1081/CSS-120005757

Mengel K, Kirkby EA (1987) Principles of Plant Nutrition - Springer.

Michalet S, Rohr J, Warshan D, et al. (2013) Phytochemical analysis of mature tree root exudates in situ and their role in shaping soil microbial communities in relation to tree N-acquisition strategy. Plant Physiol Biochem 72:169–177. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.003

Miyasaka S, Buta J, Howell R, Foy C (1991) Mechanism of Aluminum Tolerance in Snapbeans - Root Exudation of Citric-Acid. Plant Physiol 96:737–743. doi: 10.1104/pp.96.3.737

Paola A, Pierre B, Vincenza C, et al. (2016) Short term clay mineral release and re-capture of potassium in a Zea mays field experiment. Geoderma 264, Part A:54–60. doi: 10.1016/j.geoderma.2015.10.005

Phillips RP, Erlitz Y, Bier R, Bernhardt ES (2008) New approach for capturing soluble root exudates in forest soils. Funct Ecol 22:990–999. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01495.x

Plassard C, Guérin-Laguette A, Véry A-A, et al. (2002) Local measurements of nitrate and potassium fluxes along roots of maritime pine. Effects of ectomycorrhizal symbiosis. Plant Cell Environ 25:75–84. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00810.x

Pradier C*, Germon A*, Laclau JP, Hinsinger P, Guerrini IA, Jourdan C (in prep.) Impact on rainfall reduction on fine root turnover until 17m-depth in Eucalypts grown in a deep Ferralsol in Brazil.

Pradier C*, Robin A*, Mahé F, Sanguin H, Lambais GR, Prudêncio de Araujo Pereira A, Péron Gomide M, Bouillet JP, Dini Androte F, Plassard C, Jurandy Bran Nogueira Cardoso E, Laclau JP, Hinsinger P, Jourdan C (in prep.) First evidence for ectomycorrhizae associated with deep fine roots of Eucalypt in Brazil: new insight in microbial ecology within depth.

Rumpel C, Koegel-Knabner I (2011) Deep soil organic matter-a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. Plant Soil 338:143–158. doi: 10.1007/s11104-010-0391-5

Scholz FG, Bucci SJ, Hoffmann WA, et al. (2010) Hydraulic lift in a Neotropical savanna: Experimental manipulation and model simulations. Agric For Meteorol 150:629–639. doi: 10.1016/j.agrformet.2010.02.001

Solomon S, Plattner G-K, Knutti R, Friedlingstein P (2009) Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. Proc Natl Acad Sci 106:1704–1709. doi: 10.1073/pnas.0812721106

Turpault M-P, Gobran GR, Bonnaud P (2007) Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. Geoderma 137:490–496. doi: 10.1016/j.geoderma.2006.10.005

Turpault MP, Uterano C, Boudot JP, Ranger J (2005) Influence of mature Douglas fir roots on the solid soil phase of the rhizosphere and its solution chemistry. Plant Soil 275:327–336. doi: 10.1007/s11104-005-2584-x

Viennet J-C, Hubert F, Ferrage E, et al. (2015) Investigation of clay mineralogy in a temperate acidic soil of a forest using X-ray diffraction profile modeling: Beyond the HIS and HIV description. Geoderma 241:75–86. doi: 10.1016/j.geoderma.2014.11.004

Waithaisong K, Robin A, Martin A, et al. (2015) Quantification of organic P and low-molecular-weight organic acids in ferralsol soil extracts by ion chromatography. Geoderma 257–258:94–101. doi: 10.1016/j.geoderma.2014.12.024

West A, Galy A, Bickle M (2005) Tectonic and climatic controls on silicate weathering. Earth Planet Sci Lett 235:211–228. doi: 10.1016/j.epsl.2005.03.020

Annexes

Annexe 1 : Méthodologie de collecte de sol rhizosphérique et non rhizosphérique (bulksoil) et des racines fines en profondeur

Excavation

1. Excavation du sol par répétitions;
2. passage du sol dans une brouette en le remaniant le moins possible.

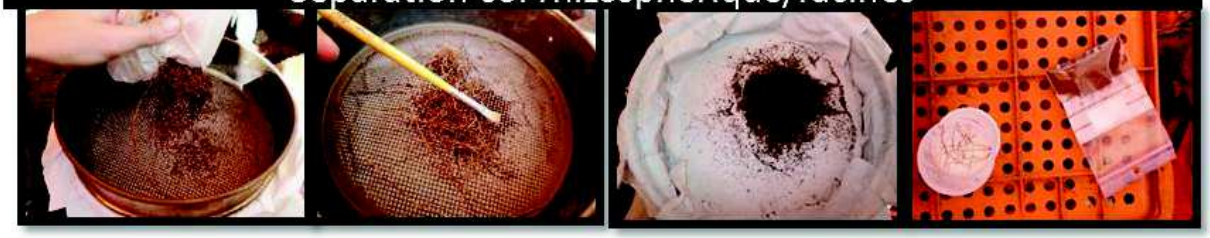
Collecte bulk soil

Sur la paroi des fosses, élimination des premiers centimètres de sol; collecte àl'aide d'un tube.

Collecte racines + rhizosphère

Recherche et collecte des racines fines et de leur rhizosphère EN EVITANT de remanier le sol

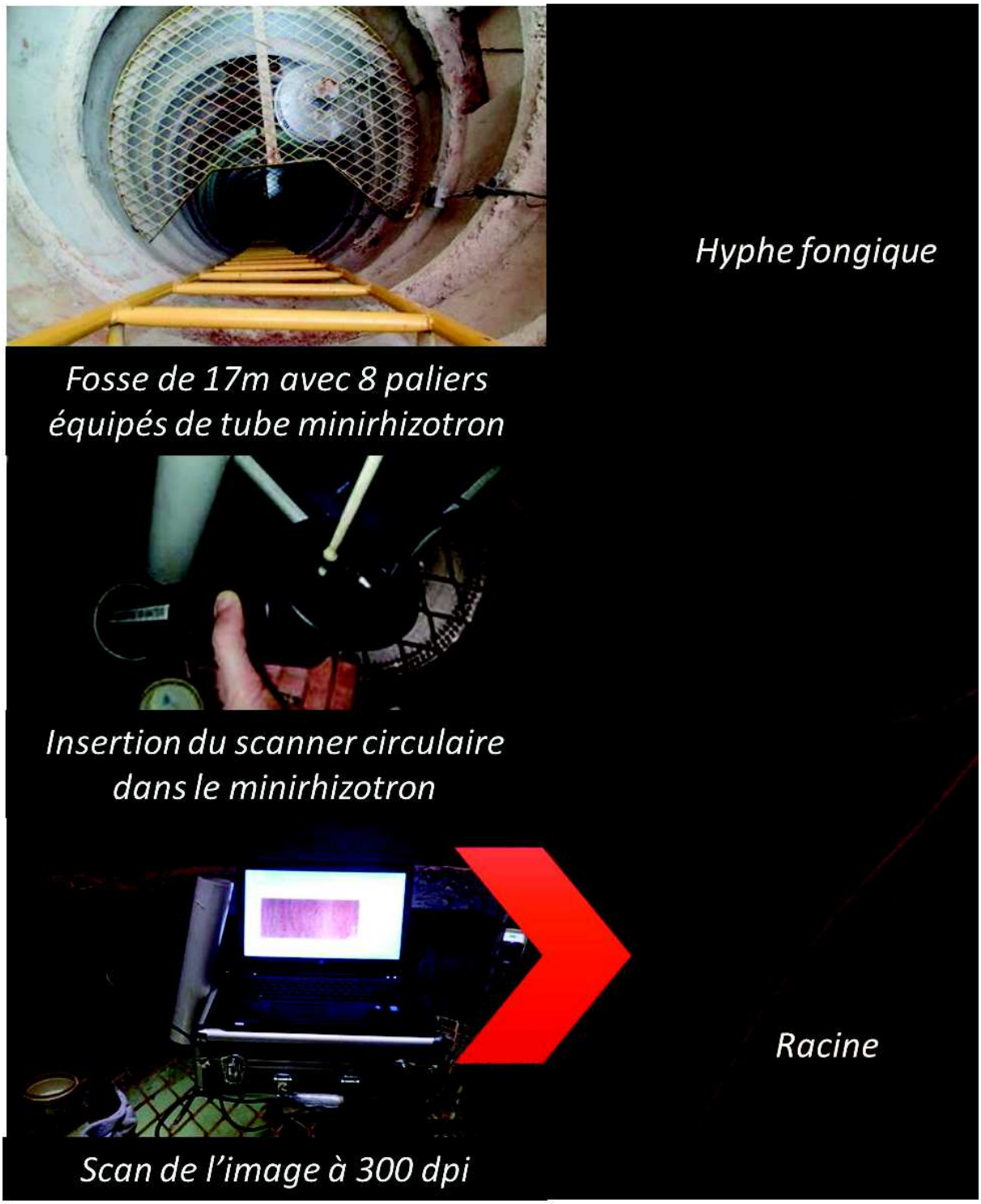
Séparation sol rhizosphérique/racines



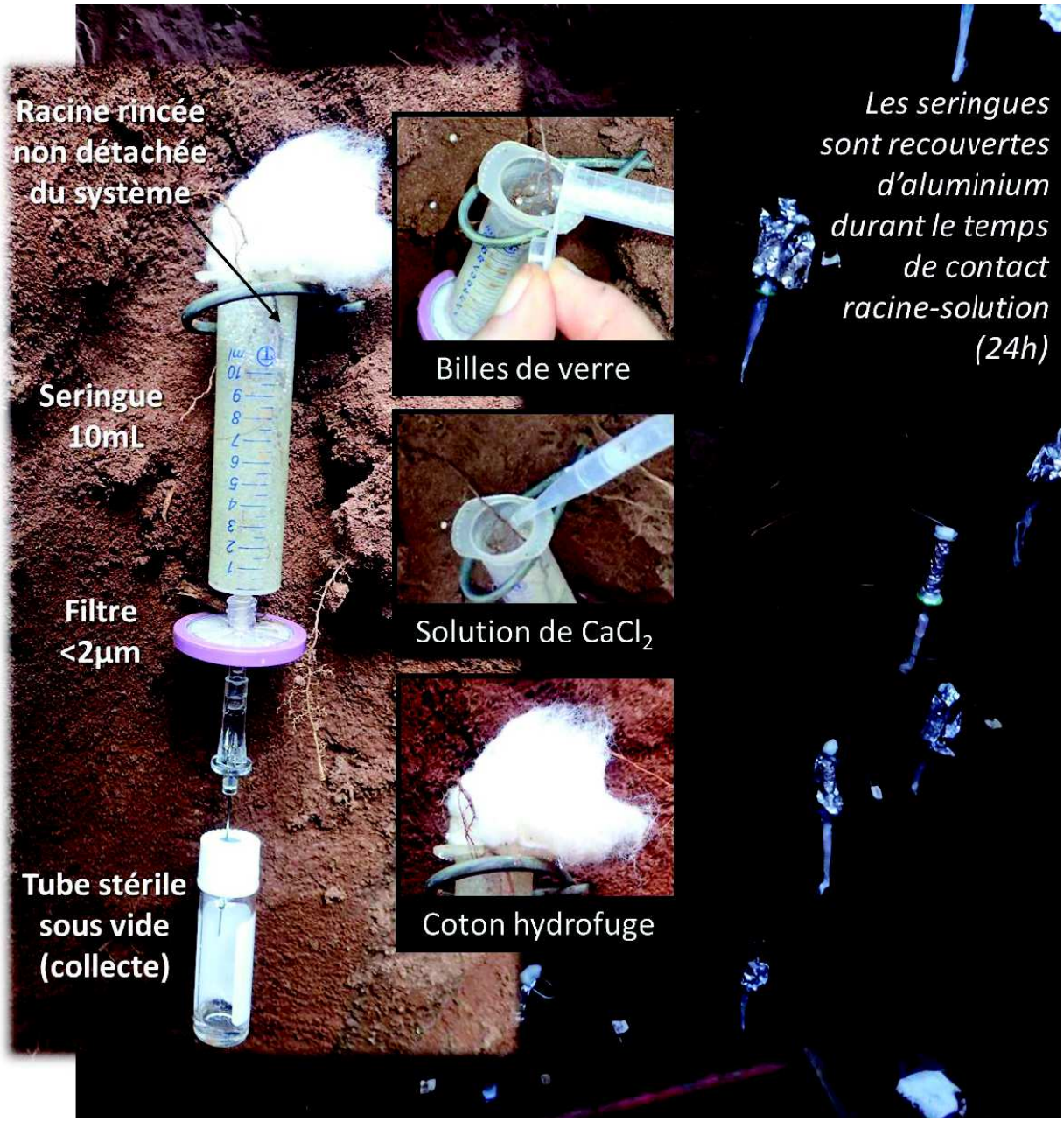
1. Verser le sac de racines sur un tamis 2mm ; 2. au pinceau, détacher le sol rhizosphérique des racines; 3. récupérer le sol rhizosphérique sur le sond du tamis; 4. conserver les racines dans l'eau à 4°C.

5. Séchage sol et lavage/séchage/congélation racines

Annexe 2 : Illustration des mesures minirhizotrons en fosses profondes (Scanner circulaire : CI-600 Root Growth Monitoring System, CID, USA ; Logiciel de capture des images : CI-600 In-Situ Root Imager).



Annexe 3 : Illustration d'une des stratégies mise en place pour la collecte in situ et en profondeur, des exsudats racinaires selon la méthodologie adaptée de Michalet et al. (2013).



Résumé :

Face à une demande mondiale en bois en constante augmentation, les forêts plantées sont en rapide expansion, notamment au Brésil où les plantations d'eucalyptus pourraient couvrir 10 millions d'hectares d'ici 2020. Ces plantations hautement productives soulèvent des questions importantes au niveau (i) de leur **durabilité** dans un contexte de changement climatique et (i) de leur **impact sur l'environnement**, en particulier sur les cycles de l'eau, du carbone et des nutriments. La capacité des eucalyptus à développer un système racinaire très profond (jusqu'à 15 m, voire plus) pour atteindre la nappe phréatique, pourrait jouer un rôle clé dans l'adaptation à des disponibilités plus faibles en eau. Cependant, **le rôle de ces racines fines profondes dans la nutrition des plantes a jusque-là été extrêmement peu documenté.**

Dans ce contexte**, l'objectif général de cette thèse était d'évaluer l'influence de la profondeur et de la disponibilité de l'eau sur le fonctionnement des racines fines à travers l'étude de la rhizosphère.** Pour cela, une plantation clonale d'*Eucalyptus grandis* de 5 ans a été étudiée au Brésil sous deux régimes hydriques contrastés : un traitement + W, recevant une pluviométrie normale a été comparé à un traitement –W dans lequel 37% des pluviolessivats sont exclus. Des essais ont été réalisés dans le but d'appliquer une technologie de laboratoire innovante au champ : les optodes, permettant la cartographie du pH rhizosphérique notamment. Les rhizodepôts libérés par les racines fines d'eucalyptus interférant avec le signal du capteur optique, nous n'avons pas pu obtenir de résultats interprétables. Cependant, des tests réalisés sur le pin nous laissent confiants quant à la possibilité d'utiliser ce système, en suivant quelques recommandations. Des analyses destructives ont été réalisées sur du sol rhizosphérique et non-rhizosphérique échantillonnés le long de profils de 2 à 4 m.

Au niveau de la nutrition : une accumulation de potassium et de protons au sein de la rhizosphère a été observée, en particulier en dessous d'1 m (x3,0 et x1,1 pour K et H_3O^+ en + W, respectivement) et en condition de réduction des précipitations (x7,0 et x1,4 pour K et H_3O^+ en –W, respectivement). La répétition de ces mesures pendant la saison des pluies a confirmé l'enrichissement en protons et en K dans la rhizosphère, ce qui suggère que ces processus se produisent tout au long de l'année. Cependant, l'absence d'effet traitement durant la saison des pluies indique une bonne résilience potentielle du système. La quantité de K amenée à la surface des racines fines par flux de masse, estimée à 2 kg de K ha^{-1} an^{-1}, ne permet pas d'expliquer la quantité de potassium absorbée par les arbres, estimée à 17,5 kg de K ha^{-1} an^{-1}, ni l'accumulation observée dans la rhizosphère. Une explication plus probable est l'altération des minéraux potassiques induite par le fonctionnement racinaire, et notamment l'acidification. La mise en évidence d'associations ectomycorhiziennes jusqu'à 4 m de profondeur renforce l'hypothèse d'un rôle clé des racines fines profondes dans la nutrition des plantes. Une concentration élevée en Al^{3+} a aussi été mesurée au sein de la rhizosphère (jusqu'à 12 mg kg^{-1}). **Au niveau du stockage du carbone** : malgré la diminution exponentielle attendue de la concentration en C et N avec la profondeur (de 0,72 à 0,12 ‰ entre 0 et 4 m), nos résultats ont montré que plus de la moitié du stock de carbone contenu dans le sol non rhizosphérique était situé en dessous d'1 m. Une accumulation de C dans la rhizosphère a été mesurée, en particulier en profondeur (x1,4 en dessous d'1 m en + W) et en condition de réduction des pluies (x3,0 à 4 m en –W). Les mêmes tendances ont été observées pour N. L'effet rhizosphérique a été conservé pendant la saison des pluies, mais pas l'effet du traitement. **Ce travail a confirmé que les racines fines profondes jouent un rôle clé, pour la nutrition des plantes et le stockage de carbone, en contexte de changement climatique particulièrement**

Abstract:

Due to the constant increase of the world demand for wood, the planted forests are in fast expansion notably in tropical countries such as Brazil where plantations of eucalypts, the most productive and spread out planted species, may reach 10 million ha by 2020. The expansion of these plantations on less fertile sites, combined with the context of climate change lead to important **issues about (i) the sustainability of these plantations under more frequent and intense drought events and (i) the impact on the environment of these highly productive plantations** with very short rotations (6 yr), particularly for the nutrient, water and carbon cycles. Eucalypt trees are able to develop very deep root system (down to 15 m or more) to reach the water table, and this may play a key role to cope with decreasing soil water availability. However, the role of these deep fine roots in plant nutrition is dramatically under-documented.

In this context, **the general objective of this study was to evaluate the influence of soil depth combined with water availability on fine root functioning through characterizing rhizosphere properties.** For this purpose, a 5-yr-old clonal *Eucalyptus grandis* plantation was studied in Brazil in two contrasted water regimes: the +W treatment, receiving normal rainfall was compared with the –W treatment where 37% of the throughfall were excluded in order to mimick the future climate forecasted in the region. Exploratory tests were carried out for the introduction of an innovative lab technology under field conditions: the optodes, which allow mapping rhizosphere pH. The rhizodeposits of eucalypt fine roots interfered with the optical sensor signal and prevented us to get interpretable results. However, some tests on pine trees let us confident of the possibility of using our system for field studies at depth, using some recommendations. Destructive analyses of rhizosphere and bulk soil samples collected along 2-m to 4-m deep soil profiles showed an effect of depth and rainfall reduction on rhizosphere pH, potassium concentration, rhizodeposition pattern and carbon storage capacity.

Concerning nutrition issues, we found an accumulation of potassium and protons within the rhizosphere, especially below 1-m depth (x3.0 and x1.1 for K and H_3O^+ in +W, respectively) and in reduced rainfall conditions (x7.0 and x1.4 for K and H_3O^+ in –W, respectively). Repeating these measurements during the rainy season confirmed the enrichment of protons and potassium within the rhizosphere, suggesting that these processes may occur all along the year but no treatment effect was observed anymore, pointing to a potential good resilience of the system. The amount of K brought to fine roots by mass flow was estimated to 2.0 kg K ha^{-1} yr^{-1} and could not explain the amount of K taken up by trees estimated to 17.5 kg K ha^{-1} yr^{-1} and the observed accumulation in the rhizosphere. A more likely explanation was the root-induced weathering of K-bearing minerals, partly related to rhizosphere acidification. Evidence of ectomycorrhizal association down to 4-m depth further supported the hypothesis of a key role of deep fine roots in plant nutrition. High exchangeable Al^{3+} concentration was found within the rhizosphere (up to 12.0 mg kg^{-1}). **Concerning the carbon storage issue**, despite an expected exponential decrease of C and N concentrations in the bulk soil with depth (0.72‰ to 0.12‰ from top soil to 4-m depth), our results showed that more than half of the soil C stock in the bulk soil occurred below the first meter. An accumulation of C was found in the rhizosphere, especially at depth (x1.4 below 1 m in +W) and in reduced rainfall conditions (x3.0 at 4-m depth in –W). The same trends were found for N. The rhizosphere effect was conserved during the rainy season but not the treatment effect. **This work confirmed that deep fine roots play a key role, especially in the context of climate change, for plant nutrition and carbon storage.**