

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Ecologie Fonctionnelle

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

UMR Eco&Sols

Contribution des racines aux stocks de carbone dans le
profil de sol de deux systèmes agroforestiers contrastés :
distribution, décomposition et impact sur la
minéralisation du carbone et des nutriments

Présentée par Lorène SIEGWART
Le 03 Mai 2023

Sous la direction de Isabelle BERTRAND
et de Christophe JOURDAN

Devant le jury composé de

Catherine PICON-COCHARD, Directrice de recherche, INRAE
Valérie VIAUD, Directrice de recherche, INRAE
Florian FORT, Maître de conférences, L'institut Agro Montpellier
Samuel ABIVEN, Professeur, ENS
Isabelle BERTRAND, Directrice de recherche, INRAE
Christophe JOURDAN, Directeur de recherche, CIRAD

Rapporteure
Rapporteure
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

L'INSTITUT
agro Montpellier

Contribution des racines aux stocks de carbone dans le profil de sol de deux systèmes agroforestiers contrastés : distribution, décomposition et impact sur la minéralisation du carbone et des nutriments



Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut Agro Montpellier et de l'université de Montpellier
en Ecologie fonctionnelle

Présentée par Lorène SIEGWART

Le 03 Mai 2023

Sous la direction de Isabelle BERTRAND

et de Christophe JOURDAN

Devant le jury composé de

Catherine PICON-COCHARD, Directrice de recherche, INRAE

Valérie VIAUD, Directrice de recherche, INRAE

Florian FORT, Maître de conférences, L'institut Agro Montpellier

Samuel ABIVEN, Professeur, ENS

Isabelle BERTRAND, Directrice de recherche, INRAE

Christophe JOURDAN, Directeur de recherche, CIRAD

Rapporteure

Rapporteure

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Directeur de thèse



— Avant-propos —

Cette thèse a été co-financée par INRAE (Institut National de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) et par le projet DSCATT – Dynamic of Soil Carbon sequestration in Tropical and Temperate agricultural systems, financé par la Fondation Agropolis et la Fondation Total (référence ID 1802-001) dans le cadre du programme « Investissements d'avenir » (Labex Agro :ANE-10-LABX-0001-01).

Le projet DSCATT propose d'explorer le potentiel de séquestration de carbone dans les sols cultivés, en tenant compte de la fertilité des sols et de la durabilité des pratiques agricoles dans le contexte des changements globaux. Le travail de cette thèse se situe dans le WP1 qui porte sur les mesures biophysiques à l'interface sol-plante. Plus spécifiquement, il s'inscrit dans la tâche 1.3 qui s'intitule « Analyzing the link between plant productivity increase and SOC changes through root dynamics » et contribue à la tâche 1.4 qui s'intitule « Soil and ecosystem baseline for GHG balance » visant à établir des bilans carbone en fonction de l'usage des sols.

La thèse a été conduite à l'UMR Eco&Sols (Montpellier). Elle a débuté le 01/11/2019 avec la prise en main du sujet par une étude bibliographique et l'analyse d'un premier jeu de données. Les premières campagnes de terrain en 2020 ont été sévèrement affectées par la situation sanitaire mondiale. En particulier, la stratégie expérimentale en France (Chapitre 1) a été revue à la baisse et la mission au Sénégal (Chapitre 1) a été décalée dans le temps donc les données ont été acquises plus tardivement que prévu, justifiant la prolongation de 6 mois par rapport au délai initial de la thèse pour analyser les données et les intégrer dans le reste du travail de thèse.

Le corps de ce manuscrit de thèse a été rédigé sous forme d'articles scientifiques en anglais. L'introduction générale, la synthèse bibliographique, la démarche scientifique, la discussion générale et la conclusion sont rédigées en français.

— Remerciements —

Après un Erasmus en Finlande, une césure en Thaïlande et un stage de fin d'études en Inde, je n'aurais pas imaginé retourner à Montpellier, où l'agro commençait pour moi en 2015. Il aura fallu d'un café dans le bureau de **Myène Letellier**, de longues conversations avec **Ravi Khetarpal** et quelques pitchers au Gilly's avec **Laurent Ruiz** et **Benjamin Baud** pour me décider à me lancer dans la recherche d'une thèse. Et puis je tombe sur ce sujet : des 'racines' pour m'intriguer, 'carbone' et 'agroforesterie' pour me convaincre, et 'sols profonds' pour me séduire. Je ne réalisais pas encore dans quoi je me lançais et je remercie mes co-directrice et co-directeur de thèse **Isabelle Bertrand** et **Christophe Jourdan** pour m'avoir fait confiance. Un binôme complémentaire à tous points de vue, très présent tant sur le terrain et au labo que pour le raisonnement scientifique, et toujours dans une ambiance conviviale.

Isabelle, un énorme merci pour m'avoir appris à pousser les réflexions jusqu'au bout, pour m'avoir aidée à prioriser le travail quand j'essayais de tout mener de front. Toujours là pour me trouver du sucre quand il faisait un peu trop chaud sur DIAMS ou encore pour le touillage des 216 fioles de sol à incuber (et ta patience quand je me débattais plus tard avec ces données pour en comprendre quelque chose). Travailler avec toi pendant ces années a été une formation sans égale et un vrai plaisir, merci !

Christophe, merci pour m'avoir appris à m'émerveiller devant une racine en décomposition à quatre pattes au fond d'une fosse, pour les derniers comptages de cartographie racinaire à la lampe de poche le soir à Niakhar, pour l'excitation de voir une racine se faire attaquer par des collemboles sur les images des scanners. Je te remercie mille fois pour ton accompagnement et l'organisation des 2 semaines de mission au Sénégal. Les plantes vertes de l'aéroport de Dakar se souviennent encore de nos sols... L'univers des racines est passionnant et excitant mais aussi très complexe, et ton expertise et ta passion sur le sujet m'ont toujours donné envie d'en savoir plus.

Je voudrais remercier les personnes du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de recherche : **Samuel Abiven**, **Florian Fort**, **Catherine Picon-Cochard** et **Valérie Viaud**. Merci aux membres du comité de pilotage de ma thèse pour leurs nombreux conseils : **Tiphaine Chevallier**, **Cornelia Rumpel** et **Alexia Stokes**.

Au cours de ma thèse, ce sont près de 170 km de racines qui ont été analysées au total : racines triées à la main, suivies sur les scanners enfouies dans le sol, enterrées dans des litterbags, observées au microscope, broyées pour les analyses chimiques... Il y en a eu pour tous les goûts. J'aimerais remercier les (très) nombreuses personnes qui ont participé à mes recherches, sans qui toutes ces analyses n'auraient pas été possibles (j'espère n'oublier personne !).

Sur DIAMS, je remercie d'abord **Sébastien Rey** pour ta disponibilité, ainsi que le reste de l'équipe de DIASCOPE pour la gestion des parcelles et pour avoir supporté le fléau imposé par mes 72 cylindres enfouis à la surface du sol. Je remercie également les super-héros de l'équipe AEV grâce à qui je garde un excellent souvenir de mon tout premier terrain de thèse, sortie de confinement, bonne humeur sous le barnum, tri manuel de racines – merci pour votre ingéniosité, avec vous il n'existe que des solutions ! Merci donc à **Alain Rocheteau** pour une organisation et une anticipation de détails toujours indispensables sur le terrain ; **Didier Arnal** pour tes blagues et ta serviabilité, la fabrication de toutes sortes de choses très utiles ; **Carlos Trives-Segura** pour m'avoir toujours aidée à trouver ce dont j'avais besoin, laissée monopoliser le lyophilisateur aussi longtemps et tous les petits coups-de-main que tu as pu m'apporter ; **Maxime Duthoit** pour avoir réparé tout ce que j'ai pu casser (on peut maintenant confirmer que le Licor est un outil robuste !) ; **Rémi Dugué** pour ton aide colossale à tout moment, ton dynamisme contagieux et pour nos échanges variés sur le terrain ; **Marion Forest**, toujours le sourire et la motivation !

Pour leur aide ponctuelle et tellement bienvenue sur le terrain, je remercie chaleureusement **Maurane Damoiseaux, Gabrielle Daudin, Sylène Monnier, Didier Blavet, Jean-Luc Chotte**.

Au laboratoire, un grand merci à **Jean-Marc Souquet** pour mes toutes premières manips de thèse avec le fameux Van Soest ; **Nancy Rakotondrazafy** et **Mathis Sorton** pour m'avoir aidée à manipuler mes sols dans tous les sens, pas de repos au L2 ! ; **Aline Personne** pour encore plus d'analyses de sols ; **Laurie Amenc** pour m'avoir appris rigueur et précision pour l'analyse anatomique des racines ; **Josiane Abadie** pour ta grande patience avec tous mes soucis d'activités enzymatiques ; **Anne-Laure Pablo** et **Arthur Cousson** pour la qPCR que je ne pouvais absolument plus caser dans mon emploi du temps.

Pour leur motivation et leur aide monumentale dans le travail de terrain, de laboratoire et d'analyses d'images, je remercie énormément les stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : **Solenn Tuffigo, Aicha Gueye, Octave Biju-Duval, Alexandre Scalesse, Manon Stope, Louise Castanier, Marie-Caroline Brichler** et **Garynechele Saimpha**. Je vous souhaite réussite et épanouissement pour la suite.

Merci à **Laurent Cournac** pour l'accueil à l'UMR Eco&Sols. Je tiens à remercier **Farid Meddaci, Mélanie Pons, Cassandre de Haese, Emmanuelle Mazzini** et **Fanny Soriano** pour leur accueil chaleureux et toutes les démarches administratives ; **Philippe Benezech** pour m'avoir évité de gros soucis avec mon ordinateur ; **Philippe Deleporte** pour ton aide précieuse sur les stats dès mon arrivée à l'UMR. Merci à **Karel Van den Meersche** pour ton aide dans les fosses de DIAMS, la réflexion sur la modélisation que l'on n'a malheureusement pas pu terminer et ta disponibilité pour m'aider en stats ; **Michel Brossard** pour la technique magique de la densité apparente à l'eau et pour les nombreux échanges sur le fractionnement du sol ; **Claude Plassard** pour tes 'petits protocoles optimisés' et ton aide sur nos calculs de concentrations sur des coins de brouillons avec Manon qui nous a bien

débloquées ; **Claire Marsden** pour ton enthousiasme et tes mille idées, merci pour tous nos échanges sur mes données, et autres ! ; **Chiara Pistocchi** depuis mon stage M2 !, merci de m'avoir prise sous ton aile pour l'encadrement des cours à Supagro avec Claire et surtout pour m'avoir donné l'occasion de participer à une fresque du climat et de devenir à mon tour engagée dans l'association, ça me fait un bien fou ; **Kristell Hergoualc'h** pour nos échanges sur les gaz et tes ressources inépuisables (revues, templates et autres) qui ont vraiment débloqué mon travail d'analyse de données ; **Jérôme Ngao** l'expert arbres, pour ta bonne humeur contagieuse et ta disponibilité pour me donner ton point de vue sur n'importe quelle manip de ma thèse ; **Gabin Piton** pour ton aide dès ton arrivée à l'UMR, je crois que c'est toi qui m'a appris à rédiger des hypothèses (il était temps...), pour la découverte des boucles sur R (révolutionnaire) et pour la journée terrible entre couleuvres et crapauds sur DIAMS. Dans un contexte (encore plus) décontracté, je remercie les autres doctorant.e.s et les 'co-bureaux' avec lequel.le.s j'ai partagé des pauses cafés divertissantes ou juste quelques plaintes et gémissements qui font du bien : **Sidy Sow**, **Chao Fei** (good luck for your soil incubations, I know what you are going through !), **Espoir Gaglo** (au plaisir de repartir dans des hypothèses tordues sur les racines de Faidherbia), **Julia Denier** (tu m'as manqué), et puis mes coloc **Cyril Versavel**, **Madeleine Sugano**, **Solène Orrière** et **Soline Martin-Blangy** (une cohabitation parfaite à l'image des racines des parcs agroforestiers du Sahel !).

Ma mission au Sénégal était courte mais tellement intense. Je remercie en premier lieu **Olivier Rounsard** pour ton accueil sur 'Faidherbia-Flux' et les anecdotes rigolotes racontées le soir après le terrain ; **Ibou Djouf** pour ton aide incomparable et indispensable sur le terrain, une vraie force de la nature et c'est très inspirant. Merci aussi à **Komi Assigbetse**, **Patricia Moulin**, **Hanane Aroui**, **Lydie Lardy**, **Julie Murel** et **Moustapha Sane** pour votre accueil et votre aide pour le traitement de mes échantillons sur place.

Au cours de ma thèse, j'ai réalisé plusieurs expérimentations dans des laboratoires extérieurs. Il s'agissait toujours d'expériences enrichissantes et les personnes rencontrées ont toujours été d'une gentillesse et d'une aide incroyables. Au CEFÉ, je remercie **Bruno Buatois** pour ton accompagnement sur mes nombreux tests d'analyses N₂O ; à l'Ecotron, merci à **Joana Sauze**, **Clément Piel** et **Sébastien Devidal** pour votre expertise gaz, le prêt de matériel et surtout votre accueil chaleureux dans vos locaux en pleine campagne (j'adorais venir jusque chez vous !) ; à la plateforme PHIV, merci à **Christelle Baptiste** pour le protocole anatomie et ton accompagnement jusqu'au montage des lames et à **Matthieu Dejean** pour avoir pris le temps de me briefer sur ImageJ ; à BPMP, je remercie **Benoit Lacombe** et **Thibaut Perez** pour les nombreuses analyses isotopiques de mes échantillons lyophilisés ; au LISAH, merci à **Olivier Huttel** pour être venu sur DIAMS avec tes technologies de pointe pour nous aider à atteindre les sols profonds et merci à **Guillaume Coulouma** pour ton aide sur l'identification et la nomenclature des horizons ; et puis depuis le Japon, merci à **Soh Sugihara** for your massive help on writting the incubation hypotheses during lockdown and on field and lab experimentations in Montpellier !

Au cours de ces années de thèse, j'ai eu la chance de participer à plusieurs congrès internationaux et y faire des rencontres marquantes. Je remercie en particulier **Patrick Worms** pour cette rencontre inopinée dans le bus retour du 'social dinner' d'EURAF, un coup de blues écologique et quelle surprise de se retrouver chez Lucia le lendemain ; **Violaine Lamoureux-Var** merci pour ce bon moment passé au diner de SOM et pour ton optimisme, je suis rentrée de cette soirée plus motivée que jamais.

Pour le divertissement inégalable en toutes circonstances pour me changer les idées à n'importe quelle heure, un énorme merci à mes ami.e.s. A Montpellier, merci à **Ben, Eugène, Thibaut** et **Vivien**. Merci à **Billy, Laurie** et tous les Lindy Hoppers Peroni du lundi soir, avec quelques débordements occasionnels. **Mél**, merci pour ton soutien. Je pense aussi à la team *royale et tonique*, **Dada, Hugo, Iapteff, Kéké, Max, Piz**. Et puis "en ces temps-là c'était les copains d'abord", les ingénieur.e.s du CK, vous prouvez bien que la passion ne s'affaiblit pas toujours apparemment, avec nos séminaires hystériques aux quatre coins de la France... La fin de ma thèse signe aussi la fermeture de l'openspace - karaoké qui aura hébergé beaucoup de créativité de votre part. **Brieuc, Camille, Clem, Dédé, Elise, Gasp, Gregzor, Marty, Rourou, Samsam, Suz, Sy², Tara, Thiasmat, Victor**, et aussi **Dupless !**, merci pour vos visites et pour vos invitations à l'amusement.

Un énorme merci à mon amie **Mathilde**, petite douceur barjo et attachante, surtout une oreille attentive et des conseils toujours avisés depuis un moment maintenant !

Je remercie surtout ma famille qui me soutient depuis toujours. Merci à mes parents **JJ** et **Marielle**, pour m'avoir donné des racines et aussi des ailes, et **Mélina**, qui m'en fait voir de toutes les couleurs. **Papy et Mamie de Wies, Papy de Roth**, le reste des *spatz* : **Anaïs** (je recommande tes services pour les calculs d'unités !), **Justine** (ta folie m'épate), **Babice, Didelle, Hervé** qui se demandent encore pourquoi j'ai tant aimé compter des racines au fond des trous. Les pauses dans l'est sont toujours indispensables. Une énorme pensée pour ma **Mamie de Roth**, qui me manque énormément.

Et enfin **Millau**, merci pour absolument tout, ton soutien, toutes les choses essentielles dans la vie et puis ta façon de voir le monde et notre façon de vivre... A nous la suite !

— Résumé —

Dans le contexte actuel d'urgence climatique, la séquestration du carbone (C) dans les sols des systèmes agricoles est encouragée pour maintenir leur fertilité et participer à la réduction de la concentration en gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Les racines pourraient contribuer à l'augmentation des stocks de C dans le sol du fait de leur temps de résidence dans le sol supérieur aux parties aériennes des plantes et de leur capacité à atteindre différents horizons de sol, y compris profonds (> 30 cm de profondeur). Cette thèse vise à identifier la contribution des racines d'espèces pérennes et annuelles aux stocks de C dans les sols jusqu'à 150 cm de profondeur, dans deux systèmes agroforestiers contrastés, en incluant l'hétérogénéité spatiale induite par ces écosystèmes. Dans le parc agroforestier *Faidherbia-Flux* en climat semi-aride (Niakhar, Sénégal), des arbres *Faidherbia albida* âgés d'environ 70 ans sont dispersés aléatoirement, et des rotations d'arachide et mil sont cultivées jusque sous les arbres. Le dispositif encore jeune DIAMS implanté en 2017 en climat méditerranéen (Mauguio, France) est en arrangement linéaire avec du *Robinia pseudoacacia* et complété d'une bande enherbée de 2 m de large. Les rotations culturales (blé dur, orge et pois) sont cultivées en bandes de 15 m de large entre les lignes d'arbres. Les deux sites présentent de faibles stocks de C dans le sol (24 tC ha⁻¹ entre 0 et 150 cm de profondeur dans le parc sénégalais et 56 tC ha⁻¹ entre 0 et 100 cm dans le dispositif français) et les arbres sont tous fixateurs d'azote.

Les résultats de cette thèse montrent une complémentarité des niches écologiques des systèmes racinaires. Dans les deux sites, les racines des espèces pérennes n'interfèrent pas ou peu avec le développement des racines des cultures annuelles. Les entrées de C dérivé des litières racinaires représentent 0.7% des stocks de C des sols entre 0 et 100 cm dans le site français et 1.5% entre 0 et 150 cm dans le parc au Sénégal. Parmi les entrées totales de C (3.0 tC ha⁻¹an⁻¹) dans le dispositif français, 12.6% viennent des litières racinaires. Les racines profondes y contribuent particulièrement puisque 50 à 75% de la biomasse racinaire se trouve sous 20 cm de profondeur. Parmi les entrées de C (0.5 tC ha⁻¹an⁻¹) dans le parc à *F. albida*, 67.3% viennent des litières racinaires, dont 37.7% sous 10 cm de profondeur. La décomposition racinaire a été observée *in situ* avec une méthode innovante (scanners enfouis à différentes profondeurs de sol). Nous montrons que la décomposition racinaire de l'orge débute tôt ; 50% du volume racinaire est déjà perdu au stade floraison. Puis la décomposition du cylindre central, plus récalcitrant, dure 16 mois. Nos observations en conditions contrôlées démontrent le rôle de la disponibilité en nutriments (N et P) sur les mécanismes de *priming effect* dans les horizons profonds. Lors d'entrées de quantités de C équivalentes aux entrées annuelles par les litières racinaires (70 mgC kg_{soil}⁻¹), nous avons mesuré un *priming effect* en profondeur de 85 mgC kg_{soil}⁻¹ en conditions non limitantes en N. Enfin, le bilan C du sol réalisé après 3-5 ans de différenciation des usages de sol estime

des entrées de C plus importantes en système agroforestier qu'en culture pure (+0.85 tC ha⁻¹ en considérant la totalité du profil enraciné, principalement grâce au *turnover* aérien des espèces pérennes) et des émissions de CO₂ équivalentes entre les usages de sols (6.7 tC ha⁻¹an⁻¹).

Vu l'implication des horizons profonds dans le stockage de C dans le sol des systèmes agroforestiers, leur intégration dans les travaux de modélisation de la dynamique de la matière organique des sols est nécessaire et doit prendre en compte leurs spécificités par rapport aux sols de surface ; cela permettra de préciser le potentiel de séquestration de C dans le sol des systèmes agroforestiers.

Mots clés

Agroforesterie, horizons profonds de sol, méditerranéen, tropical semi-aride, cycles biochimiques, carbone dérivé des litières racinaires

— Abstract —

In the severe context of climate change, the soil carbon (C) sequestration in the agricultural systems could help to maintain their fertility and reduce the concentration of greenhouse gases in the atmosphere. Roots could contribute to increasing soil C stocks due to their longer soil residence time compared to the aerial plant parts, and their ability to reach different soil layers, including deep ones (> 30 cm depth). This thesis aimed to identify the contribution of the roots of perennial and annual plant species to soil C stocks in two contrasted agroforestry systems. The study, mainly in the field, considered soils up to depths of 100 - 150 cm, and the spatial heterogeneity of the agroforestry systems. In the *Faidherbia-Flux* agroforestry park under semi-arid climate (Niakhar, Senegal), *Faidherbia albida* trees about 70 years old are randomly distributed, and rotations of groundnuts and millet are grown even under the trees. The still young DIAMS system established in 2017 in a Mediterranean climate (Mauguio, France) is in a linear arrangement with *Robinia pseudoacacia* and completed with a 2-m wide grass strip. Crop rotations are durum wheat, barley and peas grown in 15-m wide strips. Both sites have low soil C stocks (24 tC ha⁻¹ between 0 and 150 cm depth in the Senegalese park and 56 tC ha⁻¹ between 0 and 100 cm in the French site) and N fixing trees.

The results showed a complementarity of the ecological niches of the root systems. In both sites, the roots of perennial species did not interfere with the development of annual crop roots. Root litter derived C inputs represented 0.7% of the soil C stocks between 0 and 100 cm in the French site and 1.5% between 0 and 150 cm in the agroforestry parks in Senegal. From the total C inputs in the French site (3.0 tC ha⁻¹ yr⁻¹), 12.6% were derived from root litters. Deep roots contributed particularly, since 50 to 75% of the root biomass was found below 20 cm of depth. Among the C inputs into the *F. albida* park (0.5 tC ha⁻¹ yr⁻¹), 67.3% of the C inputs were derived from the root litters, including 37.7% below a depth of 10 cm. To assess *in situ* root decomposition, an innovative method was used (scanners buried in different soil layers). Barley root decomposition started early; 50% of the root volume was already lost at the flowering stage. Then, the decomposition of the root stele, more recalcitrant, lasted 16 months. Our observations under controlled conditions showed the role of nutrient availability (N and P) on priming effect mechanisms in the subsoil. C inputs in quantities equivalent to the annual root litter derived inputs (70 mgC kg_{soil}⁻¹) lead to a priming effect in the subsoil of 85 mgC kg_{soil}⁻¹ in N-unlimited conditions. Last, the soil C balance carried out after 3-5 years of agroforestry estimated greater C inputs in the French agroforestry system than in the pure crop (+0.85 tC ha⁻¹ considering the entire rooted profile, mainly due to the aerial turnover of perennial species), while equivalent CO₂ emissions between land uses (6.7 tC ha⁻¹ yr⁻¹).

Given the implication of the subsoil in C storage in the agroforestry systems, their integration in future studies modelling soil organic matter dynamics is required and should take into account their specificities compared to the topsoil. This could allow to precise the potential of soil C sequestration in agroforestry systems.

Keywords

Agroforestry, soil depth, semi-arid, Mediterranean, biochemical cycles, root litter derived carbon

– Table des matières –

Introduction générale.....	1
<i>Références.....</i>	<i>7</i>
CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1. Dynamiques de carbone (stocks et flux) dans le profil vertical des sols.....	13
1.1. Matière organique et cycle du carbone dans le profil vertical des sols.....	13
1.2. Stocks de carbone des sols agricoles.....	20
2. La contribution des racines au stockage de carbone dans le profil vertical des sols agricoles.....	24
2.1. Définitions.....	24
2.2. Distribution et traits racinaires dans le profil des sols.....	25
2.3. Entrée de carbone dérivé des racines dans les sols.....	29
2.4. Décomposition des litières racinaires dans le profil des sols : mesures in situ.....	32
2.5. Impact des entrées de carbone dérivé des racines sur l'activité microbienne dans le profil de sol...	35
2.6. Quantification de la contribution des racines à la respiration du sol.....	37
3. Les systèmes agroforestiers et leur potentiel de stockage de carbone dans le sol.....	39
3.1. Les systèmes agroforestiers : définitions et intérêts.....	39
3.2. Le stockage de carbone dans les systèmes agroforestiers.....	43
3.3. Diversité quantitative et qualitative des racines en systèmes agroforestiers.....	46
<i>Références.....</i>	<i>49</i>
CHAPITRE II STRATEGIE DE RECHERCHE.....	69
1. Objectifs.....	71
2. Présentation des 2 sites d'étude.....	74
3. Démarche expérimentale.....	79
3.1. Stratégie générale de réponse à l'objectif de la thèse.....	79
3.2. Dimension spatiale de la stratégie expérimentale.....	81
3.3. Dimension temporelle de la stratégie expérimentale.....	83
<i>Références.....</i>	<i>85</i>
CHAPITRE III DISTRIBUTION RACINAIRE DES ESPECES PERENNES ET ANNUELLES EN SYSTEME AGROFORESTIER.....	87
<i>Rappel des objectifs.....</i>	<i>89</i>
<i>Article 1.....</i>	<i>91</i>
Abstract.....	92
1. Introduction.....	93
2. Materials and methods.....	95
2.1. Study site.....	95
2.2. Aerial and root biomass sampling.....	95
2.3. Root mapping.....	96
2.4. Root analyses.....	97
2.5. Soil sampling and analyses.....	97

2.6.	Data analyses.....	98
3.	Results.....	99
3.1.	Pedo-climatic context.....	99
3.2.	Root distribution.....	101
3.3.	Root functional traits.....	102
3.4.	Root chemical characteristics.....	103
3.5.	Contribution of root litter to soil C stocks.....	104
4.	Discussion.....	108
4.1.	Root distribution and properties according to tree presence and soil characteristics.....	108
4.2.	Annual contribution of tree and crop root litter-derived C inputs to soil C stocks along the soil profile.....	109
5.	Conclusion.....	110
	References.....	112
	Supplementary Data.....	118
<i>Article 2</i>		<i>125</i>
Abstract.....		126
Abbreviations.....		126
1. Introduction.....		127
2. Materials and methods.....		130
2.1.	Study site.....	130
2.2.	Sampling strategy.....	131
2.3.	Root characterization.....	131
2.4.	Soil characterization.....	134
2.5.	Data analyses.....	135
3. Results.....		138
3.1.	Aerial and root biomass density.....	138
3.2.	Root functional traits, chemical composition and anatomy.....	139
3.3.	Soil properties.....	141
3.4.	Annual root-derived C inputs and soil organic C stocks.....	145
3.5.	Covariations in root, soil and microbial properties across soil depth and location.....	145
4. Discussion.....		148
4.1.	Quantitative and qualitative assessments of the root systems and the soil properties.....	148
4.2.	Relationships between root-derived carbon inputs and soil carbon stocks.....	150
4.3.	Relationships between the root properties and the soil microbial properties.....	151
5. Conclusions.....		152
References.....		154
Supplementary Data.....		164
<i>Conclusions et perspectives</i>		<i>171</i>

CHAPITRE IV | CINÉTIQUES DE DÉCOMPOSITION RACINAIRE ET IMPACT SUR L'ACTIVITÉ MICROBIENNE ET LE CARBONE DU SOL.....175

<i>Rappel des objectifs</i>	177
<i>Article 3</i>	181
Abstract.....	182
1. Introduction.....	183
2. Materials and methods.....	184
2.1. Study site.....	184
2.2. Above- and belowground biomass sampling.....	186
2.3. Litterbag experiment.....	186
2.4. Initial litter quality.....	188
2.5. Soil sampling and analyses.....	189
2.6. Statistical analyses.....	190
3. Results.....	191
3.1. Effects of depth and location on soil characteristics.....	191
3.2. Above- and belowground biomass.....	193
3.3. Root litter quality, soil moisture and decomposition rates.....	195
3.4. Relationships between fine root decomposition, soil characteristics and litter quality.....	198
4. Discussion.....	198
4.1. Impact of <i>Faidherbia albida</i> trees on soil characteristics.....	198
4.2. Impact of soil depth on root litter decomposition.....	200
5. Conclusion.....	202
References.....	204
Supplementary Data.....	210
<i>Article 4</i>	213
Abstract.....	214
1. Introduction.....	215
2. Materials and methods.....	216
2.1. Study site.....	216
2.2. Experimental set-up and images acquisition.....	217
2.3. Images analysis.....	217
2.4. Root litterbags experiment.....	219
2.5. Data analyses.....	220
3. Results.....	222
3.1. Initial pool of roots.....	222
3.2. Root decomposition with the scanners method.....	223
3.3. Root decomposition with the litterbags method.....	224
3.4. Factors of the decomposition.....	225
4. Discussion.....	226
5. Conclusion.....	228
References.....	230
Supplementary Data.....	234

<i>Article 5</i>	241
Abstract.....	242
Abbreviations.....	242
1. Introduction.....	243
2. Materials and methods.....	245
2.1. Soil sampling.....	245
2.2. Experimental design.....	247
2.3. Carbon dynamics.....	247
2.4. Microbial biomass.....	249
2.5. Enzymatic activities.....	250
2.6. Nutrient dynamics.....	251
2.7. Statistical analyses.....	251
3. Results.....	251
3.1. Carbon and nutrient mineralization.....	251
3.2. Microbial biomass.....	253
3.3. Enzymatic activity.....	257
3.4. Carbon balance.....	258
4. Discussion.....	260
4.1. C and nutrient limitations of soil microorganisms at different depths.....	260
4.2. Consequences of the C and nutrient colimitations on the fate of added C according to depth.....	261
5. Conclusion.....	262
References.....	263
Supplementary Data.....	269
<i>Conclusions et perspectives</i>	275
CHAPITRE V RESPIRATION DU SOL SELON L'OCCUPATION.....	281
<i>Rappel des objectifs</i>	283
<i>Article 6</i>	285
Abstract.....	286
1. Introduction.....	287
2. Materials and methods.....	288
2.1. Study site.....	288
2.2. Experimental design.....	289
2.3. Soil CO ₂ emission measurements.....	290
2.4. Soil and plant analyses.....	291
2.5. Soil C balance estimation.....	292
2.6. Statistical analyses.....	293
3. Results.....	294
4. Discussion.....	304
4.1. Spatial and seasonal heterogeneity of soil respiration.....	304
4.2. Soil C balance in agroforestry compared to tree plantation and pure crop.....	305
5. Conclusions.....	306
References.....	307
Supplementary Data.....	311
<i>Conclusions et perspectives</i>	315

CHAPITRE VI DISCUSSION GENERALE.....	317
<i>Rappel des objectifs et du travail réalisé.....</i>	<i>319</i>
1. Diversité et distribution des systèmes racinaires dans les parcelles agroforestières.....	320
1.1. Association plurispécifique.....	320
1.2. Hétérogénéité des propriétés abiotiques du sol.....	324
2. Devenirs et impacts du carbone dérivé des litières racinaires dans les systèmes agroforestiers.....	327
2.1. Cinétiques de décomposition des litières racinaires.....	327
2.2. Phase I de la décomposition des litières racinaires.....	329
2.3. Phase II de la décomposition des litières racinaires.....	332
3. Rôle des racines dans le bilan carbone des sols des systèmes agroforestiers.....	335
3.1. Stocks de carbone des sols des systèmes agroforestiers étudiés.....	335
3.2. Contribution des racines dans les entrées de carbone dans les sols agroforestiers.....	335
3.3. Pertes de carbone des sols agroforestiers.....	340
<i>Schéma de synthèse des résultats pour la parcelle agroforestière du dispositif DIAMS.....</i>	<i>343</i>
<i>Schéma de synthèse des résultats pour le parc agroforestier Faidherbia-Flux.....</i>	<i>344</i>
<i>Références.....</i>	<i>345</i>
Conclusion générale.....	351
<i>Références.....</i>	<i>357</i>
Annexes.....	359
<i>Références.....</i>	<i>375</i>

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'augmentation des émissions de gaz à effet de serre du fait de l'utilisation déraisonnée des énergies fossiles (domaines de l'industrie, utilisations des bâtiments, transport, agriculture), entraîne un dérèglement climatique sévère avec des conséquences directes sur le cycle de l'eau, la biodiversité et les rendements agricoles. Malgré l'évidence qui faut avant tout réduire massivement les émissions de gaz à effet de serre, la séquestration de carbone dans des puits autres que l'atmosphère est appuyée par le GIEC (Groupe d'expertes Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) pour limiter le changement climatique (Smith et al. 2014). Dans ce sens, l'initiative 4p1000 propose qu'un stockage additionnel de 0.4% de carbone dans les sols du monde entier permettrait de compenser l'augmentation des émissions anthropogéniques de gaz à effet de serre (<https://4p1000.org/>). Cependant, plusieurs controverses animent la communauté scientifique à propos de la faisabilité de cet objectif. Par exemple, en prenant en compte seulement les sols agricoles et leur horizon labouré (en France), la séquestration de carbone dans les sols pourrait compenser seulement 12% des émissions anthropogéniques (Pellerin et al. 2019). Ce chiffre monte à 20-35% (2-3 Gt C an⁻¹) quand on considère jusque 1 m de profondeur (Minasny et al. 2017). Même si toujours loin de l'objectif du 4p1000, chaque quantité de carbone stocké compte à l'heure de l'urgence climatique.

En plus de contribuer à la diminution des gaz à effet de serre dans l'atmosphère, le stockage de carbone dans les sols représente un réel atout pour leur fertilité (Feller 1995). Cet argument est d'autant plus important qu'à l'échelle mondiale, 33% des sols sont actuellement considérés comme modérément ou gravement dégradés (Commissariat général au développement durable 2015). Sachant qu'il faudrait entre 200 et 1000 ans pour former 1 cm de sol (Commissariat général au développement durable 2015), la restauration ou au moins la conservation de la qualité des sols est urgente (Lal 2016). Le stockage de carbone dans les sols contribuerait au maintien de la fertilité du sol et donc à la sécurité alimentaire mondiale.

Pour augmenter la teneur en carbone d'un sol, la production de biomasse est une option. De nombreuses pratiques sont déjà amplement testées comme l'utilisation des cultures de couvertures, la fertilisation azotée, l'irrigation *etc* (Jarecki and Lal 2003; Jandl et al. 2007; Cousin et al. 2015; Minasny et al. 2017; Tiefenbacher et al. 2021) mais aussi la mise en place de systèmes diversifiés, dans lesquels l'association de plusieurs espèces favorise la production de biomasse aérienne et souterraine (Jose and Bardhan 2012; Sharma et al. 2021). Longtemps négligées, les racines pourraient jouer un rôle dans la séquestration de carbone dans le sol (Balesdent and Balabane 1996; Kumar et al. 2006). Le carbone dont elles sont principalement composées, retourne au sol *via* le mécanisme de rhizodéposition (Nguyen 2009) et lors de la décomposition des litières racinaires. Augmenter la biomasse racinaire augmenterait donc les entrées de carbone dans le sol mais aussi de nutriments, principalement azote et phosphore, en plus d'assurer d'autres intérêts comme par exemple la résistance à la sécheresse (Nakhforoosh et al. 2021). De plus, imaginer les racines comme levier pour la séquestration de carbone dans le sol représente un grand intérêt pour atteindre les horizons profonds de sol, alors que d'autres pratiques agricoles

concernent uniquement l'horizon de sol labouré. Les horizons profonds sont plus pauvres en carbone (Blume et al. 2002; Harrison et al. 2011) mais plus riches en interactions organo-minérales (Poirier et al. 2020) et avec des ratios stoechiométriques différents (Rumpel and Kögel-Knabner 2011) par rapport aux sols de surface ; ils auraient donc une plus grande marge d'augmentation de leur teneur en carbone et un meilleur potentiel de séquestration. De plus, le carbone présent dans les horizons profonds de sol est plus ancien car non renouvelé et donc plus stable qu'en surface (Balesdent et al. 2018). En parallèle, une augmentation de la biomasse racinaire en profondeur augmenterait la surface de prélèvement des nutriments (Ehdaie et al. 2010) dans des horizons difficilement fertilisés ; le maintien d'un équilibre est nécessaire pour ne pas les épuiser. De plus, une augmentation de la biomasse racinaire stimulerait l'activité microbienne et donc favoriserait les émissions de CO₂ (Atkin et al. 2000; Li et al. 2018). Enfin, des entrées additionnelles de carbone et nutriments dérivés des racines pourraient provoquer la décomposition du carbone stable du sol *i.e.* un déstockage prématuré, lors de l'apport de carbone « frais ». Ce mécanisme, appelé Priming Effect, serait *a priori* variable selon la profondeur (Salomé et al. 2010; de Graaff et al. 2014) vu les variations verticales de fonctionnement microbiologique sur un même profil de sol (Fierer et al. 2003; Eilers et al. 2012). Il est donc primordial d'anticiper les conséquences que pourrait avoir une augmentation de la biomasse racinaire sur le fonctionnement du sol et les cycles biogéochimiques du carbone, azote et phosphore en fonction de la profondeur, avant d'investir dans des espèces à enracinements importants et profonds.

Dans les systèmes plurispécifiques, par exemple l'agroforesterie, les systèmes racinaires sont variés dans l'objectif d'optimiser l'utilisation des ressources et favoriser les entrées de carbone et de nutriments dans le sol (Lehmann and Zech 1998). L'association d'arbres et des cultures annuelles est maintenant reconnue pour un stockage de carbone accru par rapport aux systèmes conventionnels (Nair et al. 2009; Cardinael 2015; Mayer et al. 2022) ; leur sol a été beaucoup étudié ces dernières années (Guillot 2018; D'Hervilly 2021; Diallo et al. 2021). Mais dans la littérature scientifique, les racines et les horizons de sol profonds ont été souvent oubliées. Il manque des connaissances précises sur la distribution racinaire, leur taux de renouvellement et la quantité de carbone qui entre dans les différents horizons de sol par an en système agroforestier. Et pourtant, l'hétérogénéité spatiale induite par la plurispécificité de ces systèmes est certainement responsable d'une hétérogénéité des processus d'entrée du carbone racinaire dans leurs sols, et ne concernerait pas tous les horizons de manière équivalente. Par exemple, les espèces pérennes seraient plutôt concernées par le *turnover* racinaire (Lukac 2012), tandis que la mortalité des racines des espèces cultivées pourrait avoir lieu principalement lors de la récolte. De plus, la qualité racinaire et la distribution dans le profil de sols varient selon les espèces, avec des conséquences sur la décomposition, donc sur le temps de résidence du carbone racinaires dans le sol (Guerrero-Ramírez et al. 2016). L'impact sur la microbiologie du sol qu'aurait une modification des entrées de litières racinaires est trop peu étudié, en particulier dans les horizons profonds potentiellement atteints par les racines d'arbres, où le fonctionnement microbien et les conditions pédo-climatiques sont différents de

la surface. De plus, il n'existe que peu de références réalisant des bilans carbone, notamment incluant les gaz à effet de serre émis à la surface du sol, dans les systèmes agroforestiers.

Dans ce contexte, le travail de cette thèse vise à identifier le rôle des racines de plantes annuelles et pérennes dans les stocks de carbone dans les sols des systèmes agroforestiers en lien avec la disponibilité en nutriments. Cette étude prend en compte les horizons de sol profonds, ce qui est très peu fait jusqu'à présent. En premier lieu, une revue bibliographique vise à synthétiser les informations disponibles dans la littérature sur le stockage de carbone dans les sols agroforestiers et la manière dont les racines peuvent y contribuer. Ensuite, la stratégie de recherche présente les questions scientifiques découlant de l'étude bibliographique, les hypothèses associées et la démarche expérimentale adoptée pour répondre à ces questions.

Références

- Atkin OK, Edwards EJ, Loveys BR (2000) Response of root respiration to changes in temperature and its relevance to global warming. *The New Phytologist* 147:141–154. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00683.x>
- Balesdent J, Balabane M (1996) Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28:1261–1263. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(96\)00112-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00112-5)
- Balesdent J, Basile-Doelsch I, Chadoeuf J, Cornu S, Derrien D, Fekiacova Z, Hatté C (2018) Atmosphere–soil carbon transfer as a function of soil depth. *Nature* 559:599–602. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0328-3>
- Blume E, Bischoff M, Reichert JM, Moorman T, Konopka A, Turco RF (2002) Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology* 20:171–181. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00025-2)
- Cardinael R (2015) Stockage de carbone et dynamique des matières organiques des sols en agroforesterie sous climat méditerranéen et tempéré. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE)
- Commissariat général au développement durable (2015) Sols et environnement - Chiffres clés - Edition 2015
- Cousin I, Roger-Estrade J, Stauffer M, Labreuche J, Chenu C, Obriot F, Vieublé L, Houot S (2015) Evaluer les effets des pratiques agricoles pour optimiser les services écosystémiques rendus par les sols cultivés. In: Salon International de l’Agriculture (SIA) : ” Les sols : des services et des usages”. Paris, France, p np
- de Graaff M-A, Jastrow JD, Gillette S, Johns A, Wulschleger SD (2014) Differential priming of soil carbon driven by soil depth and root impacts on carbon availability. *Soil Biology and Biochemistry* 69:147–156. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.047>
- D’Hervilly C (2021) Impact du linéaire sous arboré sur les organismes et la fertilité du sol en système agroforestier tempéré. Montpellier, SupAgro
- Diallo MB, Akponikpè PBI, Abasse T, Fatondji D, Agbossou EK (2021) Combined effect of trees and soil fertility management practices on millet yields in the Sahel. *Agroforest Syst* 95:717–730. <https://doi.org/10.1007/s10457-021-00624-8>
- Ehdaie B, Merhaut DJ, Ahmadian S, Hoops AC, Khuong T, Layne AP, Waines JG (2010) Root System Size Influences Water-Nutrient Uptake and Nitrate Leaching Potential in Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 196:455–466. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2010.00433.x>
- Eilers KG, Debenport S, Anderson S, Fierer N (2012) Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 50:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.03.011>
- Feller C (1995) La matière organique du sol : un indicateur de la fertilité. Application aux zones sahélienne et soudanienne. *Agriculture et Développement*
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 35:167–176. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00251-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00251-1)

- Guerrero-Ramírez NR, Craven D, Messier C, Potvin C, Turner BL, Handa IT (2016) Root quality and decomposition environment, but not tree species richness, drive root decomposition in tropical forests. *Plant Soil* 404:125–139. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2828-y>
- Guillot E (2018) Gradient spatial de fonctionnement et de stabilité écologique d'un sol en système agroforestier Méditerranéen
- Harrison RB, Footen PW, Strahm BD (2011) Deep Soil Horizons: Contribution and Importance to Soil Carbon Pools and in Assessing Whole-Ecosystem Response to Management and Global Change. *Forest Science* 57:67–76. <https://doi.org/10.1093/forestscience/57.1.67>
- Jandl R, Lindner M, Vesterdal L, Bauwens B, Baritz R, Hagedorn F, Johnson DW, Minkinen K, Byrne KA (2007) How strongly can forest management influence soil carbon sequestration? *Geoderma* 137:253–268. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.09.003>
- Jarecki MK, Lal R (2003) Crop Management for Soil Carbon Sequestration. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:471–502. <https://doi.org/10.1080/713608318>
- Jose S, Bardhan S (2012) Agroforestry for biomass production and carbon sequestration: an overview. *Agroforest Syst* 86:105–111. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9573-x>
- Kumar R, Pandey S, Pandey A (2006) Plant roots and carbon sequestration. *Current Science* 91:885–890
- Lal R (2016) Beyond COP 21: Potential and challenges of the “4 per Thousand” initiative. *Journal of Soil and Water Conservation* 71:20A-25A. <https://doi.org/10.2489/jswc.71.1.20A>
- Lehmann J, Zech W (1998) Fine root turnover of irrigated hedgerow intercropping in Northern Kenya. *Plant and Soil* 198:19–31. <https://doi.org/10.1023/A:1004293910977>
- Li X, Guo D, Zhang C, Niu D, Fu H, Wan C (2018) Contribution of root respiration to total soil respiration in a semi-arid grassland on the Loess Plateau, China. *Science of The Total Environment* 627:1209–1217. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.313>
- Lukac M (2012) Fine Root Turnover. In: Mancuso S (ed) *Measuring Roots*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 363–373
- Mayer S, Wiesmeier M, Sakamoto E, Hübner R, Cardinael R, Kühnel A, Kögel-Knabner I (2022) Soil organic carbon sequestration in temperate agroforestry systems – A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 323:107689. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107689>
- Minasny B, Malone BP, McBratney AB, Angers DA, Arrouays D, Chambers A, Chaplot V, Chen Z-S, Cheng K, Das BS, Field DJ, Gimona A, Hedley CB, Hong SY, Mandal B, Marchant BP, Martin M, McConkey BG, Mulder VL, O'Rourke S, Richer-de-Forges AC, Odeh I, Padarian J, Paustian K, Pan G, Poggio L, Savin I, Stolbovoy V, Stockmann U, Sulaeman Y, Tsui C-C, Vågen T-G, van Wesemael B, Winowiecki L (2017) Soil carbon 4 per mille. *Geoderma* 292:59–86. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.01.002>
- Nair PKR, Kumar BM, Nair VD (2009) Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 172:10–23. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800030>
- Nakhforoosh A, Nagel KA, Fiorani F, Bodner G (2021) Deep soil exploration vs. topsoil exploitation: distinctive rooting strategies between wheat landraces and wild relatives. *Plant Soil* 459:397–421. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04794-9>

- Nguyen C (2009) Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola C (eds) Sustainable Agriculture. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 97–123
- Pellerin S (ed), Bamiere L (ed), Launay C, Martin R, Schiavo M, Angers D, Augusto L, Balesdent J, Basile-Doelsch I, Bellassen V, Cardinael R, Cécillon L, Ceschia E, Chenu C, Constantin J, Darroussin J, Delacote P, Delame N, Gastal F, Gilbert D, Graux A-I, Guenet B, Houot S, Klumpp K, Letort E, Litrico I, Martin M, Menasseri S, Meziere D, Morvan T, Mosnier C, Roger-Estrade J, Saint-André L, Sierra J, Théron O, Viaud V, Gâteau R, Le Perchec S, Savini I, Réchauchère O (2019) Stocker du carbone dans les sols français. Quel potentiel au regard de l'objectif 4 pour 1000 et à quel coût ? Ed. Quae
- Poirier V, Basile-Doelsch I, Balesdent J, Borschneck D, Whalen JK, Angers DA (2020) Organo-Mineral Interactions Are More Important for Organic Matter Retention in Subsoil Than Topsoil. *Soil Syst* 4:4. <https://doi.org/10.3390/soilsystems4010004>
- Rumpel C, Kögel-Knabner I (2011) Deep soil organic matter—a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. *Plant Soil* 338:143–158. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0391-5>
- Salomé C, Nunan N, Pouteau V, Lerch TZ, Chenu C (2010) Carbon dynamics in topsoil and in subsoil may be controlled by different regulatory mechanisms. *Global Change Biology* 16:416–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01884.x>
- Sharma G, Shrestha S, Kunwar S, Tseng T-M (2021) Crop Diversification for Improved Weed Management: A Review. *Agriculture* 11:461. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050461>
- Smith P, Bustamante M, Ahammad H, Clark H, Dong H, Elsiddig EA, Haberl H, Harper R, House J, Jafari M, Masera M (2014) Climate Change 2014 Mitigation of Climate Change: Working Group III Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Tiefenbacher A, Sandén T, Haslmayr H-P, Miloczek J, Wenzel W, Spiegel H (2021) Optimizing Carbon Sequestration in Croplands: A Synthesis. *Agronomy* 11:882. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050882>

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Dynamiques de carbone (stocks et flux) dans le profil vertical des sols

1.1. Matière organique et cycle du carbone dans le profil vertical des sols

1.1.1. Définitions

La matière organique des sols est composée d'organismes vivants (les microorganismes (microflore et microfaune) comme les bactéries et champignons, la méso- et macrofaune et les racines) et morts (continuum de la matière organique plus ou moins décomposée depuis les particules de parties aériennes et souterraines des plantes jusqu'aux molécules organiques simples, Fig. I-1). La matière organique du sol est composée d'environ 58% de carbone (Schollenberger 1945).

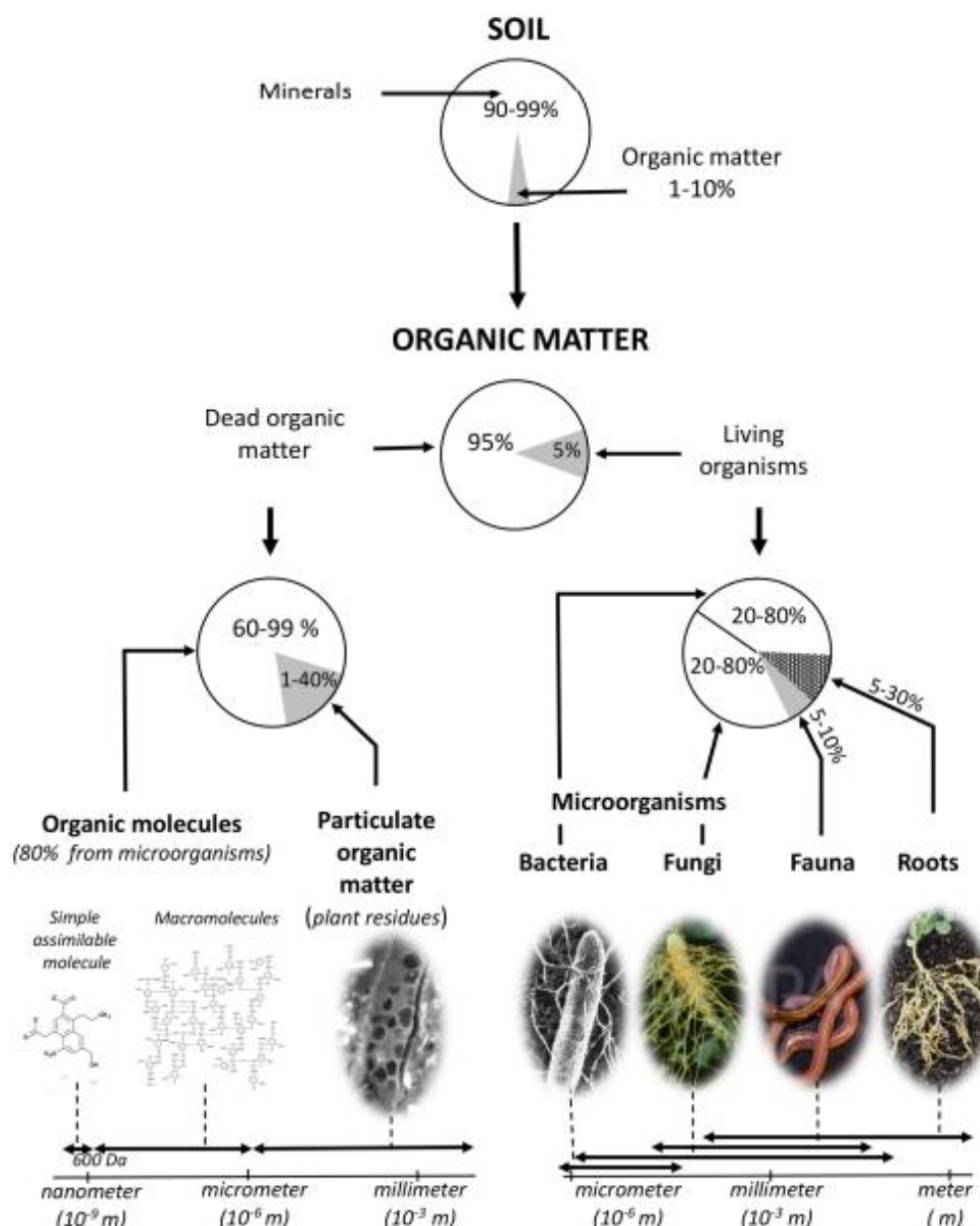


Fig. I-1 Nature et taille de la matière organique du sol (Basile-Doelsch et al. 2020).

1.1.2. Le cycle du carbone dans le sol

Le carbone de la matière organique des sols est soumis à plusieurs processus biologiques qui constituent le cycle du carbone, avec des entrées et des sorties du carbone du compartiment sol (Fig. I-2). Les entrées de carbone dans le sol peuvent être liées aux litières aériennes (chute de feuilles des arbres, résidus de culture...), aux litières racinaires (mortalité lors du *turnover* racinaire ou lors de la récolte), aux éléments organiques libérés par les racines (rhizodéposition) et les amendements organiques exogènes (Basile-Doelsch et al. 2020). La décomposition est la séquence de transformations physiques et chimiques subies par la matière organique du fait de l'activité biologique et de l'environnement. Elle permet à la matière organique fraîche (litières, exsudats et amendements) d'entrer dans le compartiment sol, plus ou moins rapidement (Angers et al. 2022) et ainsi devenir la matière organique du sol (ensemble des constituants organiques morts ou vivants, d'origine végétale, animale ou microbienne, transformés ou non, présents dans le sol). La matière organique du sol, et principalement la matière organique particulaire (matière organique du sol de taille supérieure à 0.05 mm), peut être fragmentée par la macrofaune (vers, termites, fourmis...), incorporée dans le profil et mélangée avec le sol par bioturbation (Curry and Schmidt 2007; Frouz 2018), ce qui contribue à sa décomposition. En parallèle, les microorganismes libèrent des enzymes spécialisées (Micuți et al. 2017) pour minéraliser la matière organique du sol, libérant du CO₂ par la respiration hétérotrophe et des nutriments dans l'eau du sol, disponibles sous forme minérale que pourront immobiliser les microorganismes et les plantes *via* leurs racines. La respiration du sol est composée de la respiration hétérotrophe et de la respiration autotrophe (Feng and Zhu 2019). Seule la respiration hétérotrophe constitue une sortie de carbone du sol (Stotzky 1965). La respiration autotrophe ne constitue pas une sortie de carbone à l'échelle du sol, mais plutôt à l'échelle de l'écosystème, puisque le CO₂ émis par la respiration racinaire provient de la plante vivante sans avoir intégré le compartiment sol (Fig. I-2). D'autres sorties de carbone du sol peuvent survenir avec l'érosion (Lal 2005) et le lessivage de carbone dissout (Liu et al. 2018), en moindres flux.

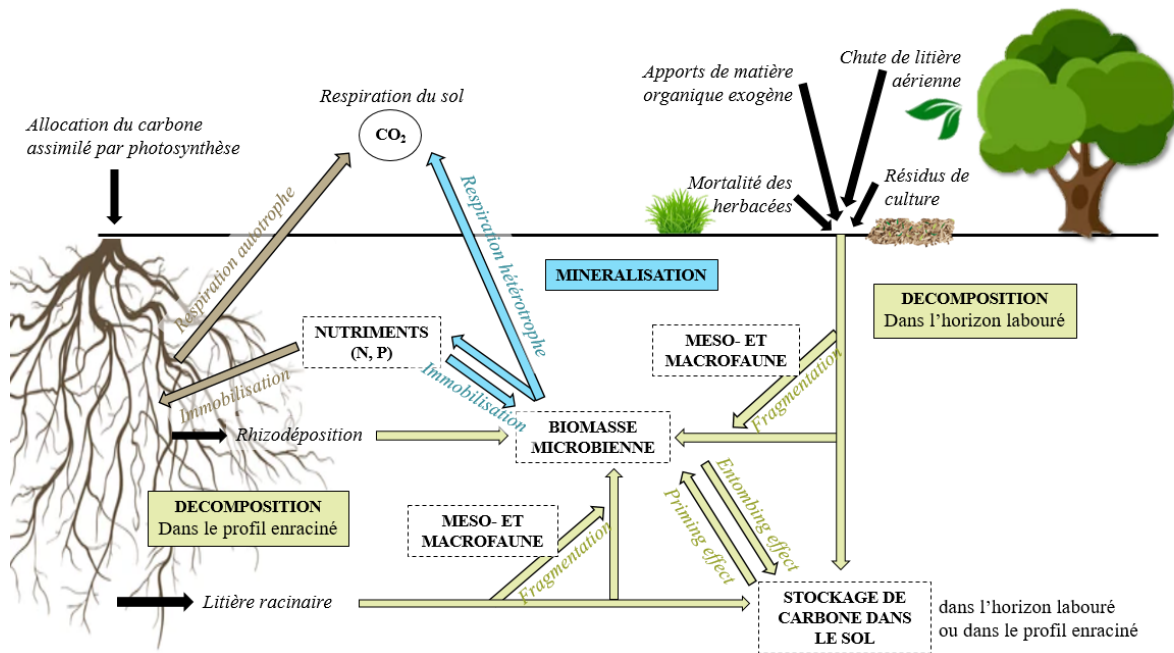


Fig. I-2 Cycle simplifié du carbone dans le sol.

1.1.3. Décomposition du carbone

Dans le cycle du carbone du sol, la décomposition regroupe la majeure partie des transformations du carbone. Le carbone du sol est dit stable si le coefficient des flux de sortie associé, principalement par décomposition, est faible par rapport à la taille du compartiment considéré (Cotrufo and Lavelle 2022).

Sur des échelles globales, les conditions pédoclimatiques jouent un rôle déterminant sur la décomposition de la matière organique (Fig. I-3a et b). L'humidité du sol a un impact majeur sur les microorganismes, et une teneur en eau optimale pour leur activité correspondrait à un remplissage de la porosité du sol de 60 % (Linn and Doran 1984). L'augmentation de la température du sol favorise la décomposition (Zhang et al. 2008). Surtout, la succession des cycles de dessèchement/humectation stimulent fortement l'activité microbienne, et donc la décomposition (Makkonen et al. 2012; Lopez-Sangil et al. 2018; Bonanomi et al. 2021).

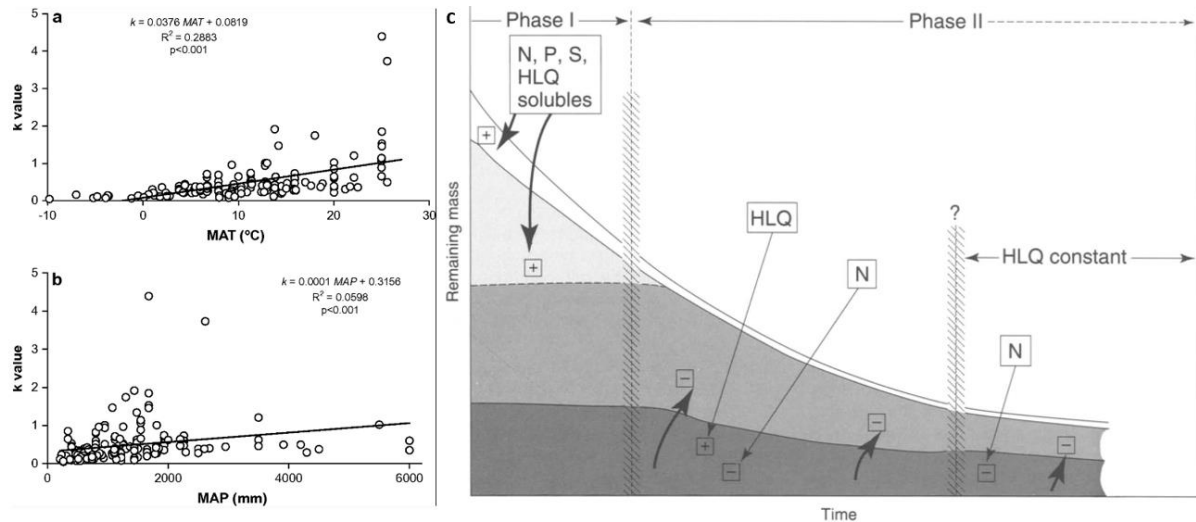


Fig. I-3 Principaux facteurs contrôlant la décomposition des litières (a) en fonction de la température et (b) en fonction des pluies (Zhang et al. 2008) sur des échelles globales et (c) en fonction de la qualité chimique de la litière (Coûteaux et al. 1995) sur des échelles locales. Sur (c), du blanc vers le gris foncé : composés solubles, carbohydrates non lignifiés, carbohydrates lignifiés, lignine.

Sur une échelle locale, lorsque le climat varie peu, la qualité chimique de la matière organique entrante dans le sol détermine la cinétique de décomposition. En effet, la fraction soluble de la matière organique, composée de sucres et acides aminés, parfois de métabolites secondaires (terpènes, alcaloïdes et composés polyphénoliques) (Chomel et al. 2016), est dégradée dès les premiers stades de la décomposition et dite labile. La concentration en composés solubles dans les litières est donc le facteur principal intervenant sur la décomposition sur le court terme (Coppens et al. 2005; Machinet 2009; Prieto et al. 2016). Au fur et à mesure de la disparition de la fraction soluble au cours de la décomposition (Fig. I-3c), la récalcitrance de la matière organique augmente avec l'augmentation de la concentration en fraction insoluble (hémicellulose, cellulose et lignine) (Wickings et al. 2012). Sur le long terme, les facteurs contrôlant la décomposition seraient plutôt liés aux propriétés du sol (Coppens et al. 2005; Fanin et al. 2020), favorisant plus ou moins la stabilisation du carbone dans le sol en lui procurant une inaccessibilité spatiale (Cotrufo et al. 2015). Parmi les propriétés de sol concernées, l'argile peut jouer un rôle important, mais pas que, en fonction du pH du sol (Rasmussen et al. 2018).

1.1.4. Respiration vs. stabilisation du carbone au cours de la décomposition

Il a traditionnellement été admis que les litières récalcitrantes contribuent plus à la stabilisation du carbone dans le sol. Premièrement, dans les litières dites récalcitrantes, il y aurait plus de carbone résistant aux attaques enzymatiques et donc avec un coefficient de minéralisation relativement faible, qui resterait plus longtemps dans le sol, comme la lignine (Fig. I-3c). Deuxièmement, les litières récalcitrantes favoriseraient la croissance des champignons par rapport aux bactéries puisque les champignons tendent à avoir une *carbon use efficiency* élevée (moins de pertes de carbone au cours de la respiration) et restent plus longtemps dans les sols grâce à leurs hyphes riches en composés récalcitrants, alors que les bactéries sont composées de phospholipides facilement minéralisables

(Poirier et al. 2018). Ainsi à l'inverse, une litière labile (se décomposant rapidement) était considérée comme néfaste¹ à la séquestration de carbone dans le sol du fait de la libération rapide de gaz à effet de serre (Hutchinson et al. 2007; Cotrufo and Lavelle 2022). Cependant, cette hypothèse est remise en question par de récentes théories. La *Microbial Efficiency-Matrix Stabilization* (MEMS) atteste que les constituants labiles de la matière organique entrante dans le sol favorisent la stabilisation de carbone dans le sol (Cotrufo et al. 2013). En effet, ces constituants labiles sont une ressource trophique efficacement utilisée par les microorganismes et représentent une part majeure des composés microbiens. Les composés microbiens participent ensuite à la stabilisation de la matière organique du sol en favorisant l'agrégation et les fortes liaisons chimiques à la matrice minérale du sol (Cotrufo et al. 2013). Des articles plus récents apportent des précisions sur la *soil microbial carbon pump* (Liang et al. 2017; Liang 2020) en précisant les transformations *in vivo* et *ex vivo* et ainsi différenciant 2 voies successives de stabilisation du carbone dans le sol (Cotrufo et al. 2015) : (i) une voie concerne la nécromasse microbienne et les métabolites microbiens extracellulaires stabilisés par le *entombing effect* (court terme, MEMS) dans la fraction MAOM (fraction fine et stable de la matière organique du sol) et (ii) une voie concerne les composés récalcitrants des litières végétales stabilisés dans la fraction POM (matière organique particulaire) sans passer par le pool microbien (long terme) (Fig. I-4a et b). Ces différentes voies de stabilisation du carbone concernent des fractions de tailles et densités différentes (MAOM et POM (Lavelle et al. 2020)). Les mécanismes sont en réalité plus complexes et les hypothèses de stabilisation par *entombing effect* des résidus microbiens dans la fraction MAOM ne sont pas toujours vérifiées (Córdova et al. 2018). Surtout, des biais quant à la méthode d'évaluation de la stabilité de la nécromasse microbienne par les osamines, qui sont absents des végétaux et stabilisés après la mort cellulaire, pourraient en fait surestimer le temps de résidence du carbone dans le sol par cette voie de stabilisation (Liang 2020).

¹ Une litière qui se décompose rapidement peut être considérée comme néfaste pour la séquestration de carbone et comme « de bonne qualité » (généralement par les agriculteurs) pour la libération de nutriments pour les plantes cultivées.

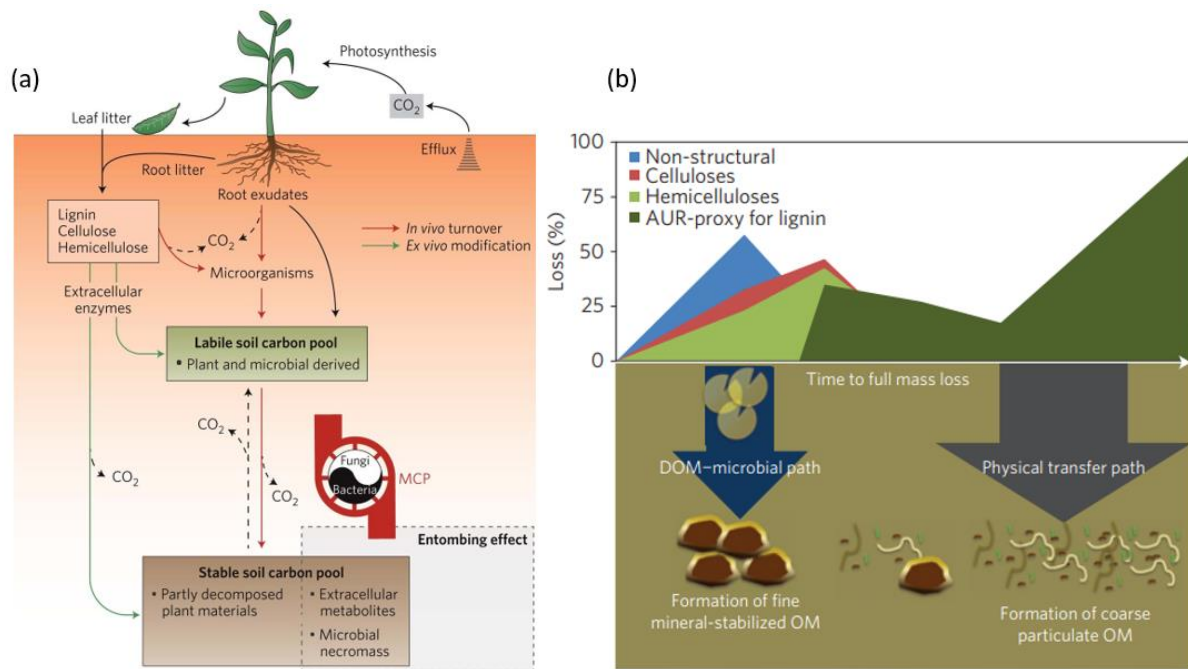


Fig. I-4 Présentations complémentaires des 2 voies d'entrée de la matière organique dans le sol (a, Liang et al. 2017 et b, Cotrufo et al. 2015).

1.1.5. Distribution du carbone le long du profil vertical des sols

Le long du profil vertical des sols, l'hétérogénéité des processus impliqués dans le cycle du carbone induit des variations dans la quantité et qualité du carbone du sol. La tendance générale de la distribution de la matière organique, et donc du carbone, dans le profil vertical des sols (selon la profondeur), est caractérisée par une forte accumulation dans les premiers horizons (Fig. I-5a et b). En contrepartie, l'âge et la récalcitrance du carbone augmente avec la profondeur (Fig. I-5c). La teneur en carbone n'est pas le seul critère différenciant les sols profonds de ceux de surface (Sanaullah et al. 2011; Sanaullah et al. 2016) : conditions physico-chimiques plus stables (Holden and Fierer 2005), moins de carbone organique (Blume et al. 2002) et moins de disponibilité en matière organique fraîche (résidus racinaires et rhizodéposition) (Müller et al. 2016). Par conséquent, les propriétés microbiennes sont différentes en profondeur par rapport à la surface : moins de biomasse microbienne (Fig. I-5d) (Lavahun et al. 1996; Fang and Moncrieff 2005), moins d'activité enzymatique et différentes réponses du quotient métabolique (respiration par unité de biomasse microbienne) (Lavahun et al. 1996; Fang and Moncrieff 2005; Piotrowska-Długosz et al. 2022b; Piotrowska-Długosz et al. 2022a).

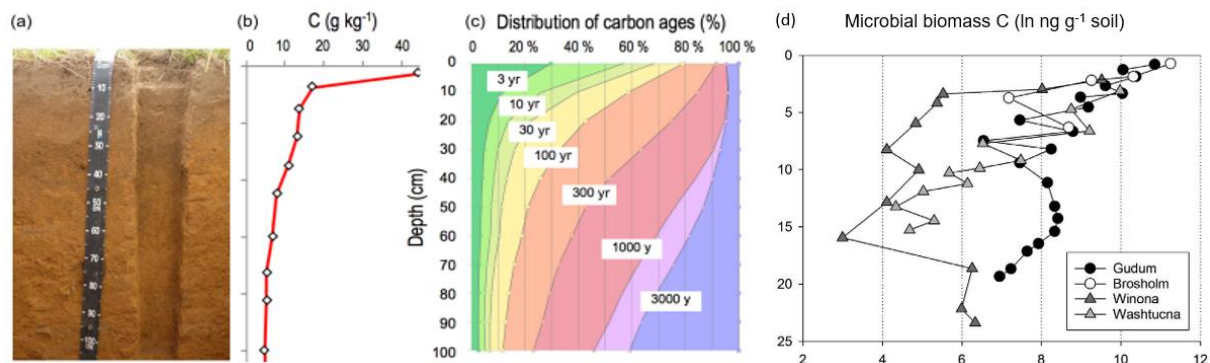


Fig. I-5 Effet de la profondeur sur certaines propriétés du sol – (a) Profil de sol de prairie, (b) distribution verticale de la teneur en carbone dans ce sol, (c) distribution des âges des atomes de carbone dans le sol (Balesdent et al. 2018; Basile-Doelsch et al. 2020) et (d) carbone de la biomasse microbienne (Joergensen and Wichern 2018).

A ces variations de carbone le long du profil vertical des sols, s'ajoute une stabilité des conditions pédoclimatiques comme la température et l'humidité du sol au cours des saisons qui réduit la fréquence et l'intensité des événements cycliques de *dessication/rewetting* en profondeur par rapport à la surface (Smith 1932). La profondeur contrôle également l'effet des précipitations sur l'activité microbienne (Engelhardt et al. 2018). Enfin, la limitation possible en nutriments et en matière organique, le manque d'oxygène et la densité du sol plus importante en profondeur qu'en surface (Fig. I-6) peuvent être responsables de variations des communautés microbiennes dans un profil vertical de sol (Sanullah et al. 2016). Les différences biologiques, chimiques et physiques des sols profonds par rapport aux sols de surface rendent nécessaire leur prise en compte dans les études destinées à améliorer notre compréhension des dynamiques de carbone et des possibilités de stockage dans le profil de sol (Button et al. 2022).

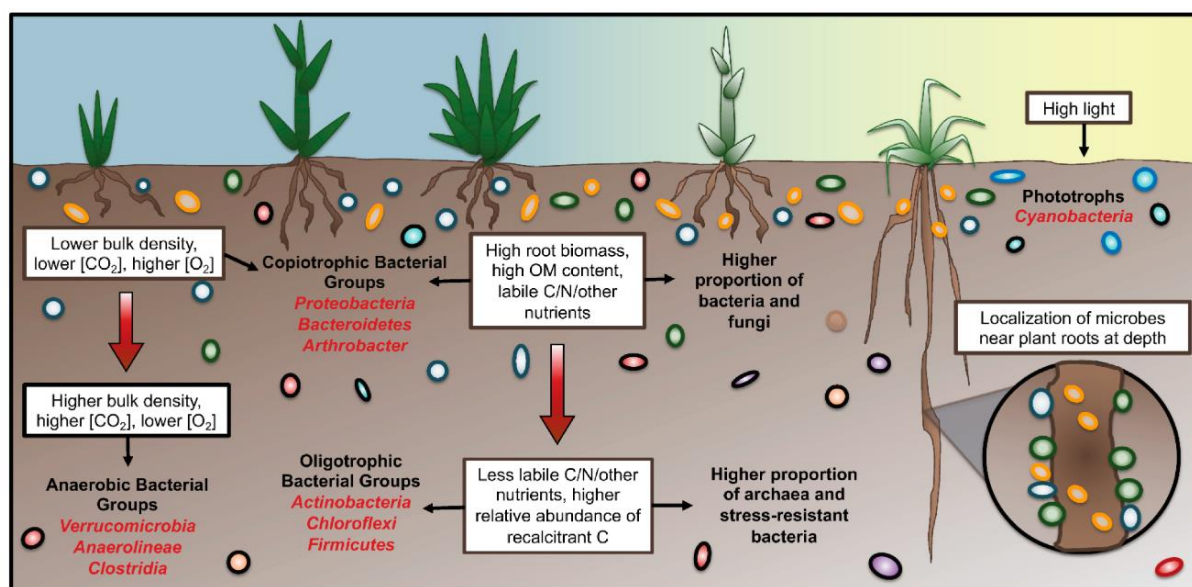


Fig. I-6 Effet de la profondeur sur les propriétés physico-chimiques du sol, y compris les groupes fonctionnels des microorganismes (Naylor et al. 2022).

1.2. Stocks de carbone des sols agricoles

1.2.1. Définitions

Le stock de carbone dans un sol est le résultat des flux entrants et sortants de carbone antérieurement à la mesure, à l'échelle de la parcelle. La teneur en carbone organique d'un sol est mesurée sur un sol tamisé à 2 mm (excluant donc la matière organique particulaire supérieure à cette taille). Le calcul du stock de carbone permet de passer à une quantité de carbone par unité de surface dans la parcelle ou par unité de volume dans un profil vertical à l'instant t de l'échantillonnage, en prenant en compte la teneur en cailloux et la densité du sol (Poeplau et al. 2017; Hobley et al. 2018). Le stockage de carbone dans le sol est un terme large défini par l'augmentation des stocks de carbone dans le sol au cours du temps dans une unité spatiale (Chenu et al. 2019). La séquestration de carbone dans le sol se définit par le processus de transfert du CO_2 de l'atmosphère vers le sol dans une unité spatiale, à travers les plantes, les résidus de plantes ou autres solides organiques retenus en tant que matière organique du sol (Olson et al. 2014; Chenu et al. 2019). Par exemple, l'apport de compost correspond en fait à une relocalisation du carbone et permet donc un stockage et non une séquestration du carbone dans le sol (Pellerin et al. 2019; Van Groenigen 2022). En somme, la séquestration et le stockage de carbone favorisent la fertilité du sol en améliorant la structure, la biodiversité des sols *etc*, et seule la séquestration de carbone stable dans le sol sur le long terme (plusieurs années) contribue à limiter la concentration en gaz à effets de serre dans l'atmosphère (Chenu and Balabane 2001).

On observe de très grandes différences en terme de quantité, distribution et qualité du carbone dans les sols en fonction de l'usage des sols. Le stock de carbone organique dans les sols français est estimé à 3580 MtC entre 0 et 30 cm de profondeur : 38% dans les sols forestiers, 22% dans les sols de prairies permanentes et 26.5% dans les sols des grandes cultures (Pellerin et al. 2019). L'agriculture a considérablement diminué les taux de matière organique dans les sols depuis la révolution agricole (Lal 2007; Sanderman et al. 2017) alors que les sols forestiers maintiennent des taux de matière organique élevés (Fig. I-7).

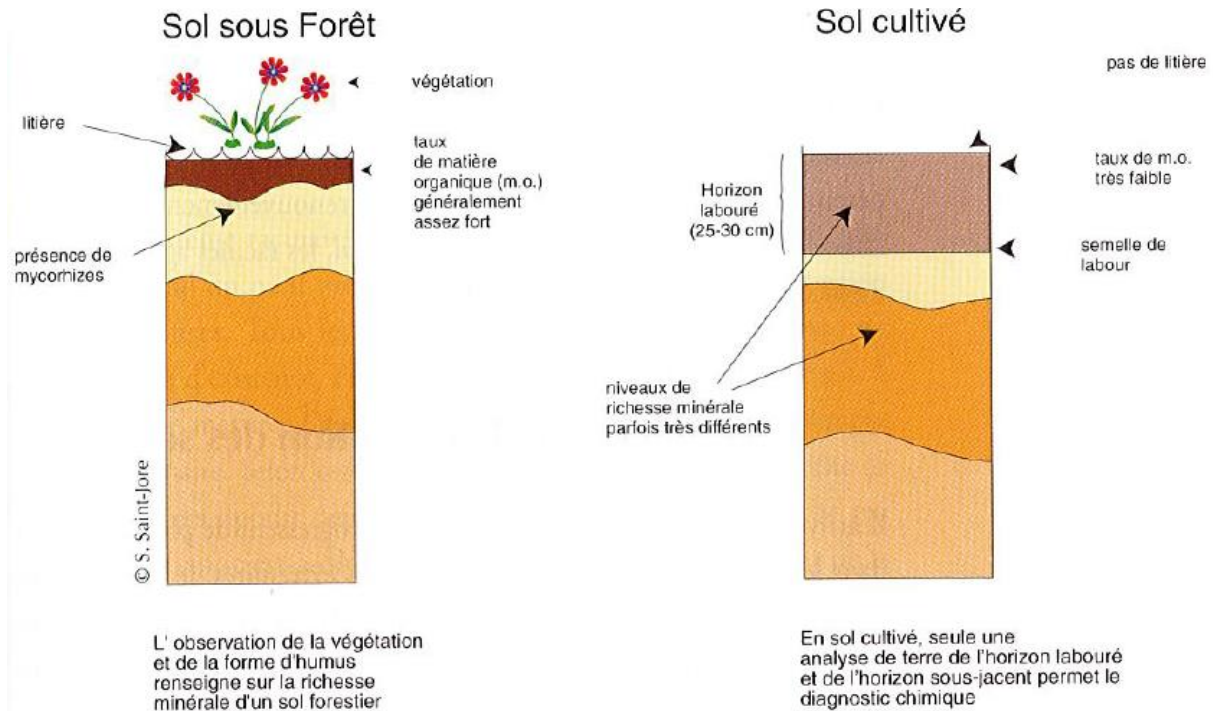


Fig. I-7 Comparaison d'un sol forestier avec un sol cultivé (Drénou 2006).

1.2.2. Limites du stockage de carbone dans les sols agricoles

Conformément à l'initiative 4p1000, des études ont évalué la capacité des sols agricoles à stocker, voir séquestrer le carbone (Dignac et al. 2017; Minasny et al. 2017; Rumpel et al. 2020). Le manque de mesures et données terrain peut entraîner une interprétation biaisée des effets des pratiques agricoles sur le stockage de carbone dans les sols et la productivité des cultures. La faisabilité d'atteindre l'objectif du 4p1000 en terme de stockage de carbone (<https://4p1000.org/>) est donc très débattu dans la communauté scientifique. Premièrement, seuls les sols agricoles peuvent servir de levier, et le stockage est réversible si les pratiques agricoles sont abandonnées (Pellerin et al. 2019). Deuxièmement, se pose la question de la profondeur à intégrer dans le calcul. En prenant en compte seulement les sols agricoles et leur horizon labouré (en France), le stockage de carbone dans les sols pourrait compenser 12% seulement des émissions anthropogéniques (Pellerin et al. 2019). Ce chiffre monte à 20-35% (2-3 Gt C an⁻¹) quand on considère jusque 1 m de profondeur (Minasny et al. 2017). Troisièmement, les contraintes stœchiométriques nécessitent des quantités massives d'azote et de phosphore à stocker simultanément que le carbone pour la stabilisation des éléments dans le sol (Spohn 2020; Van Groenigen 2022). Par exemple, pour stocker 1 t de carbone dans les sols agricoles de surface, il faudrait aussi stocker 13.1 kg de phosphore (Spohn 2020). Aussi, la notion de stœchiométrie est un aspect de plus en plus pris en compte pour étudier les effets des pratiques agricoles sur le fonctionnement du sol (Bertrand et al. 2019). Quatrièmement, tous les sols n'ont pas la même capacité à stocker du carbone additionnel du fait de différents niveaux de saturation en carbone (Blanco-Canqui 2021) et des différences de structures, minéralogies et granulométries (Bronick and Lal 2005). Enfin, l'effort de la séquestration de carbone

dans les sols agricoles représente un investissement important des agriculteurs (financier, temps, main d'œuvre...) alors que les pratiques dites séquestrantes ne sont pas essentielles en comparaison à la sécurité alimentaire confrontée à de multiples contraintes en Afrique Sub-Sahélienne (Jerneck and Olsson 2014), ou à la préservation de l'environnement et la meilleure qualité alimentaire en Europe. Une question se pose donc de savoir si c'est vraiment le rôle des agriculteurs de contrebalancer les émissions de gaz à effets de serre issues des autres secteurs d'activités anthropogéniques (Pellerin et al. 2019). Surtout, l'efficacité du stockage de carbone dans le sol diminue lorsque la concentration en CO₂ atmosphérique augmente (Terrer et al. 2021).

La limitation des émissions de gaz à effet de serre est à prioriser absolument ; la séquestration de carbone dans le sol n'est de toute évidence pas une solution suffisante pour contrebalancer les émissions anthropogéniques. Malgré tout, chaque quantité de carbone séquestrée compte à l'heure de l'urgence climatique, pour la participation à la réduction (même si faible) de la concentration en gaz à effet de serre dans l'atmosphère, et pour le maintien de la fertilité du sol.

1.2.3. Leviers du stockage de carbone dans les sols agricoles

Dans les systèmes cultivés, les pratiques agricoles ont des conséquences importantes sur le sol. Une méta-analyse récente recense les effets de certaines pratiques agricoles (labour absent, labour réduit, culture de couverture, biochar) sur la teneur en carbone dans les sols selon différents critères comme la profondeur (Fig. I-8), la zone climatique, la texture du sol, la durée d'expérimentation *etc* (Bai et al. 2019). Le labour ou autres passages d'engins ont d'importantes conséquences sur la structure des sols (destruction des agrégats, érosion, diminution de l'activité de la macrofaune, compaction), rendant plus difficile le développement racinaire et le drainage de l'eau (Swarup et al. 2000; Pagliai et al. 2004; Lugato et al. 2014). D'autres pratiques comme l'irrigation et la fertilisation impactent également le cycle du carbone et le système climatique de la planète (Nair et al. 2009).

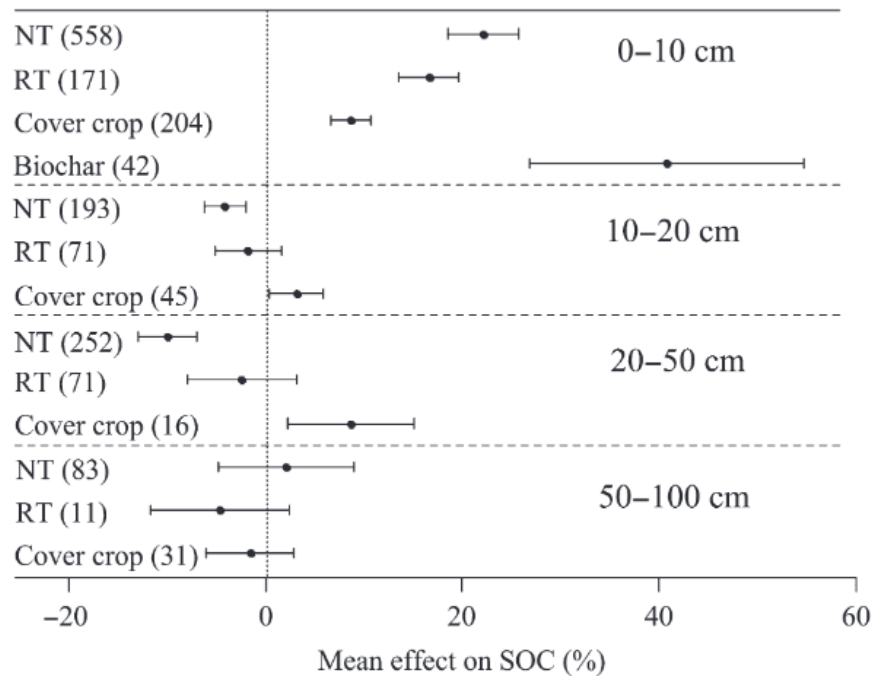


Fig. I-8 Impact de certaines pratiques sur la teneur en carbone des sols en fonction de la profondeur (Bai et al. 2019).

Les pratiques agricoles font partie des leviers stratégiques pour l'optimisation du stockage de carbone dans les sols cultivés en jouant sur les facteurs contrôlant les dynamiques de carbone, *i.e.* les entrées et les sorties. Si certains facteurs ne sont pas ou peu ajustables avec les pratiques agricoles, la quantité et la qualité de la matière organique entrante dans le système constituent des leviers d'action non négligeables puisqu'elles vont jouer sur sa propre décomposition (respiration *vs.* stabilisation). De plus, l'apport de matière organique fraîche peut entraîner la décomposition du carbone de la matière organique du sol. Ce mécanisme est appelé *priming effect* (PE) (Kuzyakov et al. 2000; Fontaine et al. 2007; Bernard et al. 2022). La prise en compte des mécanismes de réponse microbienne aux entrées de matière organique fraîche est donc très importante puisqu'ils prouvent que le stockage de carbone dans le sol n'est pas proportionnel aux entrées (Basile-Doelsch et al. 2020).

Dans les systèmes agricoles, la biomasse racinaire semble représenter un levier facile et peu coûteux pour augmenter les stocks de carbone dans le sol, puisqu'elle peut être augmentée en masse et en profondeur par la sélection variétale, l'association plurispécifique ou les rotations. Pourtant, elles sont encore trop peu étudiées par rapport aux parties aériennes des plantes, et encore moins dans les sols profonds (sous la semelle de labour).

2. La contribution des racines au stockage de carbone dans le profil vertical des sols agricoles

2.1. Définitions

Les racines sont apparues pendant l'ère primaire, il y a 400 millions d'années (Drénou 2006). Les racines diffèrent des tiges par leur structure interne (cylindre médullaire contenant les vaisseaux conducteurs protégés par un endoderme unicellulaire puis par plusieurs assises cellulaires : le cortex), leur direction de croissance (géotropisme positif pour la racine principale), par l'absence de cuticule (remplacée par une ou plusieurs assises subéro-phellodermiques), par la présence de poils absorbants, d'une coiffe protégeant le méristème et par leur mode de ramification (Fig. I-9).

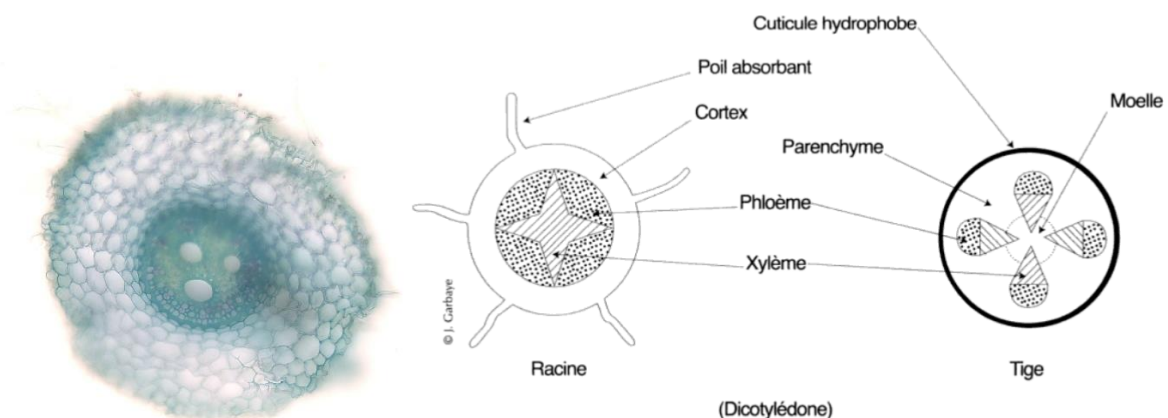


Fig. I-9 Exemple de coupe transversale de racine (orge récolté en Mai 2021) (a, Crédits : Lorène Siegwart) et schéma de la structure primaire vue en coupe transversale d'une racine et d'une tige (b, Drénou 2006).

Les racines constituent l'organe souterrain des plantes permettant l'adaptation à la vie fixée. Elles absorbent les nutriments et l'eau nécessaires à la croissance de la plante et stockent des réserves. Ces mécanismes sont donc concentrés dans la rhizosphère (partie du sol pénétrée par les racines des plantes et les microorganismes associés) ou dans la nécrosphère, une fois la racine morte (Jones et al. 2009). Plusieurs composantes du processus d'acquisition des nutriments peuvent être discernées (Fig. I-10) : mobilisation des nutriments en profondeur – impact des racines et de l'activité microbienne sur l'accessibilité spatiale des nutriments et la mobilisation depuis la phase solide, l'accumulation de nutriments en surface – *turnover* et accumulation sur le long terme des nutriments, acquis en profondeur et envoyés dans le reste des parties racinaires et aériennes du plant, principalement par la minéralisation de la litière en surface, allocation de nutriments et de carbone organique en profondeur – création de

hotspots pour l'activité racinaire et microbienne en profondeur avec les flux de matières organiques et nutriments facilement accessibles dans la rhizosphère, nécrosphère et drilosphère (fraction de sol qui a traversé le tube digestif des vers), dépendant de la distribution racinaire, la décomposition racinaire, l'activité des vers *etc.*

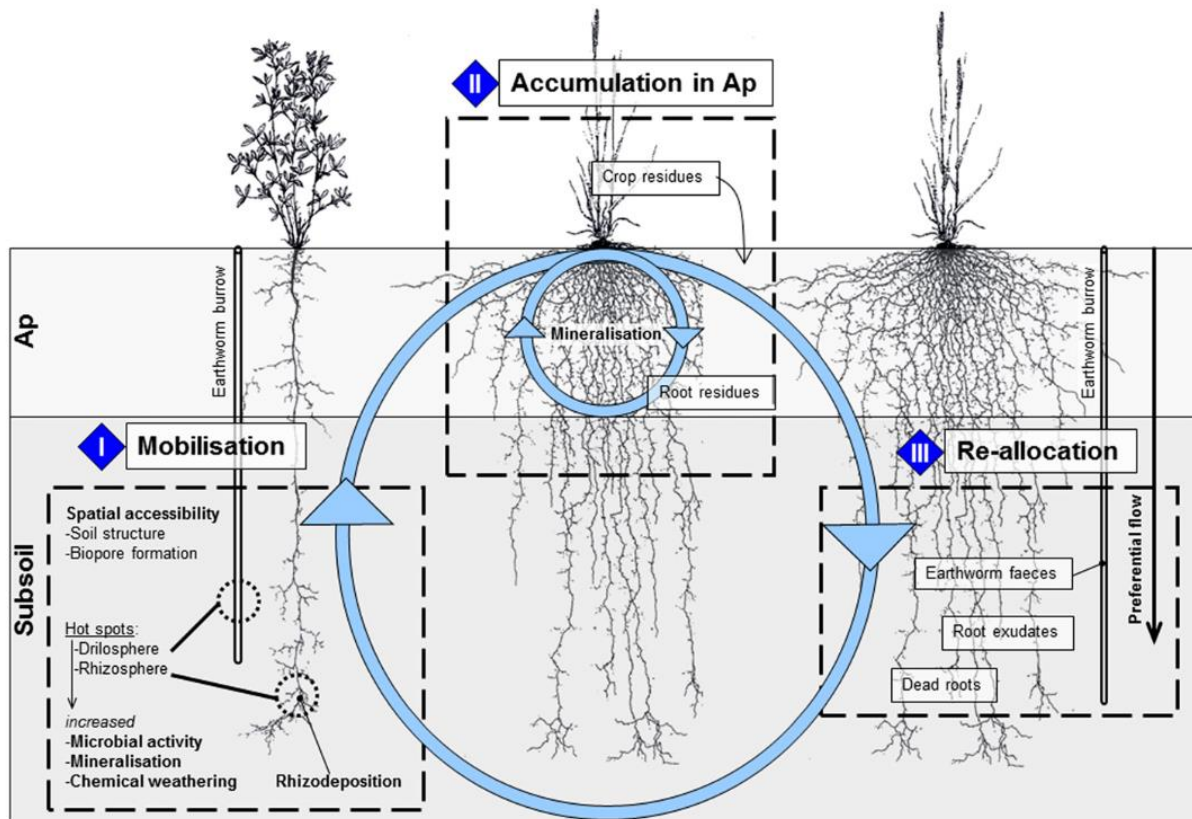


Fig. I-10 Modèle conceptuel de l'acquisition de nutriments dans le sol (Kautz et al. 2013).

2.2. Distribution et traits racinaires dans le profil des sols

La distribution des racines dans le profil des sols conditionne directement les mécanismes d'interactions plantes-sol et *in fine* le stockage de carbone dans le profil des sols. La distribution des racines dans le profil des sols dépend directement de (i) l'architecture du système racinaire et (ii) des traits fonctionnels qui sont eux-mêmes dépendants de l'espèce et de la pression jouée par l'environnement.

(i) L'architecture du système racinaire impose des distributions distinctes des racines dans le profil de sol et a un lien direct avec les fonctions assurées par les racines, comme l'ancrage dans le sol ou encore l'efficacité d'absorption des nutriments et de l'eau (Jourdan and Rey 1997). Par exemple, les systèmes racinaires fasciculés (Fig. I-11a), couramment trouvés chez les céréales et graminées, forment un faisceau où les racines démarrent du même point (plateau de tallage) sans prédominance d'une racine principale (Loades et al. 2010). Les racines pivot (Fig. I-11b) chez certaines plantes annuelles cultivées (colza, luzerne, pois...) sont des racines s'enfonçant verticalement dans le sol à partir desquelles d'autres

racines poussent latéralement (Goodman et al. 2001). D'autres types moins courants existent comme les racines tubéreuses.

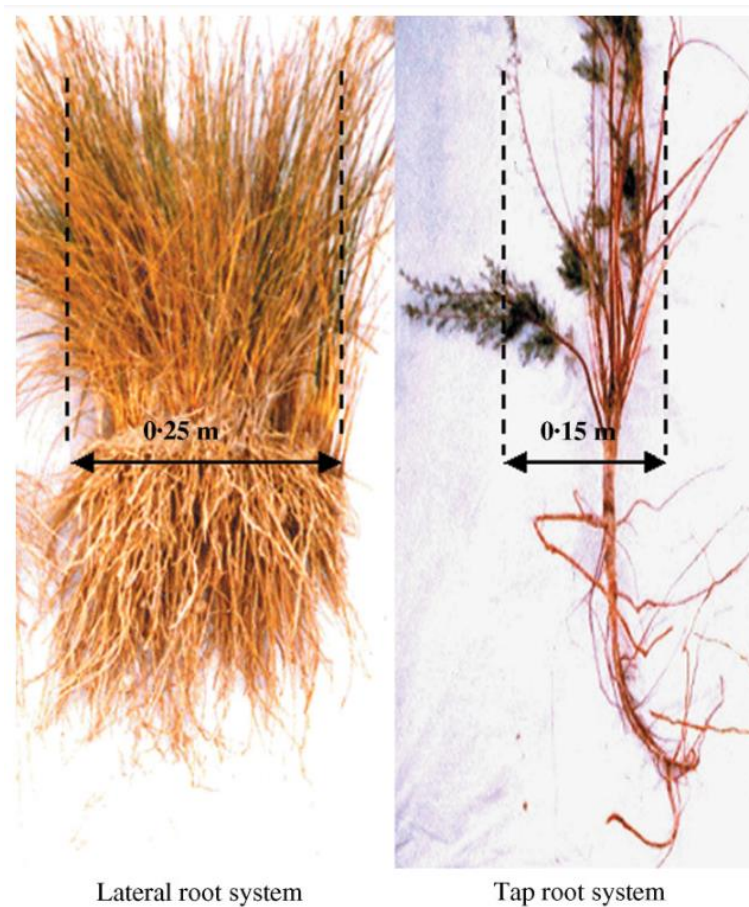


Fig. I-11 Illustration de la surface de sol occupée par plant avec différentes architectures de systèmes racinaires : fasciculées et pivotantes (Baets et al. 2007).

(ii) Les traits racinaires sont l'ensemble des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou phénologiques d'un système racinaire, mesurable à l'échelle de l'individu (Poirier et al. 2018). Ils dépendent principalement du génotype de la plante (Cantarel et al. 2021). En particulier, on retrouve une grande différence entre les traits racinaires des espèces pérennes de celles des espèces annuelles. Les espèces pérennes, colonisant des horizons plus profonds que ceux exploités par les racines annuelles (Beniston et al. 2014; Ferchaud et al. 2015; Duchene et al. 2020), auraient une stratégie de conservation, alors que les racines annuelles auraient plutôt une stratégie d'acquisition avec une teneur élevée en azote, une densité de tissus racinaires plus faible et une importante longueur racinaire spécifique (ratio longueur sur masse) qui facilite l'exploration du sol et donc l'absorption des ressources (Roumet et al. 2006; Hummel et al. 2007; Weemstra et al. 2016). En particulier, les racines peuvent être divisées en plusieurs catégories selon leurs diamètres et ordres de ramification (Drénou 2006). Les traits racinaires peuvent également varier entre les ordres de ramification au sein d'une même espèce (Picon-Cochard et al. 2012), assurant différentes fonctions (Table I-1). Les racines fines ont été définies par un diamètre inférieur ou égal à 2 mm (Block et al. 2006) ; très nombreuses pour augmenter la surface de contact avec

le sol et très souvent associées à des mycorhizes (Hetrick 1991), elles assurent principalement l'absorption de l'eau du sol ainsi que les nutriments. Certaines espèces pérennes possèdent des racines ligneuses avec un diamètre de plusieurs décimètres et jouant le rôle d'exploration et de fixation de la plante. Les différents types de racines sont distribuées différemment dans le sol. Les racines ligneuses tendent à pénétrer les horizons profonds bien qu'elles soient aussi présentes en surface pour l'exploration radiale. Les racines fines sont principalement concentrées dans les 30 premiers centimètres du sol (densité racinaire importante), mais sont également présentes en profondeur (Beniston et al. 2014; Ferchaud et al. 2015; Duchene et al. 2020). L'essentiel de l'appareil absorbant se trouve donc en surface, où la concentration en nutriments est la plus importante (Jobbágy and Jackson 2001; Li et al. 2022b). Les racines profondes assurent l'absorption d'eau et des nutriments profonds quand le sol de surface se dessèche et que la fonction d'absorption ne peut plus se réaliser (Jackson et al. 2000; Tao et al. 2021).

Table I-1 Liste des traits racinaires principaux et leur signification fonctionnelle (Roumet et al. 2006).

Traits	Abbreviations (units)	Functional significance	Key references
Topological index ^a	–	Soil exploration and exploitation efficiency (+) Water transport (–)	Fitter (1985)
Proportion of root length with diameter < 0.2 mm	Fine roots (% root length)	Rate of nutrient uptake (+) Root longevity (–)	Eissenstat (1992); Ryser (1998)
Specific root length	SRL (m g ⁻¹)	RGR (+) Root respiration (+) Rate of nutrient and water uptake (+) Root elongation rate (+) Root turnover (+)	Eissenstat (1992); Ryser (1998)
Root tissue density	(RTD) (g cm ⁻³)	Longevity (+) Resistance to herbivores, drought (+) Root decomposition rate (–)	Eissenstat & Yanai (1997); Ryser (1998)
Root diameter (mm)		Rate of nutrient uptake (–) Longevity (+) Storage (+) Transport of water (+) Penetration force in soil (+)	Eissenstat (1992); Ryser (1998)
Root nitrogen concentration	RNC (%)	Root respiration (+) Root growth (+) Root longevity (–) Root decomposition rate (+)	Reich <i>et al.</i> (1998); Tjoelker <i>et al.</i> (2005)
Root construction cost	RCC (g glucose g ⁻¹)	Carbon invested in roots (+)	Poorter (1994)
Mycorrhizal colonization	(% root length colonized)	Nutrient uptake (+) Protection against pathogens (+)	Brundrett (1991); Newsham <i>et al.</i> (1995)

Les systèmes racinaires sont capables de s'adapter aux contraintes de l'environnement grâce à leur plasticité : en changeant l'allocation du carbone aux racines ou en favorisant/inhibant certains traits fonctionnels (Calleja-Cabrera et al. 2020). Par exemple, la biomasse racinaire répond fortement à la disponibilité en nutriments dans le sol (Fig. I-12). Il est donc logique que les systèmes racinaires soient impactés par le réchauffement climatique (Wang et al. 2021) et par les variations verticales (Hartemink et al. 2020) des propriétés physico-chimiques du sol (Eissenstat et al. 2000; Konopka et al. 2009; Hodge et al. 2009; Freschet et al. 2017). Dans la littérature, les analyses des propriétés racinaires en fonction des caractéristiques du sol sont conduites surtout dans des plantations d'arbres (Makita et al. 2011; Tückmantel et al. 2017; Germon et al. 2020). Les racines fines profondes auraient un diamètre plus

important qu'en surface pour une pénétration du sol facilitée, moins d'azote dans leur composition chimique dû à la faible teneur en nutriments dans les sols profonds et des vaisseaux conducteurs plus nombreux ou plus gros pour favoriser la conductivité hydraulique (Prieto et al. 2015; Wang et al. 2016). Parfois au contraire, les textures plus fines du sol en profondeur peuvent induire des diamètres racinaires plus petits, tandis que la densité apparente du sol favorise des racines plus larges et plus denses (Freschet et al. 2017). Enfin, Fort et al. (2016) montrent une différenciation des stratégies racinaires sur l'axe vertical de la profondeur plus importante dans des environnements plus fertiles par rapport à des sols qui le sont moins, sans doute pour favoriser l'absorption de nutriments en surface et l'exploration et l'absorption d'eau dans les horizons profonds.

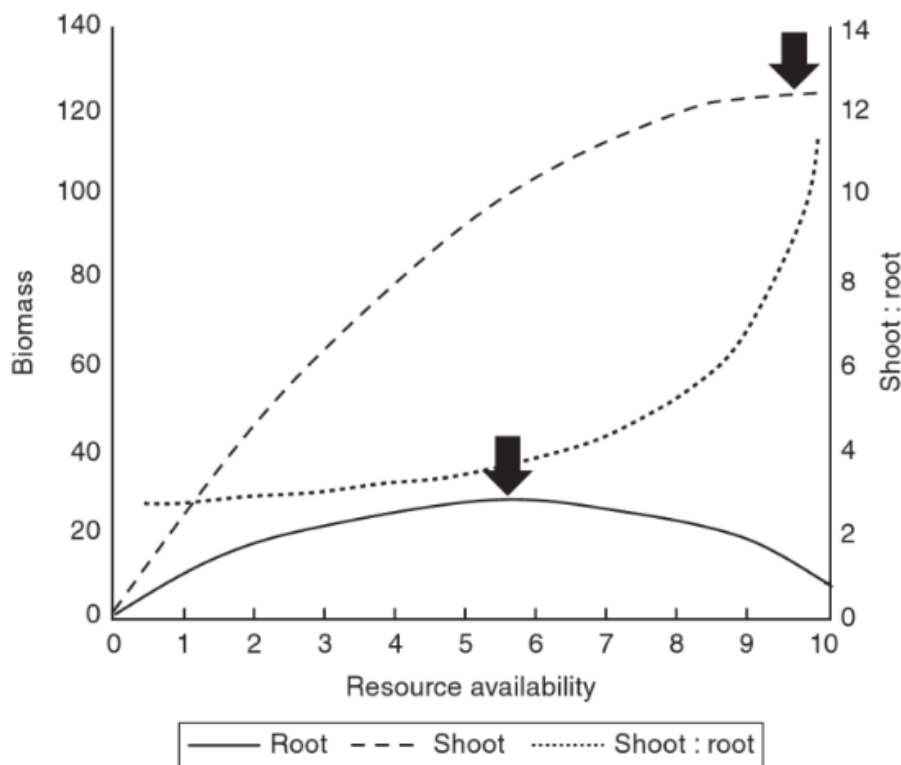


Fig. I-12 Production de biomasse racinaire et aérienne en fonction de la disponibilité en ressources dans un milieu (Van Noordwijk et al. 2015).

Les traits fonctionnels des racines pourraient influencer les mécanismes de stabilisation du carbone dans le sol (Deyn et al. 2008; Ridgeway et al. 2022) et une étude récente a identifié les traits les plus investis dans ces mécanismes (Poirier et al. 2018). En effet, parmi les interactions plantes-sol assurées par les racines et conditionnées par leurs distributions et traits, le rôle de source de carbone par les racines pourrait représenter un levier pour augmenter le stockage de carbone dans le sol en augmentant la biomasse racinaire (Kumar et al. 2006).

2.3. Entrée de carbone dérivé des racines dans les sols

2.3.1. Mécanismes

Les racines sont principalement composées de carbone : 42.45 ± 5.12 % pour les herbacées ($n = 749$), 38.20 ± 5.23 % pour les cultures ($n = 56$) et 47.43 ± 3.94 % pour les plantes ligneuses ($n = 1392$) (Ma et al. 2018). Environ 18% du carbone assimilé et non respiré par les parties aériennes est alloué aux racines au cours du développement de la plante pour le seigle de printemps : 9% pour la croissance racinaire, 6% pour la respiration racinaire et 3% pour la rhizodéposition (Remus and Augustin 2016). Ces chiffres varient selon le type de végétation (Fig. I-13). De plus, la teneur en carbone des racines peut varier selon le diamètre racinaire (Bert and Danjon 2006) et donc selon la profondeur (Wang et al. 2016).

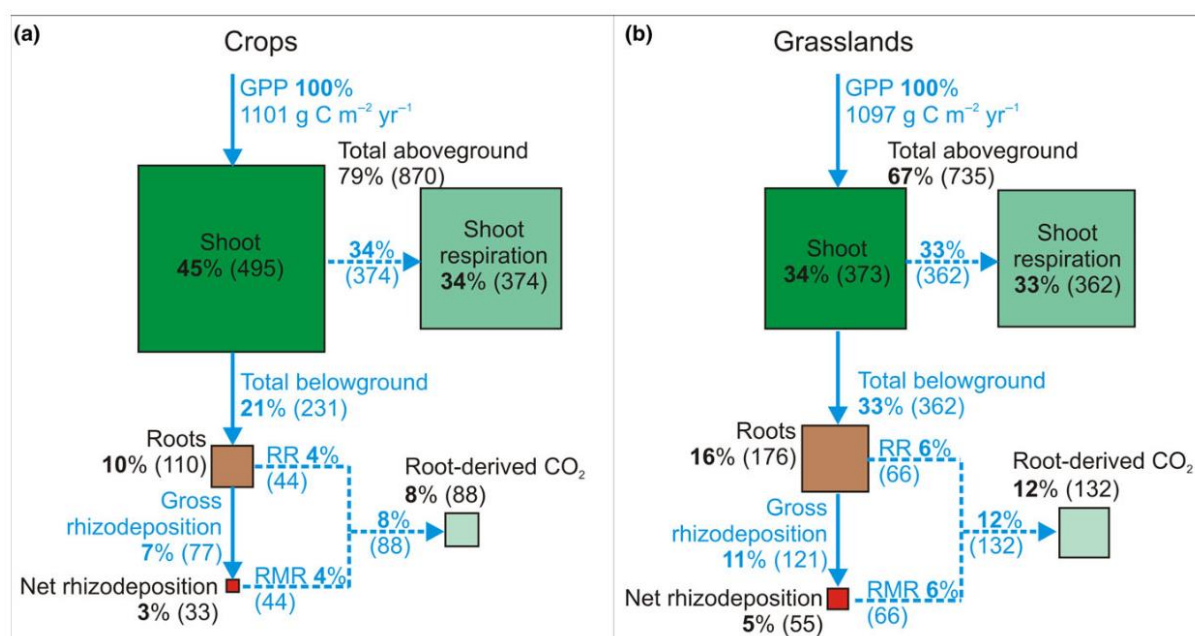


Fig. I-13 Allocation de carbone pour les espèces cultivées (a) et les prairies (b). Les données entre parenthèses représentent les valeurs absolues de la répartition du carbone (gC m⁻² an⁻¹) (Pausch and Kuzyakov 2018).

Le carbone dérivé des racines entre dans le compartiment sol *via* plusieurs mécanismes, notamment (i) la rhizodéposition et (ii) la décomposition des litières racinaires (Poirier et al. 2018) :

(i) Le mécanisme de rhizodéposition représenterait 3% de la production primaire brute des plantes (Pausch and Kuzyakov 2018) et dépend de la disponibilité en nutriments (Bowsher et al. 2018). Il s'agit d'un ensemble de processus faisant partie du métabolisme racinaire (Jones et al. 2009). La sécrétion d'exsudats racinaires ne représente qu'un des six principaux mécanismes de rhizodéposition (Fig. I-14), et est stimulée par le changement climatique (Keiluweit et al. 2015). La rhizodéposition nette (après décomposition par les microorganismes sur le court terme) a été estimée à 55 et 33 gC m⁻² an⁻¹ dans les prairies et les cultures respectivement (Pausch and Kuzyakov 2018). Le phénomène de rhizodéposition constitue un apport direct de molécules carbonées dans la rhizosphère et joue donc sur le stockage de

carbone (Kuzyakov et al. 1999) en régulant la stabilité des agrégats et donc la structure du sol (Hütsch et al. 2002) ainsi que le développement des populations microbiennes et leurs activités (Benizri et al. 2002).

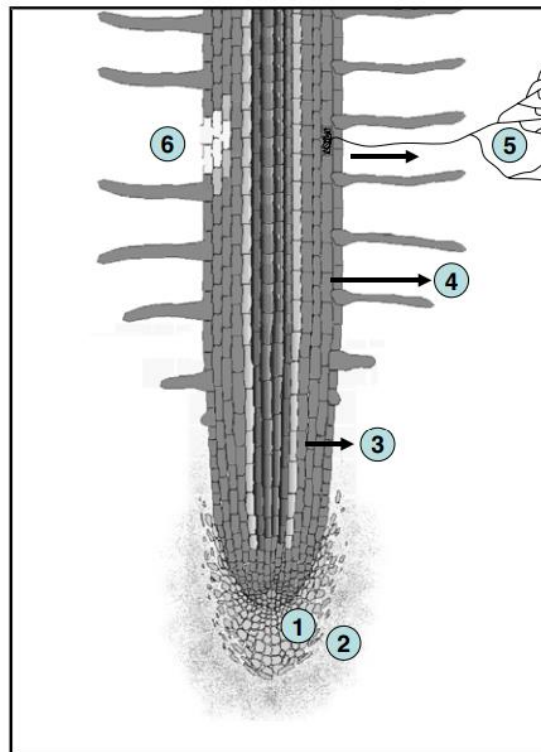


Fig. I-14 Représentation schématique d'une section longitudinale d'une racine en croissance et identifiant les 6 principaux mécanismes de la rhizodéposition : 1- perte des cellules de la coiffe racinaire, 2- perte de mucilage insoluble, 3- perte d'exsudats racinaires solubles, 4- perte de carbone organique volatile, 5- transfert de carbone aux symbiotes et 6- perte de carbone par mortalité et lyse des cellules du rhizoderme et cortex (Jones et al. 2009).

La définition ci-dessus inclut la perte de carbone par mortalité et la lyse des cellules du rhizoderme et cortex dans les mécanismes de rhizodéposition. Cette information mérite d'être nuancée, puisque Jones et al. (2009) précisent que cette mortalité cellulaire est causée par les pathogènes et l'abrasion par les minéraux dans le sol. Ce mécanisme entre donc également dans la définition de la décomposition des litières racinaires (pour rappel : la séquence de transformations physiques et chimiques subies par la litière racinaire du fait de l'activité biologique et de l'environnement, lui permettant d'entrer dans le compartiment sol).

(ii) La décomposition des litières racinaires, représente une entrée importante de carbone dans le sol par les racines. La décomposition des litières racinaires a lieu au cours de la vie de la racine avec la mortalité cellulaire causée par les pathogènes et l'abrasion par les minéraux du sol (mécanismes détaillés plus haut) et aussi dès la mort de la racine par les organismes du sol. Il n'est pas évident de définir la mortalité racinaire puisque la mort de cellules est graduelle et les conséquences sur le fonctionnement racinaire ne sont pas encore bien compris (Comas et al. 2000). Dans le cas des cultures annuelles, la mortalité racinaire a lieu majoritairement à la date ponctuelle de la récolte (Carvalho et al. 2013; Hirte et al. 2018)

et concerne 100% des racines. La mortalité racinaire a lieu également au cours de l'année avec le *turnover* racinaire (Gill and Jackson 2000; Houde et al. 2020), ce qui concerne principalement les espèces pérennes (Cardinael et al. 2018). Les entrées de carbone dérivé des litières racinaires *via* le mécanisme du turnover pourraient représenter 0.5 à 3 tC ha⁻¹ an⁻¹ dans des forêts à état d'équilibre (Gill and Jackson 2000; Brunner and Godbold 2007). De plus, le turnover des hyphes mycorhiziens pourrait aussi représenter une entrée significative de carbone dans le sol (Godbold et al. 2006; Ekblad et al. 2013). On sait que le *turnover* racinaire diminue avec la profondeur (Gill et al. 2002), mais trop peu d'études le quantifient et de fait les entrées annuelles de carbone dérivées des litières racinaires pérennes dans différents écosystèmes sont encore méconnues (Brunner et al. 2013).

2.3.2. Quantification

La quantification des entrées de carbone dérivé des racines est encore très peu faite dans la littérature. Pour la quantification de la rhizodéposition au champ, il n'existe pas encore de méthode fiable ; les problèmes rencontrés sont dus au fait que les microorganismes prélèvent ce carbone labile de manière continue, que les exsudats sont adsorbés par la phase solide et ne restent donc pas dans la solution du sol et aussi que du carbone provenant de la décomposition de la matière organique du sol est libéré simultanément (Oburger and Jones 2018). Concernant les entrées de carbone dérivé des litières racinaires, les mesures trouvées dans la littérature en milieu cultivé montrent des ordres de grandeur équivalents aux entrées de carbone dérivé des résidus aériens (Austin et al. 2017; Cardinael et al. 2018) (Fig. I-15).

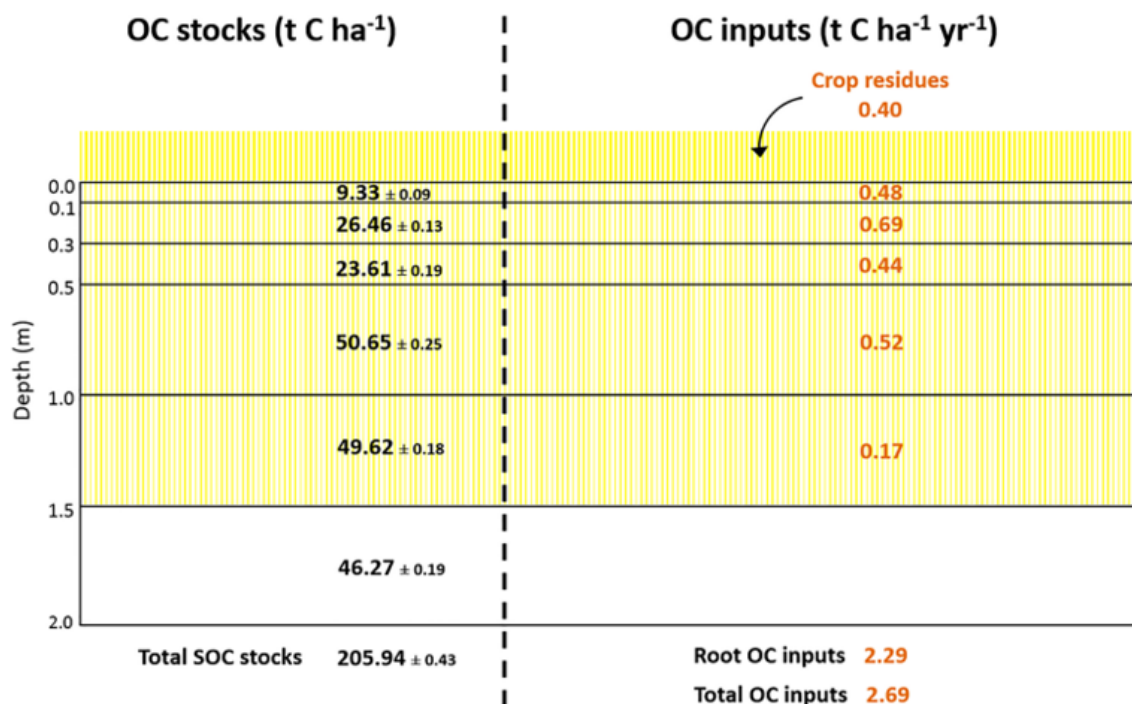


Fig. I-15 Evaluation des stocks de carbone du sol (à gauche) et des entrées de carbone des litières racinaires et des résidus aériens (à droite) jusqu'à 2 m de profondeur dans une culture annuelle en climat Méditerranéen (Cardinael et al. 2018).

Alors que la plupart des pratiques agricoles comme l'apport de compost ou de résidus de culture, la réduction du travail du sol *etc...* affectent uniquement l'horizon de sol travaillé, les racines peuvent surtout avoir un grand intérêt comme levier dans le stockage de carbone en profondeur, où elles représentent le principal apport de matière organique. En plus, les plantes avec un système racinaire profond sont plus résistantes à la sécheresse, avantage intéressant dans le contexte climatique actuel (Nakhforoosh et al. 2021). Par conséquent, il est primordial d'intégrer les horizons profonds lors de l'étude de systèmes racinaires et de leur contribution aux entrées de carbone dans le profil de sol. Cela est d'autant plus important que les mécanismes d'entrées de carbone racinaire, comme la décomposition et les réponses microbiennes à l'apport de matière organique fraîche sont fortement variables sur l'axe vertical (Salomé et al. 2010; Sanaullah et al. 2011; Pries et al. 2018).

2.4. Décomposition des litières racinaires dans le profil des sols : mesures *in situ*

La décomposition des litières racinaires (ainsi que tout résidu racinaire libéré dans le sol par rhizodéposition) est un mécanisme d'entrée du carbone racinaire dans le sol. Le temps de résidence des litières racinaires dans le sol est 2.5 fois supérieur à celui des parties aériennes (Rasse et al. 2005) du fait de mécanismes chimiques et physiques affectant les cinétiques de décomposition. Il est bien connu que la composition chimique des litières – les fractions carbonées (lignine, cellulose, hémicellulose et composés solubles) et les compositions élémentaires (carbone, azote et phosphore) – sont des drivers importants de la décomposition (Liao et al. 2022) (*cf.* partie 1.2. de la Synthèse bibliographique). En particulier, plus une racine a un gros diamètre et est ligneuse, plus son *turnover* et sa décomposition sont lents (Vanlauwe et al. 1996; Gill and Jackson 2000). Du fait de leur composition chimique, les racines fournissent des litières plus récalcitrantes que les parties aériennes de plantes, relativement considérées comme labiles (Bertrand et al. 2006; Freschet et al. 2013; Lin et al. 2020). Certaines études préfèrent comparer les ordres de ramification que les diamètres initiaux (Lin and Zeng 2017) et trouvent que les racines de premiers ordres (donc plutôt fines) contribuent plus à la matière organique du sol grâce à leur décomposition lente et malgré leur faible biomasse, en comparaison avec les racines d'ordres plus grands (Fig. I-16).

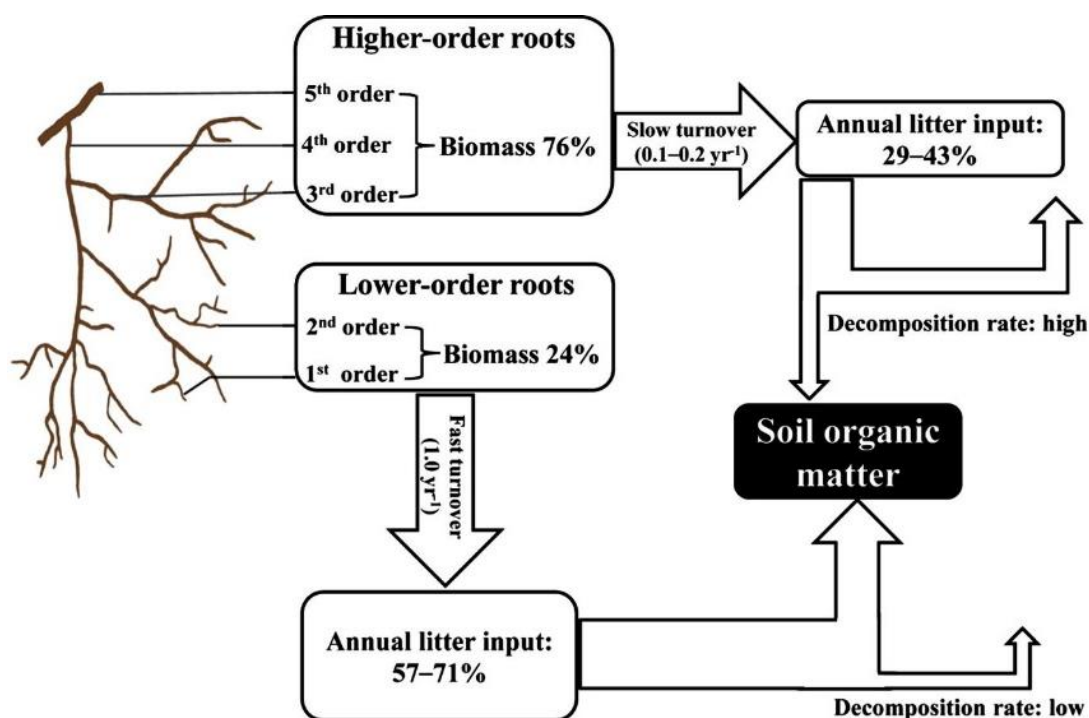


Fig. I-16 Schématisation de la contribution des litières racinaires à la matière organique du sol en fonction de leur ordre de ramification (Lin and Zeng 2017).

Malgré tout, la récalcitrance chimique des litières racinaires n'est responsable que d'un quart de la différence observée avec les parties aériennes (Rasse et al. 2005). Des mécanismes physiques de protection sont responsables de la plus grande résidence de carbone des racines que de carbone des parties aériennes, comme la protection physico-chimique, la protection à l'échelle du micromètre au travers des mycorhizes et activités des poils racinaires, et les interactions chimiques avec certains ions métalliques (Rasse et al. 2005). Dans les horizons profonds, les nombreuses différences observées par rapport aux sols de surface comme la stabilité de la température et l'humidité du sol, le manque d'oxygène, la diminution de la biomasse microbienne et la possible limitation par les nutriments (*cf.* partie 1.1. de la Synthèse bibliographique) conduisent à des cinétiques de décomposition plus lentes (Pries et al. 2018; Han et al. 2019), alors que la décomposition des parties aériennes n'a lieu que dans l'horizon labouré.

Pour évaluer *in situ* des cinétiques de décomposition des litières (racinaires ou aériennes), une méthode courante est celle des *litterbags* : une masse connue de litière est rassemblée dans un sac avec un maillage d'une taille bien précise pour laisser passer tout ou une partie seulement des organismes présents dans le sol (Lecerf 2017). Certaines études choisissent de ne permettre que la décomposition par les microorganismes avec un maillage de 0.05 mm (Goebel et al. 2011; Sun et al. 2013) ou de 0.1 mm (Vuuren et al. 1993; Solly et al. 2014). Pourtant, des fragments de racines ont été retrouvés dans le contenu des estomacs de vers, avec une certaine incertitude sur la part de racines vivantes/mortes dans leur régime alimentaire (Curry and Schmidt 2007). Parfois, plusieurs tailles de maille sont utilisées pour différencier les acteurs de la décomposition. Une revue compare les cinétiques de décomposition

racinaires en fonction des climats et qualités racinaires (Silver and Miya 2001). Parmi les 27 articles utilisés pour cette revue, 9 seulement ont comparé l'effet des tailles de maille sur la décomposition racinaire, et 1 seule étude a trouvé un effet significatif de la taille de maille, mais seulement sur les racines à très gros diamètre (Scheu and Schauer mann 1994). La revue justifie l'absence d'effet de la taille des mailles sur la décomposition des racines par l'importance relative de décomposeurs microbiens par rapport à la méso- et macrofaune, en profondeur. Cette conclusion est cependant remise en question au vu de résultats plus récents. La mésofaune contribuerait significativement à la décomposition des litières (Fujii et al. 2018). De surcroît, les racines seraient une ressource essentielle pour certaines espèces de collemboles et subiraient des processus de décomposition par la faune différents des litières aériennes (Fujii and Takeda 2012). Enfin, la contribution de la mésofaune serait plus importante pour la décomposition des racines plutôt que pour les parties aériennes (Song et al. 2020). Ces conclusions sont tirées d'expérimentations réalisées avec des *litterbags*. Et pourtant, cette méthode permet de mesurer un potentiel de décomposition et comparer des traitements entre eux, mais pas vraiment d'établir une cinétique réelle de la décomposition racinaire depuis leur apparition. En effet, l'expérience des *litterbags* est assez éloignée des conditions naturelles : racines séchées sans distinction de leur état lors de la mise en *litterbags* (vivantes ou déjà en décomposition), assemblées en fagot, isolées du sol par le *litterbag* (Li et al. 2022a)... Les quelques articles ayant travaillé avec des *root litterbags* dans des horizons profonds utilisent des racines de surface ou des pools de racines (plus faciles à récolter) mises à décomposer en profondeur (Gill and Burke 2002; Solly et al. 2015; Sun et al. 2016) au lieu d'utiliser les racines issues de chaque horizon étudié. Ceci se justifie par le travail laborieux que représente la récolte des racines, et de plus, d'importantes quantités de racines sont nécessaires pour chaque *litterbag*. Les méthodes d'imageries racinaires (scanners et minirhizotrons), qui sont largement utilisées pour mesurer *in situ* la production de racines fines, leur mortalité et leur turnover (Cheng et al. 1991; Majdi 1996), pourraient représenter une opportunité pour mesurer les cinétiques de décompositions racinaires par perte de diamètre et de longueur. Bien que de nombreuses études les citent comme une possibilité (Majdi 1996; Dannoura et al. 2008), elles ne sont pas encore utilisées à ces fins, et les études récentes préfèrent encore la technique traditionnelle des *litterbags* (Smith et al. 2014; Jani et al. 2016; Liu et al. 2021). Les minirhizotrons sont déjà utilisés pour étudier la décomposition racinaire en calculant des coefficients de mortalité et en mesurant la nécromasse racinaire (Li et al. 2020; Li et al. 2022a), mais l'observation de la perte en diamètre et en longueur racinaires n'a encore jamais été faite. Ces méthodes basées sur l'imagerie sont requises (Cotrufo and Lavelle 2022) pour suivre la décomposition des racines sans perturbation, et notamment dans le sol rhizosphérique où elle a lieu naturellement, au contraire des *litterbags* qui enfouissent les litières dans le « *bulk soil* ». Enfin, la forme circulaire des minirhizotrons présente un risque de déformation de l'image, au contraire des scanners qui sont plats (Dannoura et al. 2008), ce qui permet une meilleure observation de la perte de diamètre ou longueur de racines au cours du temps.

2.5. Impact des entrées de carbone dérivé des racines sur l'activité microbienne dans le profil de sol

En plus de contribuer directement aux stocks de carbone du sol en tant qu'entrée de carbone, la quantité et la qualité du carbone dérivé des racines varient fortement en fonction de la profondeur, contrôlent l'activité des microorganismes, peuvent faire varier leur *carbon use efficiency* et avoir un impact sur le carbone du sol en provoquant un PE (Mehnaz et al. 2019). Il s'agit d'un rôle indirect des racines sur le carbone du sol *via* un impact sur l'activité microbienne du sol sur toutes les profondeurs où elles sont présentes. L'effet profondeur n'a été que très peu testé sur la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche, puisque les études privilégient les comparaisons simples ou croisées de facteurs uniques comme différentes sources d'amendements, les conditions pédoclimatiques, les populations microbiennes *etc.* Faire varier la profondeur revient à faire varier tous les facteurs cités précédemment (*cf.* partie 1.1. de la Synthèse bibliographique), d'où toute la complexité de l'étude. Les mécanismes microbiens et de stockage de carbone peuvent très différents en fonction de la profondeur (Fontaine et al. 2007) L'article de Zhang et al. (2015) montre des modifications intéressantes des compartiments labiles et récalcitrants de carbone d'un sol profond suite à l'apport de glucose. Lü et al. (2015) démontrent une quantité de carbone minéralisé moins importante dans le sol profond (60-80 cm) que dans un sol de surface (0-10 cm) pour des zones cultivées et forestières. Dans la littérature, les articles ne s'accordent pas sur une tendance générale de réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche, et en particulier le PE, en profondeur par rapport à la surface.

Certaines études reportent un PE important en profondeur (Fontaine et al. 2007), parfois en le comparant avec un sol de surface (Karhu et al. 2016; Shahzad et al. 2019). Cette différence serait due à (i) la barrière énergétique en profondeur : la disponibilité en carbone est plus faible en profondeur qu'en surface, donc les microorganismes sont plus stimulés et réactifs par l'apport de matière organique fraîche (Shahzad et al. 2019) ; (ii) des limitations en nutriments en profondeur peuvent induire la décomposition de matière organique du sol pour respecter les besoins stœchiométriques et donc un PE important en profondeur (Chen et al. 2014) ; (iii) l'abondance relative des champignons en profondeur par rapport à la surface peut expliquer la réduction de la séparation physique entre matière organique et biomasse microbienne (Xiang et al. 2008; Salomé et al. 2010). A l'inverse, d'autres études trouvent en profondeur un PE normalisé par la teneur en carbone organique du sol plus faible ou équivalent qu'en surface (Salomé et al. 2010; de Graaff et al. 2014) et justifient ces observations par la séparation physique entre substrat et décomposeurs, limitant l'attaque microbienne. Cependant on s'aperçoit que ces études tirent leurs conclusions principalement sur les dynamiques de carbone, manquant de réellement prendre en compte le statut nutritionnel initial du sol, ni les dynamiques des nutriments au cours du temps ou encore les ratios stœchiométriques. Pourtant les nutriments pourraient jouer un rôle conséquent dans la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche (Fig. I-17) et leur impact pourrait être même prédominant dans les sols profonds. Par exemple, un PE de type *N-mining* est parfois observé suite à

l'apport de matière organique labile (molécules organiques simples) en cas de manque de nutriments (Craine et al. 2007; Fontaine et al. 2011; Chen et al. 2014). A l'inverse, la disponibilité en nutriments peut elle aussi induire des PE avec la *stoichiometric decomposition theory* (Chen et al. 2014). De plus, d'autres propriétés du sol variant entre la surface et la profondeur pourraient participer aux différences de réponse microbienne comme le pH (Blagodatskaya and Kuzyakov 2008; Luo et al. 2011), la texture (Merckx et al. 1985) et le ratio C/N du sol, qui revient à parler de disponibilité en nutriments (Sun et al. 2019).

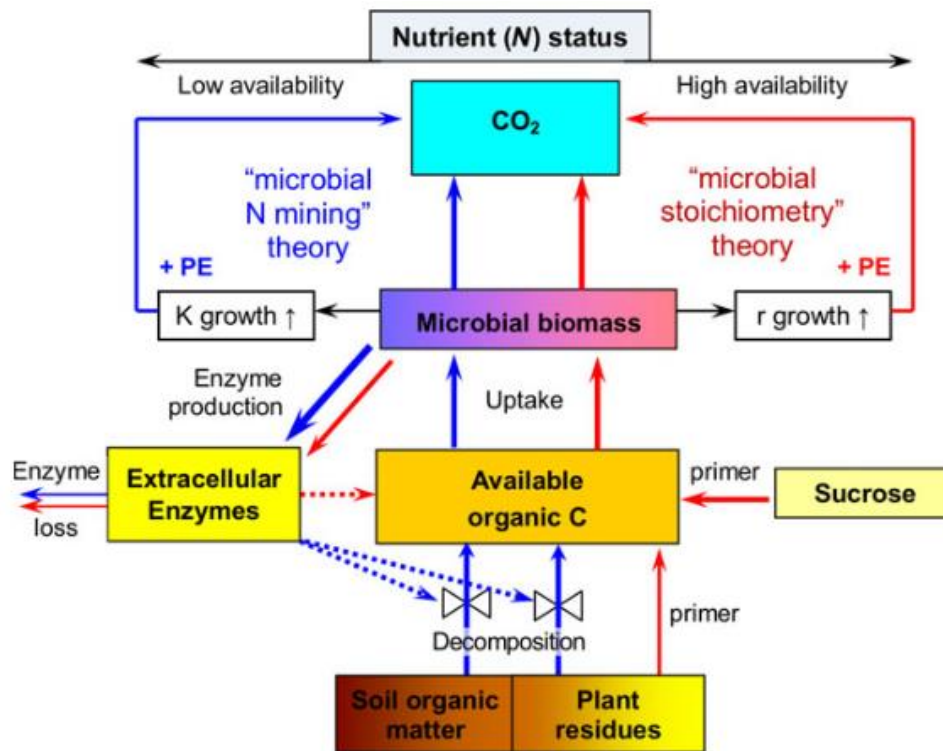


Fig. I-17 Théories explicatives du *N-mining* et de la *stoichiometric decomposition theory* selon la disponibilité en nutriments et en carbone (Chen et al. 2014).

L'importance des propriétés chimiques et physiques du sol sur la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche et leur hétérogénéité sur le profil de sol suggèrent qu'il est absolument nécessaire de prendre en compte les horizons profonds de sol dans les analyses fonctionnelles des microorganismes du sol, avant de suggérer l'augmentation de la biomasse racinaire en profondeur comme solution au stockage de carbone dans le sol. Pourtant, seules quelques études récentes analysent la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche en fonction de la profondeur en tenant compte la disponibilité des nutriments dans le sol. L'azote et le phosphore pourraient co-limiter la minéralisation de carbone en profondeur (Peixoto et al. 2021). De plus, le PE serait principalement déterminé par le déséquilibre (*imbalance*) des ratios C/N (Karhu et al. 2022) : le ratio C/N de la ressource (sol) divisé par le ratio C/N du besoin (biomasse microbienne) (Li et al. 2021). Lorsque l'apport de matière organique mène à une disponibilité équilibrée en carbone et nutriments, la décomposition de la matière organique du sol (PE) serait limitée. A l'inverse, en conditions limitantes, les microorganismes

capables de décomposer la matière organique du sol se développeraient. Les racines ayant un ratio C/N important, leur entrée dans les horizons profonds de sol, souvent déjà limités en nutriments (Jobbágy and Jackson 2001), pourrait conduire à un manque de N et induire un déstockage de carbone stabilisé *via* les mécanismes du PE.

2.6. Quantification de la contribution des racines à la respiration du sol

La respiration du sol est une composante majeure de la respiration de l'écosystème (Davidson et al. 2006). Les racines contribuent à la respiration du sol directement par la respiration autotrophe avec une part très variable selon les biomes et les espèces (Fig. I-18b), constituant une perte de carbone à l'échelle de l'écosystème. Elles contribuent également indirectement à la respiration hétérotrophe des microorganismes lorsque ces derniers décomposent le carbone dérivé des racines (Fig. I-18a), constituant une perte de carbone pour le sol. Autrement dit, la respiration du sol est fortement impactée par le métabolisme des plantes qui l'occupent, ainsi que par la décomposition de la litière fraîche, alors que les changements de stocks de carbone du sol récalcitrant n'y contribuent que faiblement (Ryan and Law 2005). De ce fait, la respiration du sol représente un bon indicateur du métabolisme de l'écosystème et un mauvais indicateur de changements en terme de stocks de carbone, et il est important de s'affranchir de la conviction que la respiration du sol provient exclusivement de la respiration hétérotrophe (Ekblad and Högberg 2001; Ryan and Law 2005).

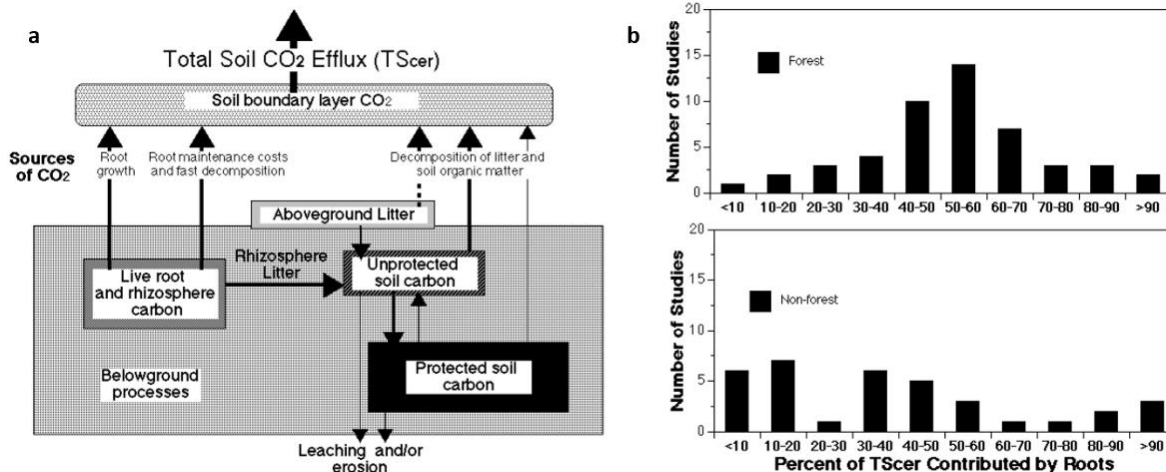


Fig. I-18 Mécanismes contribuant à la respiration du sol (a) et part de la contribution des racines à la respiration du sol (b) dans des systèmes forestiers et non forestiers (Hanson et al. 2000)

Identifier les parts des respirations hétéro- et autotrophes dans la mesure de la respiration du sol peut se révéler être un challenge dans les expérimentations *in situ*. Ces deux composantes pourraient répondre de manière différente aux facteurs environnementaux (pédoclimat). La température du sol et la teneur en azote des tissus racinaires seraient les deux facteurs principaux de la respiration autotrophe des racines (Burton et al. 2002; Roumet et al. 2006). En revanche, la respiration hétérotrophe des microorganismes dépend surtout de la quantité et la qualité du substrat disponible, la température et

l'humidité du sol (Stotzky 1965) et peut être modifiée par certaines pratiques agricoles comme le labour qui modifie la cinétique plus que la quantité de CO₂ émis par le sol (Hendrix et al. 1988). Quelques méthodes existent déjà pour séparer les deux composantes (listées ci-dessous), mais un besoin en avancées technologiques est ressenti pour séparer les contribution hétéro- et autotrophes de la respiration du sol (Ryan and Law 2005).

- Mesurer la respiration à la surface du sol dans une zone excluant les racines (Lee et al. 2003; Heinemeyer et al. 2007). Cette méthode peut être impossible à mettre en place dans certains sols caillouteux.
- Utilisation d'isotopes stables (Baggs 2006). Une part de la respiration hétérotrophe pourrait cependant contenir des molécules marquées exsudées par les racines, et donc serait comptabilisée comme respiration autotrophe.
- Annélation du tronc (Högberg et al. 2002) mais réalisable uniquement sur les arbres.
- Etablir une relation entre respiration du sol et biomasse racinaire (Wanga et al. 2005). L'ordonnée à l'origine, *i.e.* à biomasse racinaire nulle, correspondrait à la respiration hétérotrophe des microorganismes (Fig. I-19).

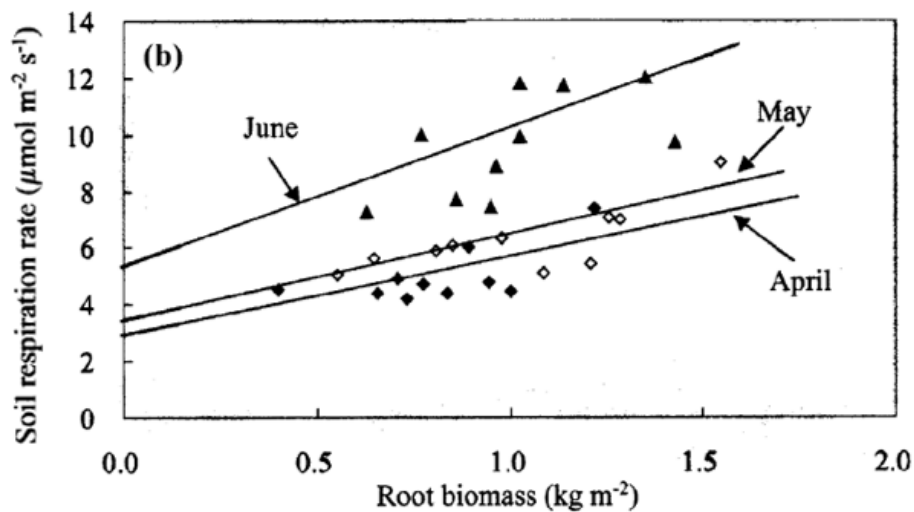


Fig. I-19 Relation entre la respiration du sol et la biomasse racinaire pour estimer la respiration hétérotrophe microbienne comme l'ordonnée à l'origine des régressions (Wanga et al. 2005).

La quantité, la qualité et la distribution du carbone dérivé des racines varient fortement selon les espèces avec un impact direct sur les mécanismes de stockage de carbone dans le sol, en plus de l'importance des conditions environnementales (pédoclimat, propriétés du sol *etc*). Les associations spatiales et temporelles (rotations) de plusieurs espèces dans une même parcelle permettent de cumuler une grande diversité de ces facteurs sur un espace déterminé, avec des conséquences sur l'utilisation des ressources et le stockage de carbone dans le sol. C'est le cas des systèmes agroforestiers.

3. Les systèmes agroforestiers et leur potentiel de stockage de carbone dans le sol

3.1. Les systèmes agroforestiers : définitions et intérêts

Le terme agroforesterie existe depuis 1977 et réfère à un concept commun de pratiques associant volontairement des arbres avec des cultures et/ou de l'élevage, avec une gestion commune des terres et des pratiques (Nair et al. 2021). Il existe un très grand nombre de déclinaisons de ces systèmes (Fig. I-20).

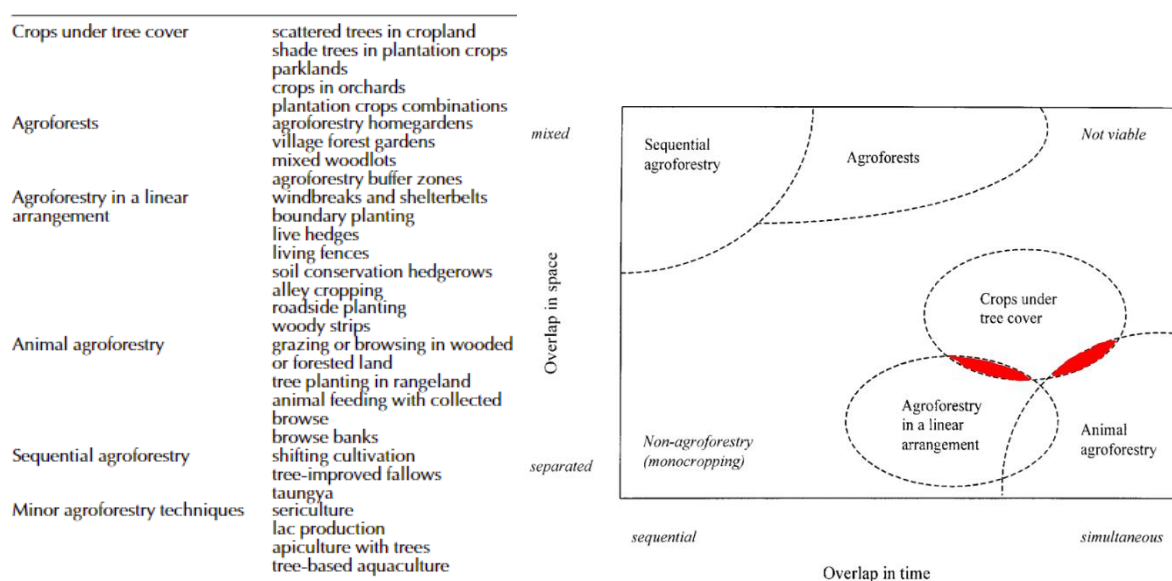


Fig. I-20 Classification des systèmes agroforestiers selon le chevauchement des productions associées dans le temps et dans l'espace (Torquebiau 2000). En rouge sont représentés les types d'agroforesterie étudiés dans cette thèse : agroforesterie associant arbres et cultures annuelles simultanément en arrangement linéaire et agroforesterie associant arbres, cultures annuelles et élevage simultanément dans des parcs (*cf.* Chapitre II – Stratégie de recherche).

Les systèmes agroforestiers sont reconnus pour leur potentiel à restaurer des terres dégradées, maintenir la fertilité du sol et favoriser le stockage de carbone, mais leur raison d'être dépend avant tout de la région du globe (Oelbermann et al. 2004). Dans les régions tropicales, les pratiques agroforestières assurent l'autosuffisance des propriétaires (Huxley 1999). En Afrique, de nombreux systèmes agroforestiers ont été maintenus depuis plusieurs années, notamment avec l'arbre *Faidherbia albida*. En

effet, les agriculteurs ont conservé cette espèce à phénologie inversée (Mokgolodi et al. 2011; Noulekoun et al. 2017) dans leurs parcelles cultivées comme partie intégrante du système afin de bénéficier d'une production supplémentaire de nourriture, fourrage, produits médicinaux, matériaux de construction *etc...* (Boffa and Nations 1999) avec la méthode de régénération naturelle assistée (Torquebiau 2022). Le botaniste André Aubréville avait en effet repéré dès 1937 « [...] des *Acacia albida* vraisemblablement introduits il y a longtemps dans les terrains de culture, et soigneusement conservés par les cultivateurs noirs » (Torquebiau 2022). En particulier, *Faidherbia albida* est une espèce fixatrice d'azote (*cf.* partie 3.2. de la Synthèse bibliographique) qui fournit donc un fourrage riche en azote et contribue à la fertilisation du sol (Mokgolodi et al. 2011). Ces systèmes sont nommés « parcs agroforestiers » et la dispersion des arbres est naturelle (Fig. I-21). A l'inverse en Europe, l'agroforesterie a été négligée pendant longtemps puisque les systèmes purs agricoles ou forestiers étaient favorisés, au profit de la mécanisation et de la séparation physique des types de production (Rigueiro-Rodríguez et al. 2008). Cependant, l'intérêt croissant pour l'agroforesterie ces dernières années (Liu et al. 2019) considère ce type d'agriculture comme un réel avantage en zone tempérée, notamment pour la gestion des ressources et la valeur financière du terrain (Williams et al. 1997). Par conséquent, on trouve plusieurs projets d'agroforesterie moderne naissant en Europe, intégrant des arbres dans les champs en arrangement linéaire pour faciliter le passage d'engins (Fig. I-22), souvent avec la présence d'une bande enherbée au pied de la ligne arborée, par rapport à l'Afrique où l'agroforesterie est plutôt un système conservé depuis un grand nombre d'années. On remarque dans la littérature que très peu d'études sont réalisées sur des systèmes agroforestiers récents et il est encore difficile de connaître la dynamique de différenciation des propriétés du sol à partir de l'introduction des arbres dans le système agricole. En Europe, les systèmes agroforestiers sont principalement concentrés dans le bassin méditerranéen (Torralba et al. 2016). Ce *hotspot* en terme d'écologie et de diversité alimentaire est une zone particulièrement affectée par les changements climatiques (Lionello et al. 2014; Tramblay et al. 2020) et l'agroforesterie pourrait contribuer à l'adaptation à ces changements (Damianidis et al. 2021). Le choix de l'arbre fait partie intégrante de tout projet de lancement d'agroforesterie. Le robinier (*Robinia pseudoacacia*) représente la 3^{ème} essence feuillue de production dans le monde, couvrant 3.2 millions d'hectares, mais fait l'objet de nombreuses controverses (Vítková et al. 2017). C'est une espèce classée envahissante car drageonnante, qui cependant représente une alternative résistante au hêtre et au chêne, grâce aux quantités et à la qualité du bois (seule espèce en milieu tempérée classée imputrescible, classe 4) qu'il produit rapidement. De plus, *R. pseudoacacia* est une espèce fixatrice d'azote.



Fig. I-21 Photographie d'un parc agroforestier à dispersion naturelle des arbres *Faidherbia albida* intégrant l'élevage au système après la récolte en saison sèche (Niakhar, Sénégal, Octobre 2021, Crédits : Christophe Jourdan).



Fig. I-22 Photographie de la récolte d'un site agroforestier en arrangement linéaire des arbres associant *Robinia pseudoacacia* avec une rotation orge / blé / légumineuse (Mauguio, France, Juin 2020, Crédits : Sébastien Rey).

L'agroforesterie permet une optimisation de l'espace, l'augmentation du rendement et de la diversité de production, l'amélioration des conditions environnementales et économiques *etc* (Fig. I-23). Les systèmes agroforestiers sont reconnus pour fournir un certain nombre de services écosystémiques (Cardinael 2015; Guillot 2018; D'Hervilly 2021).

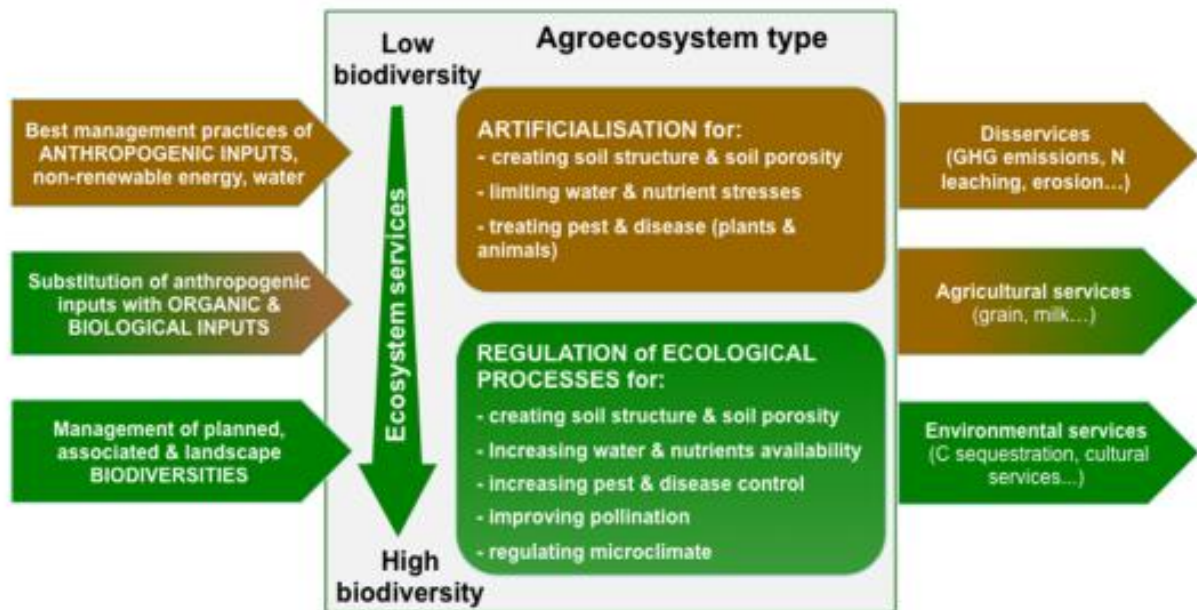


Fig. I-23 L'intérêt de la mise en place de processus écologiques dans les agroécosystèmes (Duru et al. 2015).

Les services écosystémiques sont des bénéfices pour les humains, dérivés directement ou indirectement des fonctions des écosystèmes et référant à leurs propriétés et processus biologiques ou systémiques (Costanza et al. 1997). Ce concept anthropocentré décrit les avantages conférés à la société. En particulier, augmenter la biodiversité des agrosystèmes, comme par exemple en agroforesterie, freine l'artificialisation de l'environnement et favorise les processus écologiques (Fig. I-24).

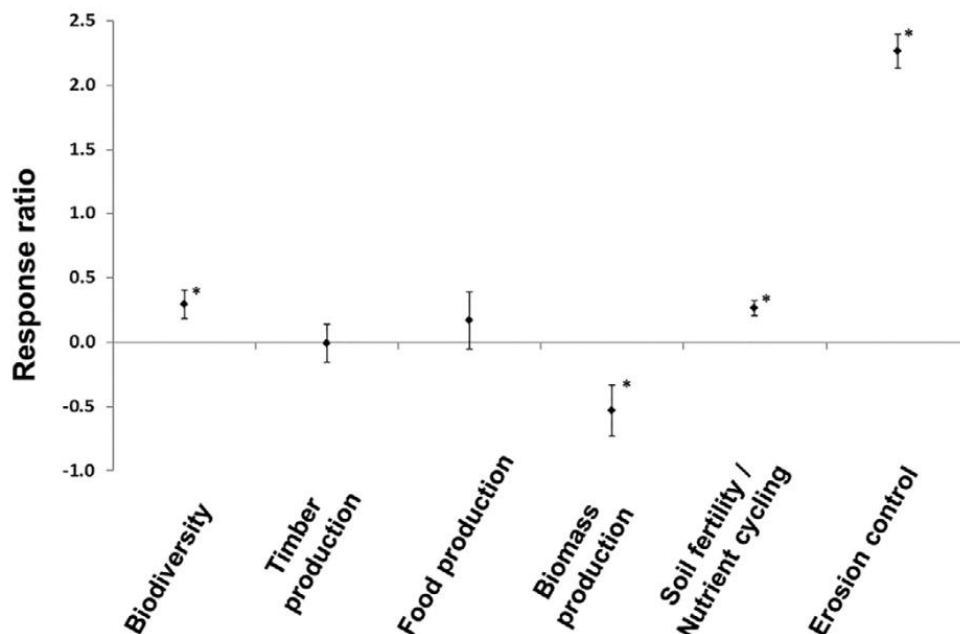


Fig. I-24 Résultats d'une revue sur l'importance des effets de l'agroforesterie sur certains services écosystémiques (Torralba et al. 2016).

Les services directs de l'agroforesterie sont seulement appréciables après plusieurs années alors que l'investissement donné aux arbres est immédiat. Cet argument freine beaucoup d'agriculteurs à associer des arbres à leur système agricole malgré l'importance des effets positifs sur les systèmes. En fait, il est nécessaire d'appréhender les dimensions sociales, culturelles et économiques avant d'entamer une transition agroforestière, car il n'y a pas que des avantages (Ollinaho and Kröger 2021). Des travaux de recherche appliquée avec des agriculteurs et croisant les points de vue des différents acteurs (Thenail et al. 2014) doivent être intensifiés afin de mieux comprendre les freins rencontrés par les agriculteurs et identifier des leviers d'action (Plieninger et al. 2020; Buck and Palumbo-Compton 2022) pour mieux promouvoir l'agroforesterie et l'adapter aux différents contextes.

3.2. Le stockage de carbone dans les systèmes agroforestiers

Parmi les services écosystémiques fournis par l'agroforesterie, le stockage de carbone dans la biomasse aérienne et dans les sols de ces systèmes est maintenant bien documenté, et le GIEC classe l'agroforesterie comme le système avec le plus haut potentiel de stockage de carbone (Watson et al. 2000) par rapport aux autres systèmes (Sanchez 2000; Sharrow and Ismail 2004; Kirby and Potvin 2007) : jachères forestières (5 à 9 tC ha⁻¹ an⁻¹), agroforesterie complexe (2 à 4 tC ha⁻¹ an⁻¹), agroforesterie simple avec une unique strate (7 à 9 tC ha⁻¹ an⁻¹) (Pandey 2002). En multipliant les strates végétales, l'agroforesterie augmente la biodiversité et la biomasse végétale (Jose and Bardhan 2012), et donc modifie la capture, la fixation et le recyclage du carbone.

3.2.1. Stockage de carbone dans la biomasse végétale

De manière générale, les biomasses végétales aériennes et souterraines sont riches en carbone et la présence d'arbres en système de culture augmente considérablement les biomasses des systèmes (Nair et al. 2009). Les arbres plus vieux sont de plus gros puits de carbone que les jeunes arbres, mais par conséquent, leur capacité à accumuler des stocks supplémentaires est plus faible (Nair et al. 2009). Le bois d'espèces à croissance lente accumule plus de carbone sur le long terme (Redondo-Brenes and Montagnini 2006). Les systèmes en climat tropical ont tendance à avoir un meilleur stockage de carbone qu'en climat tempéré, grâce à leur biomasse végétale globalement plus importante mais aussi grâce au climat humide associé à un sol plus fertile (Nair et al. 2009).

3.2.2. Stockage de carbone dans les sols

En plus du stock de carbone contenu dans la biomasse des végétaux pérennes (arbres et bande enherbée le cas échéant), l'ensemble de ces litières retournées au sol représente un apport plus important et plus diversifié en agroforesterie qu'en cultures conventionnelles (Oelbermann et al. 2004). Par conséquent, plusieurs publications démontrent un stock de carbone organique du sol plus élevé sous la ligne arborée du système agroforestier que dans l'inter-rang cultivé ou encore en monocultures (Cardinael et al. 2018). Cependant, Cardinael et al. (2018) démontrent que ce sont surtout les espèces de la bande enherbée

plutôt que les arbres qui sont responsables de l'apport important de litière aérienne et souterraine. Cette hausse de stock de carbone a été identifiée principalement dans les sols de surface (Oelbermann and Voroney 2007) et dans les fractions labiles de carbone (Cardinael et al. 2015a), les rendant facilement accessibles à la minéralisation. Cette importante entrée de matière est notamment due aux feuilles et racines des arbres et de la bande enherbée, mais aussi à la diminution du travail du sol de ce linéaire limitant la dégradation du sol et des nutriments et l'exposition de la matière organique à l'atmosphère et à l'oxydation : la protection de carbone en surface est ainsi favorisée (Hobbs 2007).

En plus des entrées de carbone dans la biomasse végétale et dans le sol, les modifications des propriétés du sol induites par la présence d'arbres dans les systèmes cultivés peuvent impacter indirectement les dynamiques de carbone du sol et donc son stockage en modifiant l'activité microbienne, le développement racinaire et aérien des cultures, le recyclage des nutriments et *in fine* le stockage du carbone dans le sol. En effet, une hétérogénéité spatiale des propriétés du sol a été démontrée dans les parcelles agroforestières en climat tempéré, avec une amélioration proche de la ligne d'arbres par rapport au milieu de l'inter-rang cultivé (Fig. I-25) (Guillot 2018; D'Hervilly 2021). Plus spécifiquement au sujet de l'activité microbienne du sol, l'agroforesterie lui serait bénéfique et pourrait même la restaurer après épuisement dû à une agriculture intensive passée (Lagerlöf et al. 2014). En effet, le lien entre la diversité des racines des plantes et la diversité microbienne a été démontré (Zak et al. 2003), et on peut s'attendre à une augmentation de la diversité des microorganismes dans les systèmes agroforestiers (Jose 2012). Cette diversité est bénéfique pour la résistance face aux stress biotiques ou abiotiques (Grover et al. 2011; Chadha et al. 2015), parfois grâce à une interaction symbiotique avec les racines des plantes par mycorhizes (Gadgil and Gadgil 1971). Costa et al. (2012) ont comparé des populations microbiennes entre trois systèmes de culture différents, en intégrant les propriétés des sols dans leur étude. Le système agroforestier présentait plus de 50% de similarités avec la forêt, notamment grâce à la richesse de la biodiversité des plantes. A l'inverse, la monoculture réduisait la diversité de filaments fongiques.

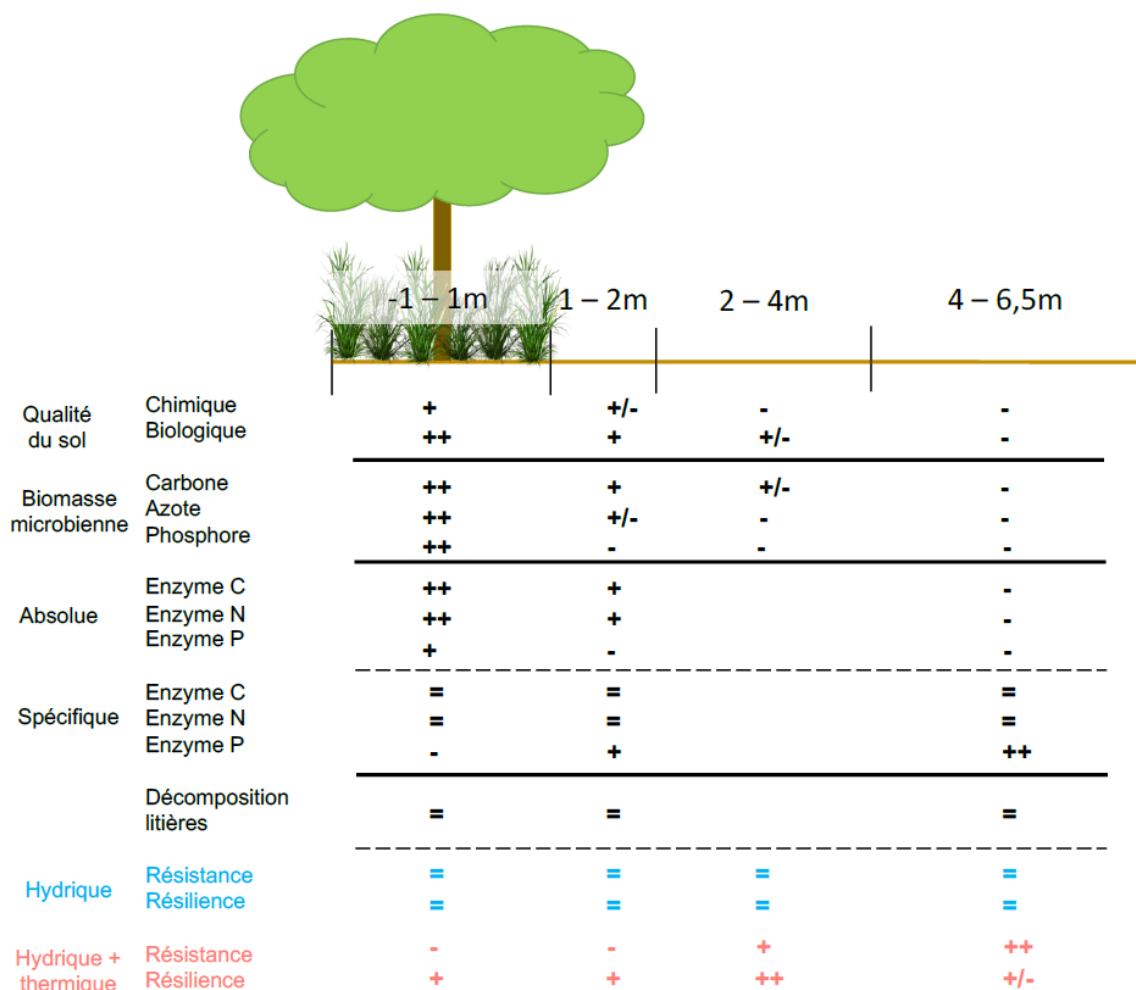


Fig. I-25 Schéma récapitulatif des tendances sur un set de variables représentatif du fonctionnement et de la stabilité écologique du sol, en système agroforestier, le long du gradient spatial (Guillot 2018).

En plus de la modification des propriétés du sol, la présence d'arbres provoque la création d'un microclimat sur la parcelle agroforestière avec un apport d'ombre et une action coupe-vent (Mume and Workalemahu 2021). Les cultures sont protégées des conditions extrêmes (températures, précipitations, vents) et certains stress évités pour optimiser l'utilisation de l'eau (Jose et al. 2004). La baisse de radiation sous la ligne arborée est démontrée (Dufour et al. 2013). Mais les effets du facteur ombre sont controversés, et pourraient être à l'origine d'une réduction du rendement à cause de compétition pour la lumière ou bien d'une limitation du stress hydrique à cause de la sécheresse. La modification de l'utilisation de l'eau, la lumière et les nutriments entraînent des relations complexes inter- et intraspécifiques, au-dessus et au-dessous de la surface du sol, avec des conséquences sur le stockage de carbone dans le profil de sol.

L'un des objectifs de l'agroforesterie est de minimiser les interactions négatives (compétition, prédation) et maximiser les interactions positives (coopération, bénéfices environnementaux) (Jose et al. 2004). La compétition pour l'eau et les nutriments est surtout visible dans les régions semi-arides, limitant le rendement des cultures annuelles (Rao et al. 1997) et modifiant la distribution des racines des arbres au

cours des quatre premières années après plantation (Upson and Burgess 2013). De plus, l'allélopathie de certaines espèces d'arbres pourrait avoir un effet négatif sur certaines cultures, par exemple à cause des exsudats racinaires (Suresh and Vinaya Rai 1987; Rizvi et al. 1999). Des travaux montrent la capacité de certaines plantes pérennes à prélever l'eau en profondeur grâce à leur système racinaire bien développé, et à redistribuer cette même eau plus en surface, par le processus nommé *hydraulic lift* (Caldwell and Richards 1989), la rendant accessible pour les plantes annuelles voisines (Corak et al. 1987; Richards and Caldwell 1987; Horton and Hart 1998).

Enfin, la capacité de certains arbres à créer une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote *via* des nodules serait un modèle pour l'agroforesterie (Mylona et al. 1995; Araujo et al. 2012) avec des conséquences sur les cycles biogéochimiques des nutriments et du carbone. La fixation d'azote n'a cependant lieu que si le sol est pauvre en azote (Nyfeler et al. 2011). Les bactéries concernées sont capables de réduire l'azote atmosphérique (N_2) en azote assimilable (ammonium) par les racines. L'azote est ainsi intégré dans le cycle biologique de l'arbre. Les parties aériennes et souterraines de l'arbre se retrouvent ainsi enrichies en azote, et la décomposition des litières lors de leur retour en sol permet *in fine* d'enrichir le sol en azote, et de le rendre accessible aux espèces non-fixatrices voisines (Drénou 2006), permettant d'augmenter le ratio aérien/racinaire (shoot:root) des végétaux (Gao et al. 2015). Les dynamiques de décomposition sont modifiées dans les systèmes avec des espèces fixatrices d'azote par rapport à des espèces non fixatrices (Zhou et al. 2018). Il a ainsi été démontré que le stockage de carbone serait plus important dans des forêts composées d'espèces fixatrices d'azote que non-fixatrices (Resh et al. 2002). Enfin, la fixation de l'azote atmosphérique augmente les rendements de cultures, diminue le besoin en fertilisants mais peut provoquer des émissions additionnelles de gaz à effets de serre (N_2O – protoxyde d'azote) par rapport à des agroforesteries utilisant des arbres non fixateurs d'azote (Masutha et al. 1997; Rosenstock et al. 2014), ce qui met en lumière les compromis à faire dans les choix des espèces en fonction des écosystèmes.

3.3. Diversité quantitative et qualitative des racines en systèmes agroforestiers

Les premières recherches sur les racines des systèmes agroforestiers datent seulement des années 1990 (Schroth 1995; Van Noordwijk and Purnomosidhi 1995; Torquebiau and Kwesiga 1996). Pourtant, les racines d'arbres des systèmes agroforestiers représentent jusqu'à 30% de la biomasse totale, voir plus en milieu tropical (Oelbermann et al. 2004; Nair et al. 2009), d'où l'intérêt de les intégrer au cycle global du carbone. Une conséquence directe de la diversité spécifique des systèmes agroforestiers est la diversité de systèmes racinaires, avec des architectures, des traits fonctionnels et des horizons d'explorations propres à chaque espèce composant le système : les arbres, les cultures annuelles et parfois les herbacées de la bande enherbée (Torquebiau 2000). En fonction du type de système agroforestier et de la position sur la parcelle agroforestière, on peut s'attendre à différentes communautés de racines résultant de l'association plurispécifique. En parc agroforestier à dispersion naturelle, on peut

s'attendre à avoir 2 communautés : 1- sous l'arbre (cohabitation de racines d'arbres et de culture sur le profil de sol) et 2- loin de l'arbre (assez loin pour ne pas trouver de racines d'arbres, seulement des racines de la culture). En système agroforestier en arrangement linéaire avec la présence d'une bande enherbée, on peut s'attendre à trouver 3 communautés : 1- dans la bande enherbée (cohabitation de racines d'arbres et d'espèces de la bande enherbée sur le profil de sol), 2- dans la culture proche de la bande enherbée (cohabitation de racines des herbacées de la bande enherbée et de la culture (Fig. I-26), parfois atteinte par l'ombre du houppier), 3- dans la culture loin de la bande enherbée (assez loin pour ne pas être sous influence des espèces pérennes). A chaque position, les communautés racinaires issues de une ou plusieurs espèces peuvent différer dans leur qualité chimique (composition chimique élémentaire : teneur en carbone, azote et phosphore et fractions carbonées : lignine, cellulose, hémicellulose et composés solubles), dynamiques (croissances et *turnover*), traits fonctionnels (longueur racinaire spécifique, densité de tissu racinaire, diamètre), structures anatomiques (taille du cylindre central, épaisseur de l'endoderme, organisation du parenchyme cortical) mais aussi dans leur compromis entre acquisition des ressources et conservation, leur distribution dans le profil de sol et la quantité de biomasse allouée dans les racines par rapport aux parties aériennes (*cf.* partie 2.2. de la Synthèse bibliographique). La caractérisation de ces différences à l'échelle des communautés en agroforesterie manque dans la littérature, surtout dans les horizons profonds de sol.

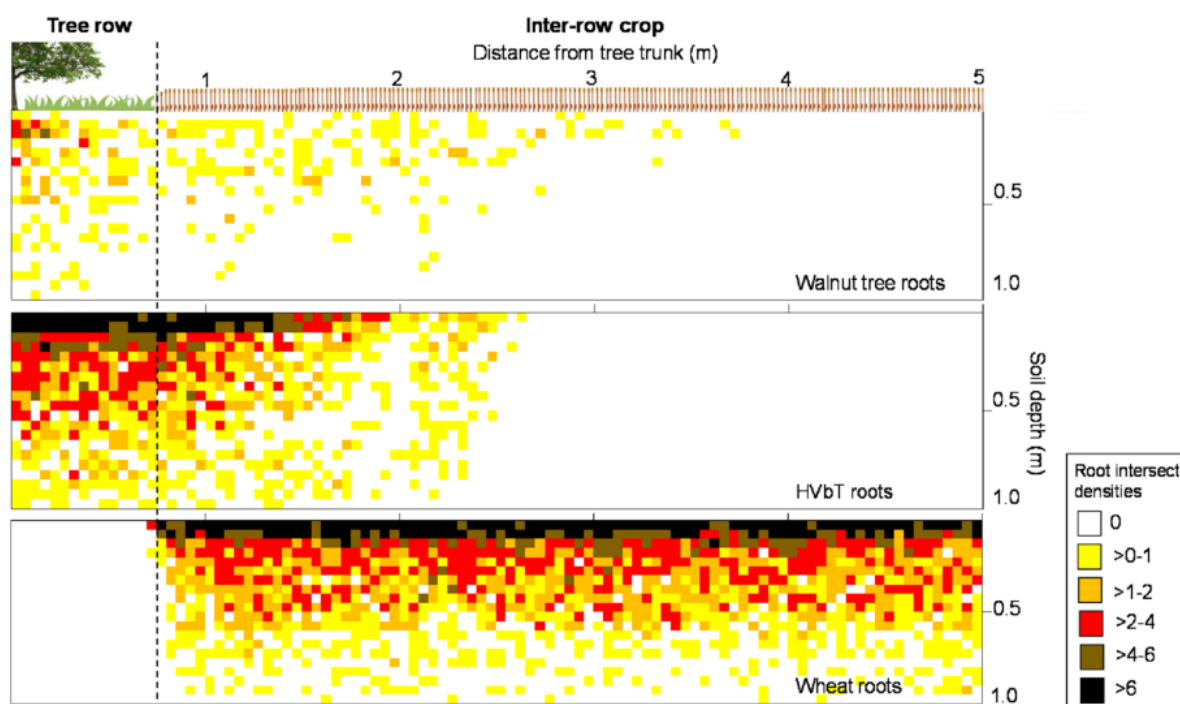


Fig. I-26 Nombre d'impacts racinaires de racines d'arbres, d'herbacées de la bande enherbée et de culture annuelle dans une fosse creusée dans un système agroforestier en arrangement linéaire, une semaine après la récolte (Battie-Laclau et al. 2020).

Dans les systèmes agroforestiers, la densité de longueurs racinaires et la densité d'intersections racinaires dans des cubes prélevés dans des fosses d'études ont permis de caractériser la distribution

spatiale des racines fines d'arbres en comparaison avec des monocultures pérennes. Cardinael et al. (2015b) obtiennent une densité d'intersections élevée sur les premiers 50 cm en monoculture, avec une diminution de cet indicateur avec la profondeur. A l'inverse en agroforesterie, la densité d'intersections était significativement moins élevée à 50 cm, puisque les racines des arbres avaient colonisé des horizons plus profonds et l'orientation était plutôt verticale. Ces résultats démontrent la plasticité du système racinaire des arbres et leur capacité à réduire la compétition avec les racines des cultures annuelles, en climat tropical (Van Noordwijk et al. 2015) comme tempéré (Cardinael et al. 2015b). Un réseau de racines pérennes intercepterait en profondeur les nutriments lessivés non absorbés par la culture selon l'hypothèse de *safety-net* (Fig. I-27).

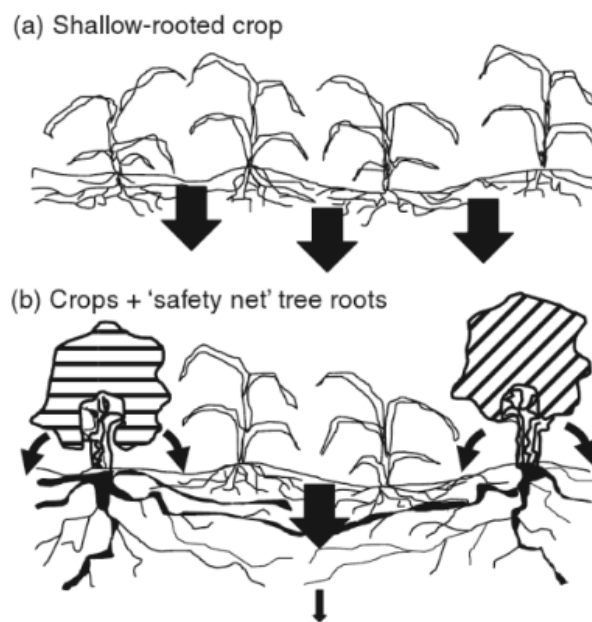


Fig. I-27 Hypothèse du *safety-net* des racines des arbres interceptant les nutriments lessivés non absorbés par les racines de la culture annuelle (Van Noordwijk et al. 2015).

Pour conclure cette synthèse bibliographique, les systèmes agroforestiers sont de véritables leviers pour le stockage de carbone dans les biomasses végétales et dans le sol ainsi que pour la continuité du cycle des nutriments (Kaur et al. 2000; Sharrow and Ismail 2004; Cardinael 2015). La complexité biologique de ces types d'agricultures imposent généralement un gradient de distance à l'arbre en terme de propriétés du sol et d'impact sur les parties aériennes des cultures (Cardinael 2015; Guillot 2018; Roupsard et al. 2020; D'Hervilly 2021). L'obstacle majeur à l'expansion de l'agroforesterie dans les pratiques agricoles est l'inexorable manque de connaissances sur les interactions entre cultures et arbres, oscillant entre compétition et facilitation. En particulier, les racines jouent un rôle important, complexe, et pas toujours positif (Dijkstra et al. 2021) dans ces interactions et *in fine* dans le stockage de carbone dans le sol et dans les cycles biogéochimiques des nutriments. Beaucoup d'articles négligent encore leur impact sur le cycle du carbone et des nutriments dans les systèmes agroforestiers, surtout en profondeur.

Références

- Angers D, Arrouays D, Cardinael R, Chenu C, Corbeels M, Demenois J, Farrell M, Martin M, Minasny B, Recous S, Six J (2022) A well-established fact: Rapid mineralization of organic inputs is an important factor for soil carbon sequestration. *European Journal of Soil Science*. <https://doi.org/10.1111/ejss.13242>
- Araujo ASF, Leite LFC, Iwata B de F, Lira M de A, Xavier GR, Figueiredo M do VB (2012) Microbiological process in agroforestry systems. A review. *Agron Sustain Dev* 32:215–226. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0026-0>
- Austin EE, Wickings K, McDaniel MD, Robertson GP, Grandy AS (2017) Cover crop root contributions to soil carbon in a no-till corn bioenergy cropping system. *GCB Bioenergy* 9:1252–1263. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12428>
- Baets SD, Poesen J, Knapen A, Galindo P (2007) Impact of root architecture on the erosion-reducing potential of roots during concentrated flow. *Earth Surface Processes and Landforms* 32:1323–1345. <https://doi.org/10.1002/esp.1470>
- Baggs EM (2006) Partitioning the components of soil respiration: a research challenge. *Plant Soil* 284:1–5. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0047-7>
- Bai X, Huang Y, Ren W, Coyne M, Jacinthe P-A, Tao B, Hui D, Yang J, Matocha C (2019) Responses of soil carbon sequestration to climate-smart agriculture practices: A meta-analysis. *Global Change Biology* 25:2591–2606. <https://doi.org/10.1111/gcb.14658>
- Balesdent J, Basile-Doelsch I, Chadoeuf J, Cornu S, Derrien D, Fekiacova Z, Hatté C (2018) Atmosphere–soil carbon transfer as a function of soil depth. *Nature* 559:599–602. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0328-3>
- Basile-Doelsch I, Balesdent J, Pellerin S (2020) Reviews and syntheses: The mechanisms underlying carbon storage in soil. *Biogeosciences* 17:5223–5242. <https://doi.org/10.5194/bg-17-5223-2020>
- Battie-Laclau P, Taschen E, Plassard C, Dezette D, Abadie J, Arnal D, Benezech P, Duthoit M, Pablo A-L, Jourdan C, Laclau J-P, Bertrand I, Taudière A, Hinsinger P (2020) Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant Soil* 453:153–171. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04181-z>
- Beniston JW, DuPont ST, Glover JD, Lal R, Dungait JAJ (2014) Soil organic carbon dynamics 75 years after land-use change in perennial grassland and annual wheat agricultural systems. *Biogeochemistry* 120:37–49. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-9980-3>
- Benizri E, Dedourge O, Dibattista-Leboeuf C, Piutti S, Nguyen C, Guckert A (2002) Effect of maize rhizodeposits on soil microbial community structure. *Applied Soil Ecology* 21:261–265. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00094-X)
- Bernard L, Basile-Doelsch I, Derrien D, Fanin N, Fontaine S, Guenet B, Karimi B, Marsden C, Maron P-A (2022) Advancing the mechanistic understanding of the priming effect on soil organic matter mineralisation. *Functional Ecology* 36:1355–1377. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14038>

- Bert D, Danjon F (2006) Carbon concentration variations in the roots, stem and crown of mature *Pinus pinaster* (Ait.). *Forest Ecology and Management* 222:279–295. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.10.030>
- Bertrand I, Chabbert B, Kurek B, Recous S (2006) Can the Biochemical Features and Histology of Wheat Residues Explain their Decomposition in Soil? *Plant Soil* 281:291–307. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4628-7>
- Bertrand I, Viaud V, Daufresne T, Pellerin S, Recous S (2019) Stoichiometry constraints challenge the potential of agroecological practices for the soil C storage. A review. *Agron Sustain Dev* 39:54. <https://doi.org/10.1007/s13593-019-0599-6>
- Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2008) Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biol Fertil Soils* 45:115–131. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0334-y>
- Blanco-Canqui H (2021) No-till technology has limited potential to store carbon: How can we enhance such potential? *Agriculture, Ecosystems & Environment* 313:107352. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107352>
- Block RMA, Van Rees KCJ, Knight JD (2006) A Review of Fine Root Dynamics in Populus Plantations. *Agroforest Syst* 67:73–84. <https://doi.org/10.1007/s10457-005-2002-7>
- Blume E, Bischoff M, Reichert JM, Moorman T, Konopka A, Turco RF (2002) Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology* 20:171–181. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00025-2)
- Boffa J-M, Nations F and AO of the U (1999) *Agroforestry Parklands in Sub-Saharan Africa*. Food & Agriculture Org.
- Bonanomi G, Idbella M, Zotti M, Santorufo L, Motti R, Maisto G, De Marco A (2021) Decomposition and temperature sensitivity of fine root and leaf litter of 43 mediterranean species. *Plant Soil* 464:453–465. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04974-1>
- Bowsher AW, Evans S, Tiemann LK, Friesen ML (2018) Effects of soil nitrogen availability on rhizodeposition in plants: a review. *Plant Soil* 423:59–85. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3497-1>
- Bronick CJ, Lal R (2005) Soil structure and management: a review. *Geoderma* 124:3–22. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.03.005>
- Brunner I, Bakker MR, Björk RG, Hirano Y, Lukac M, Aranda X, Børja I, Eldhuset TD, Helmisaari HS, Jourdan C, Konôpka B, López BC, Miguel Pérez C, Persson H, Ostonen I (2013) Fine-root turnover rates of European forests revisited: an analysis of data from sequential coring and ingrowth cores. *Plant Soil* 362:357–372. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1313-5>
- Brunner I, Godbold DL (2007) Tree roots in a changing world. *Journal of Forest Research* 12:78–82. <https://doi.org/10.1007/s10310-006-0261-4>
- Buck HJ, Palumbo-Compton A (2022) Soil carbon sequestration as a climate strategy: what do farmers think? *Biogeochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s10533-022-00948-2>
- Burton A, Pregitzer K, Ruess R, Hendrick R, Allen M (2002) Root respiration in North American forests: effects of nitrogen concentration and temperature across biomes. *Oecologia* 131:559–568. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0931-7>

- Button ES, Pett-Ridge J, Murphy DV, Kuzyakov Y, Chadwick DR, Jones DL (2022) Deep-C storage: Biological, chemical and physical strategies to enhance carbon stocks in agricultural subsoils. *Soil Biology and Biochemistry* 170:108697. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108697>
- Caldwell MM, Richards JH (1989) Hydraulic lift: water efflux from upper roots improves effectiveness of water uptake by deep roots. *Oecologia* 79:1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00378231>
- Calleja-Cabrera J, Boter M, Oñate-Sánchez L, Pernas M (2020) Root Growth Adaptation to Climate Change in Crops. *Frontiers in Plant Science* 11
- Cantarel AAM, Allard V, Andrieu B, Barot S, Enjalbert J, Gervaix J, Goldringer I, Pommier T, Saint-Jean S, Le Roux X (2021) Plant functional trait variability and trait syndromes among wheat varieties: the footprint of artificial selection. *Journal of Experimental Botany* 72:1166–1180. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa491>
- Cardinael R (2015) Stockage de carbone et dynamique des matières organiques des sols en agroforesterie sous climat méditerranéen et tempéré. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE)
- Cardinael R, Chevallier T, Barthès BG, Saby NPA, Parent T, Dupraz C, Bernoux M, Chenu C (2015a) Impact of alley cropping agroforestry on stocks, forms and spatial distribution of soil organic carbon — A case study in a Mediterranean context. *Geoderma* 259–260:288–299. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.06.015>
- Cardinael R, Guenet B, Chevallier T, Dupraz C, Cozzi T, Chenu C (2018) High organic inputs explain shallow and deep SOC storage in a long-term agroforestry system – combining experimental and modeling approaches. *Biogeosciences* 15:297–317. <https://doi.org/10.5194/bg-15-297-2018>
- Cardinael R, Mao Z, Prieto I, Stokes A, Dupraz C, Kim JH, Jourdan C (2015b) Competition with winter crops induces deeper rooting of walnut trees in a Mediterranean alley cropping agroforestry system. *Plant Soil* 391:219–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2422-8>
- Carvalho JLN, Otto R, Franco HCJ, Trivelin PCO (2013) Input of sugarcane post-harvest residues into the soil. *Sci agric (Piracicaba, Braz)* 70:336–344. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000500008>
- Chadha N, Mishra M, Rajpal K, Bajaj R, Choudhary DK, Varma A (2015) An ecological role of fungal endophytes to ameliorate plants under biotic stress. *Arch Microbiol* 197:869–881. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1130-3>
- Chen R, Senbayram M, Blagodatsky S, Myachina O, Dittert K, Lin X, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2014) Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biology* 20:2356–2367. <https://doi.org/10.1111/gcb.12475>
- Cheng W, Coleman DC, Box JE (1991) Measuring root turnover using the minirhizotron technique. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 34:261–267. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(91\)90113-C](https://doi.org/10.1016/0167-8809(91)90113-C)
- Chenu C, Angers DA, Barré P, Derrien D, Arrouays D, Balesdent J (2019) Increasing organic stocks in agricultural soils: Knowledge gaps and potential innovations. *Soil and Tillage Research* 188:41–52. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.04.011>
- Chenu C, Balabane M (2001) Matières organiques et activités biologiques des sols cultivés. Une approche des matières organiques par leurs fonctions. *Perspectives Agricoles* 42

- Chomel M, Guittonny-Larchevêque M, Fernandez C, Gallet C, DesRochers A, Paré D, Jackson BG, Baldy V (2016) Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *Journal of Ecology* 104:1527–1541. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12644>
- Comas LH, Eissenstat DM, Lakso AN (2000) Assessing root death and root system dynamics in a study of grape canopy pruning. *The New Phytologist* 147:171–178. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00679.x>
- Coppens F, Merckx R, Recous S, Garnier P (2005) Water, carbon and nitrogen dynamics in soil - Influence of crop residue location and quality
- Corak SJ, Blevins DG, Pallardy SG (1987) Water Transfer in an Alfalfa/Maize Association: Survival of Maize during Drought. *Plant Physiol* 84:582–586. <https://doi.org/10.1104/pp.84.3.582>
- Córdova SC, Olk DC, Dietzel RN, Mueller KE, Archontoulis SV, Castellano MJ (2018) Plant litter quality affects the accumulation rate, composition, and stability of mineral-associated soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 125:115–124. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.010>
- Costa PMO, Souza-Motta CM, Malosso E (2012) Diversity of filamentous fungi in different systems of land use. *Agroforestry Systems* 85:195–203
- Costanza R, d'Arge R, Groot R de, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV, Paruelo J, Raskin RG, Sutton P, Belt M van den (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>
- Cotrufo MF, Lavellee JM (2022) Soil organic matter formation, persistence, and functioning: A synthesis of current understanding to inform its conservation and regeneration. In: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp 1–66
- Cotrufo MF, Soong JL, Horton AJ, Campbell EE, Haddix ML, Wall DH, Parton WJ (2015) Formation of soil organic matter via biochemical and physical pathways of litter mass loss. *Nature Geosci* 8:776–779. <https://doi.org/10.1038/ngeo2520>
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19:988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Coûteaux M-M, Bottner P, Berg B (1995) Litter decomposition, climate and litter quality. *Trends in Ecology & Evolution* 10:63–66. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)88978-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)88978-8)
- Craine JM, Morrow C, Fierer N (2007) Microbial Nitrogen Limitation Increases Decomposition. *Ecology* 88:2105–2113. <https://doi.org/10.1890/06-1847.1>
- Curry JP, Schmidt O (2007) The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia* 50:463–477. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.09.001>
- Damianidis C, Santiago-Freijanes JJ, den Herder M, Burgess P, Mosquera-Losada MR, Graves A, Papadopoulou A, Pisanelli A, Camilli F, Rois-Díaz M, Kay S, Palma JHN, Pantera A (2021) Agroforestry as a sustainable land use option to reduce wildfires risk in European Mediterranean areas. *Agroforest Syst* 95:919–929. <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00482-w>
- Dannoura M, Kominami Y, Oguma H, Kanazawa Y (2008) The development of an optical scanner method for observation of plant root dynamics. *Plant Root* 2:14–18. <https://doi.org/10.3117/plantroot.2.14>

- Davidson EA, Richardson AD, Savage KE, Hollinger DY (2006) A distinct seasonal pattern of the ratio of soil respiration to total ecosystem respiration in a spruce-dominated forest. *Global Change Biology* 12:230–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01062.x>
- de Graaff M-A, Jastrow JD, Gillette S, Johns A, Wullschleger SD (2014) Differential priming of soil carbon driven by soil depth and root impacts on carbon availability. *Soil Biology and Biochemistry* 69:147–156. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.047>
- Deyn GBD, Cornelissen JHC, Bardgett RD (2008) Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecology Letters* 11:516–531. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01164.x>
- D’Hervilly C (2021) Impact du linéaire sous arboré sur les organismes et la fertilité du sol en système agroforestier tempéré. Montpellier, SupAgro
- Dignac M-F, Derrien D, Barré P, Barot S, Cécillon L, Chenu C, Chevallier T, Freschet GT, Garnier P, Guenet B, Hedde M, Klumpp K, Lashermes G, Maron P-A, Nunan N, Roumet C, Basile-Doelsch I (2017) Increasing soil carbon storage: mechanisms, effects of agricultural practices and proxies. A review. *Agron Sustain Dev* 37:14. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0421-2>
- Dijkstra FA, Zhu B, Cheng W (2021) Root effects on soil organic carbon: a double-edged sword. *New Phytologist* 230:60–65. <https://doi.org/10.1111/nph.17082>
- Drénou C (2006) Les Racines: Face cachée des arbres. CNPF-IDF
- Duchene O, Celette F, Barreiro A, Dimitrova Mårtensson L-M, Freschet GT, David C (2020) Introducing Perennial Grain in Grain Crops Rotation: The Role of Rooting Pattern in Soil Quality Management. *Agronomy* 10:1254. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091254>
- Dufour L, Metay A, Talbot G, Dupraz C (2013) Assessing Light Competition for Cereal Production in Temperate Agroforestry Systems using Experimentation and Crop Modelling. *Journal of Agronomy and Crop Science* 199:217–227. <https://doi.org/10.1111/jac.12008>
- Duru M, Therond O, Martin G, Martin-Clouaire R, Magne M-A, Justes E, Journet E-P, Aubertot J-N, Savary S, Bergez J-E, Sarthou JP (2015) How to implement biodiversity-based agriculture to enhance ecosystem services: a review. *Agron Sustain Dev* 35:1259–1281. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0306-1>
- Eissenstat DM, Wells CE, Yanai RD, Whitbeck JL (2000) Building roots in a changing environment: implications for root longevity. *The New Phytologist* 147:33–42. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00686.x>
- Ekblad A, Högberg P (2001) Natural abundance of ^{13}C in CO_2 respired from forest soils reveals speed of link between tree photosynthesis and root respiration. *Oecologia* 127:305–308. <https://doi.org/10.1007/s004420100667>
- Ekblad A, Wallander H, Godbold DL, Cruz C, Johnson D, Baldrian P, Björk RG, Epron D, Kieliszewska-Rokicka B, Kjoller R, Kraigher H, Matzner E, Neumann J, Plassard C (2013) The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling. *Plant Soil* 366:1–27. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1630-3>
- Engelhardt IC, Welty A, Blazewicz SJ, Bru D, Rouard N, Breuil M-C, Gessler A, Galiano L, Miranda JC, Spor A, Barnard RL (2018) Depth matters: effects of precipitation regime on soil microbial activity upon rewetting of a plant-soil system. *ISME J* 12:1061–1071. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0079-z>

- Fang C, Moncrieff JB (2005) The variation of soil microbial respiration with depth in relation to soil carbon composition. *Plant Soil* 268:243–253. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0278-4>
- Fanin N, Alavoine G, Bertrand I (2020) Temporal dynamics of litter quality, soil properties and microbial strategies as main drivers of the priming effect. *Geoderma* 377:114576. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114576>
- Feng J, Zhu B (2019) A global meta-analysis of soil respiration and its components in response to phosphorus addition. *Soil Biology and Biochemistry* 135:38–47. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.04.008>
- Ferchaud F, Vitte G, Bornet F, Strullu L, Mary B (2015) Soil water uptake and root distribution of different perennial and annual bioenergy crops. *Plant Soil* 388:307–322. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2335-y>
- Fontaine S, Barot S, Barré P, Bdioui N, Mary B, Rumpel C (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450:277–280. <https://doi.org/10.1038/nature06275>
- Fontaine S, Henault C, Aamor A, Bdioui N, Bloor JMG, Maire V, Mary B, Revaillet S, Maron PA (2011) Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43:86–96. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.017>
- Fort F, Cruz P, Lecloux E, Bittencourt de Oliveira L, Stroia C, Theau J-P, Jouany C (2016) Grassland root functional parameters vary according to a community-level resource acquisition–conservation trade-off. *Journal of Vegetation Science* 27:749–758. <https://doi.org/10.1111/jvs.12405>
- Freschet GT, Cornwell WK, Wardle DA, Elumeeva TG, Liu W, Jackson BG, Onipchenko VG, Soudzilovskaia NA, Tao J, Cornelissen JHC (2013) Linking litter decomposition of above- and below-ground organs to plant-soil feedbacks worldwide. *J Ecol* 101:943–952. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12092>
- Freschet GT, Valverde-Barrantes OJ, Tucker CM, Craine JM, McCormack ML, Violle C, Fort F, Blackwood CB, Urban-Mead KR, Iversen CM, Bonis A, Comas LH, Cornelissen JHC, Dong M, Guo D, Hobbie SE, Holdaway RJ, Kembel SW, Makita N, Onipchenko VG, Picon-Cochard C, Reich PB, de la Riva EG, Smith SW, Soudzilovskaia NA, Tjoelker MG, Wardle DA, Roumet C (2017) Climate, soil and plant functional types as drivers of global fine-root trait variation. *Journal of Ecology* 105:1182–1196. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12769>
- Frouz J (2018) Effects of soil macro- and mesofauna on litter decomposition and soil organic matter stabilization. *Geoderma* 332:161–172. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.08.039>
- Fujii S, Cornelissen JHC, Berg MP, Mori AS (2018) Tree leaf and root traits mediate soil faunal contribution to litter decomposition across an elevational gradient. *Functional Ecology* 32:840–852. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13027>
- Fujii S, Takeda H (2012) Succession of collembolan communities during decomposition of leaf and root litter: Effects of litter type and position. *Soil Biology and Biochemistry* 54:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.04.021>
- Gadgil RL, Gadgil PD (1971) Mycorrhiza and Litter Decomposition. *Nature* 233:133–133. <https://doi.org/10.1038/233133a0>

- Gao K, Chen F, Yuan L, Zhang F, Mi G (2015) A comprehensive analysis of root morphological changes and nitrogen allocation in maize in response to low nitrogen stress. *Plant, Cell & Environment* 38:740–750. <https://doi.org/10.1111/pce.12439>
- Germon A, Laclau J-P, Robin A, Jourdan C (2020) Tamm Review: Deep fine roots in forest ecosystems: Why dig deeper? *Forest Ecology and Management* 466:118135. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118135>
- Gill RA, Burke IC (2002) Influence of soil depth on the decomposition of *Bouteloua gracilis* roots in the shortgrass steppe. *Plant and Soil* 241:233–242. <https://doi.org/10.1023/A:1016146805542>
- Gill RA, Burke IC, Lauenroth WK, Milchunas DG (2002) Longevity and turnover of roots in the shortgrass steppe: influence of diameter and depth. *Plant Ecology* 159:241–251. <https://doi.org/10.1023/A:1015529507670>
- Gill RA, Jackson RB (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems: RESEARCH Root turnover in terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 147:13–31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00681.x>
- Godbold DL, Hoosbeek MR, Lukac M, Cotrufo MF, Janssens IA, Ceulemans R, Polle A, Velthorst EJ, Scarascia-Mugnozza G, De Angelis P, Miglietta F, Peressotti A (2006) Mycorrhizal Hyphal Turnover as a Dominant Process for Carbon Input into Soil Organic Matter. *Plant Soil* 281:15–24. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3701-6>
- Goebel M, Hobbie SE, Bulaj B, Zadworny M, Archibald DD, Oleksyn J, Reich PB, Eissenstat DM (2011) Decomposition of the finest root branching orders: linking belowground dynamics to fine-root function and structure. *Ecological Monographs* 81:89–102. <https://doi.org/10.1890/09-2390.1>
- Goodman AM, Crook MJ, Ennos AR (2001) Anchorage Mechanics of the Tap Root System of Winter-sown Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Annals of Botany* 87:397–404. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1347>
- Grover M, Ali SkZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World J Microbiol Biotechnol* 27:1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Guillot E (2018) Gradient spatial de fonctionnement et de stabilité écologique d'un sol en système agroforestier Méditerranéen
- Han SH, Kim S, Chang H, Kim H-J, Khamzina A, Son Y (2019) Soil depth- and root diameter-related variations affect root decomposition in temperate pine and oak forests. *Journal of Plant Ecology* 12:871–881. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtz023>
- Hanson PJ, Edwards NT, Garten CT, Andrews JA (2000) Separating root and soil microbial contributions to soil respiration: A review of methods and observations. *Biogeochemistry* 48:115–146. <https://doi.org/10.1023/A:1006244819642>
- Hartemink AE, Zhang Y, Bockheim JG, Curi N, Silva SHG, Grauer-Gray J, Lowe DJ, Krasilnikov P (2020) Chapter Three - Soil horizon variation: A review. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 125–185
- Heinemeyer A, Hartley IP, Evans SP, Carreira De La Fuente JA, Ineson P (2007) Forest soil CO₂ flux: uncovering the contribution and environmental responses of ectomycorrhizas. *Global Change Biol* 13:1786–1797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01383.x>

- Hendrix PF, Han C-R, Groffman PM (1988) Soil respiration in conventional and no-tillage agroecosystems under different winter cover crop rotations. *Soil and Tillage Research* 12:135–148. [https://doi.org/10.1016/0167-1987\(88\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0167-1987(88)90037-2)
- Hetrick BAD (1991) Mycorrhizas and root architecture. *Experientia* 47:355–362. <https://doi.org/10.1007/BF01972077>
- Hirte J, Leifeld J, Abiven S, Oberholzer H-R, Mayer J (2018) Below ground carbon inputs to soil via root biomass and rhizodeposition of field-grown maize and wheat at harvest are independent of net primary productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 265:556–566. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.010>
- Hobbs PR (2007) Conservation agriculture: what is it and why is it important for future sustainable food production? *J Agric Sci* 145:127. <https://doi.org/10.1017/S0021859607006892>
- Hobley EU, Murphy B, Simmons A (2018) Comment on “Soil organic stocks are systematically overestimated by misuse of the parameters bulk density and rock fragment content” by Poeplau et al. (2017). *SOIL* 4:169–171. <https://doi.org/10.5194/soil-4-169-2018>
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M (2009) Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321:153–187. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9929-9>
- Högberg P, Nordgren A, Ågren GI (2002) Carbon allocation between tree root growth and root respiration in boreal pine forest. *Oecologia* 132:579–581. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-0983-8>
- Holden PA, Fierer N (2005) Microbial Processes in the Vadose Zone. *Vadose Zone Journal* 4:1–21. <https://doi.org/10.2136/vzj2005.0001>
- Horton JL, Hart SC (1998) Hydraulic lift: a potentially important ecosystem process. *Trends in Ecology & Evolution* 13:232–235. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01328-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01328-7)
- Houde S, Thivierge M-N, Fort F, Bélanger G, Chantigny MH, Angers DA, Vanasse A (2020) Root growth and turnover in perennial forages as affected by management systems and soil depth. *Plant Soil* 451:371–387. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04532-1>
- Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier É, Roumet C (2007) Relating root structure and anatomy to whole-plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean species. *New Phytologist* 173:313–321. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01912.x>
- Hutchinson JJ, Campbell CA, Desjardins RL (2007) Some perspectives on carbon sequestration in agriculture. *Agricultural and Forest Meteorology* 142:288–302. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2006.03.030>
- Hütsch BW, Augustin J, Merbach W (2002) Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165:397–407. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200208\)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C)
- Huxley P (1999) Tropical agroforestry. *Tropical agroforestry*
- Jackson RB, Sperry JS, Dawson TE (2000) Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends in Plant Science* 5:482–488. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01766-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01766-0)

- Jani AD, Grossman J, Smyth TJ, Hu S (2016) Winter legume cover-crop root decomposition and N release dynamics under disking and roller-crimping termination approaches. *Renew Agric Food Syst* 31:214–229. <https://doi.org/10.1017/S1742170515000113>
- Jerneck A, Olsson L (2014) Food first! Theorising assets and actors in agroforestry: risk evaders, opportunity seekers and ‘the food imperative’ in sub-Saharan Africa. *International Journal of Agricultural Sustainability* 12:1–22. <https://doi.org/10.1080/14735903.2012.751714>
- Jobbágy EG, Jackson RB (2001) The distribution of soil nutrients with depth: Global patterns and the imprint of plants. *Biogeochemistry* 53:51–77. <https://doi.org/10.1023/A:1010760720215>
- Joergensen RG, Wichern F (2018) Alive and kicking: Why dormant soil microorganisms matter. *Soil Biology and Biochemistry* 116:419–430. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.022>
- Jones DL, Nguyen C, Finlay RD (2009) Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant Soil* 321:5–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9925-0>
- Jose S (2012) Agroforestry for conserving and enhancing biodiversity. *Agroforestry Systems* 85:1–8
- Jose S, Bardhan S (2012) Agroforestry for biomass production and carbon sequestration: an overview. *Agroforest Syst* 86:105–111. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9573-x>
- Jose S, Gillespie AR, Pallardy SG (2004) Interspecific interactions in temperate agroforestry. *Agroforestry Systems* 61:237–255. <https://doi.org/10.1023/B:AGFO.0000029002.85273.9b>
- Jourdan C, Rey H (1997) Architecture and development of the oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) root system. *Plant and Soil* 189:33–48. <https://doi.org/10.1023/A:1004290024473>
- Karhu K, Alaei S, Li J, Merilä P, Ostonen I, Bengtson P (2022) Microbial carbon use efficiency and priming of soil organic matter mineralization by glucose additions in boreal forest soils with different C:N ratios. *Soil Biology and Biochemistry* 167:108615. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108615>
- Karhu K, Hilasvuori E, Fritze H, Biasi C, Nykänen H, Liski J, Vanhala P, Heinonsalo J, Pumpanen J (2016) Priming effect increases with depth in a boreal forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 99:104–107. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.001>
- Kaur B, Gupta SR, Singh G (2000) Soil carbon, microbial activity and nitrogen availability in agroforestry systems on moderately alkaline soils in northern India. *Applied Soil Ecology* 15:283–294. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00079-2)
- Kautz T, Amelung W, Ewert F, Gaiser T, Horn R, Jahn R, Javaux M, Kemna A, Kuzyakov Y, Munch J-C, Pätzold S, Peth S, Scherer HW, Schloter M, Schneider H, Vanderborght J, Vetterlein D, Walter A, Wiesenberger GLB, Köpke U (2013) Nutrient acquisition from arable subsoils in temperate climates: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 57:1003–1022. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.09.014>
- Keiluweit M, Bougoure JJ, Nico PS, Pett-Ridge J, Weber PK, Kleber M (2015) Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nature Climate Change* 5:588–595. <https://doi.org/10.1038/nclimate2580>
- Kirby KR, Potvin C (2007) Variation in carbon storage among tree species: Implications for the management of a small-scale carbon sink project. *Forest Ecology and Management* 246:208–221. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.03.072>

- Konopka B, Pagès L, Doussan C (2009) Soil compaction modifies morphological characteristics of seminal maize roots. *Plant, Soil and Environment* 55:1
- Kumar R, Pandey S, Pandey A (2006) Plant roots and carbon sequestration. *Current Science* 91:885–890
- Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1485–1498. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00084-5)
- Kuzyakov Y, Kretschmar A, Stahr K (1999) Contribution of *Lolium perenne* rhizodeposition to carbon turnover of pasture soil. *Plant and Soil* 213:127–136. <https://doi.org/10.1023/A:1004566027237>
- Lagerlöf J, Adolfsson L, Börjesson G, Ehlers K, Vinyoles GP, Sundh I (2014) Land-use intensification and agroforestry in the Kenyan highland: Impacts on soil microbial community composition and functional capacity. *Applied Soil Ecology* 82:93–99. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.015>
- Lal R (2005) Soil erosion and carbon dynamics. *Soil and Tillage Research* 81:137–142. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.09.002>
- Lal R (2007) Carbon Management in Agricultural Soils. *Mitig Adapt Strat Glob Change* 12:303–322. <https://doi.org/10.1007/s11027-006-9036-7>
- Lavahun MFE, Joergensen RG, Meyer B (1996) Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. *Biol Fertil Soils* 23:38–42. <https://doi.org/10.1007/BF00335816>
- Lavallee JM, Soong JL, Cotrufo MF (2020) Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. *Global Change Biology* 26:261–273. <https://doi.org/10.1111/gcb.14859>
- Lecerf A (2017) Methods for estimating the effect of litterbag mesh size on decomposition. *Ecological Modelling* 362:65–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.08.011>
- Lee M, Nakane K, Nakatsubo T, Koizumi H (2003) Seasonal changes in the contribution of root respiration to total soil respiration in a cool-temperate deciduous forest. In: Abe J (ed) *Roots: The Dynamic Interface between Plants and the Earth: The 6th Symposium of the International Society of Root Research*, 11–15 November 2001, Nagoya, Japan. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 311–318
- Li J, Sang C, Yang J, Qu L, Xia Z, Sun H, Jiang P, Wang X, He H, Wang C (2021) Stoichiometric imbalance and microbial community regulate microbial elements use efficiencies under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry* 156:108207. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108207>
- Li X, Minick KJ, Li T, Williamson JC, Gavazzi M, McNulty S, King JS (2020) An improved method for quantifying total fine root decomposition in plantation forests combining measurements of soil coring and minirhizotrons with a mass balance model. *Tree Physiology* 40:1466–1473. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa074>
- Li X, Zheng X, Zhou Q, McNulty S, King JS (2022a) Measurements of fine root decomposition rate: Method matters. *Soil Biology and Biochemistry* 164:108482. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108482>
- Li Y, Gong J, Liu J, Hou W, Moroenyane I, Liu Y, Jin J, Liu J, Xiong H, Cheng C, Malik K, Wang J, Yi Y (2022b) Effects of Different Land Use Types and Soil Depth on Soil Nutrients and Soil

- Bacterial Communities in a Karst Area, Southwest China. *Soil Systems* 6:20. <https://doi.org/10.3390/soilsystems6010020>
- Liang C (2020) Soil microbial carbon pump: Mechanism and appraisal. *Soil Ecol Lett* 2:241–254. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0052-4>
- Liang C, Schimel JP, Jastrow JD (2017) The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. *Nat Microbiol* 2:1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.105>
- Liao C, Long C, Zhang Q, Cheng X (2022) Stronger effect of litter quality than micro-organisms on leaf and root litter C and N loss at different decomposition stages following a subtropical land use change. *Functional Ecology* 36:896–907. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13999>
- Lin D, Dou P, Yang G, Qian S, Wang H, Zhao L, Yang Y, Mi X, Ma K, Fanin N (2020) Home-field advantage of litter decomposition differs between leaves and fine roots. *New Phytol* nph.16517. <https://doi.org/10.1111/nph.16517>
- Lin G, Zeng D-H (2017) Heterogeneity in decomposition rates and annual litter inputs within fine-root architecture of tree species: Implications for forest soil carbon accumulation. *Forest Ecology and Management* 389:386–394. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.01.012>
- Linn DM, Doran JW (1984) Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. *Soil Science Society of America Journal* 48:1267–1272. <https://doi.org/10.2136/sssaj1984.03615995004800060013x>
- Lionello P, Abrantes F, Gacic M, Planton S, Trigo R, Ulbrich U (2014) The climate of the Mediterranean region: research progress and climate change impacts. *Reg Environ Change* 14:1679–1684. <https://doi.org/10.1007/s10113-014-0666-0>
- Liu H, Lin L, Wang H, Zhang Z, Shangguan Z, Feng X, He J-S (2021) Simulating warmer and drier climate increases root production but decreases root decomposition in an alpine grassland on the Tibetan plateau. *Plant Soil* 458:59–73. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04551-y>
- Liu T, Wang L, Feng X, Zhang J, Ma T, Wang X, Liu Z (2018) Comparing soil carbon loss through respiration and leaching under extreme precipitation events in arid and semiarid grasslands. *Biogeosciences* 15:1627–1641. <https://doi.org/10.5194/bg-15-1627-2018>
- Liu W, Yao S, Wang J, Liu M (2019) Trends and Features of Agroforestry Research Based on Bibliometric Analysis. *Sustainability* 11:3473. <https://doi.org/10.3390/su11123473>
- Loades KW, Bengough AG, Bransby MF, Hallett PD (2010) Planting density influence on fibrous root reinforcement of soils. *Ecological Engineering* 36:276–284. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.02.005>
- Lopez-Sangil L, Hartley IP, Rovira P, Casals P, Sayer EJ (2018) Drying and rewetting conditions differentially affect the mineralization of fresh plant litter and extant soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 124:81–89. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.001>
- Lü M, Xie J, Wang C, Guo J, Wang M, Liu X, Chen Y, Chen G, Yang Y (2015) Forest conversion stimulated deep soil C losses and decreased C recalcitrance through priming effect in subtropical China. *Biol Fertil Soils* 51:857–867. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1035-y>
- Lugato E, Bampa F, Panagos P, Montanarella L, Jones A (2014) Potential carbon sequestration of European arable soils estimated by modelling a comprehensive set of management practices. *Global Change Biology* 20:3557–3567. <https://doi.org/10.1111/gcb.12551>

- Luo Y, Durenkamp M, De Nobili M, Lin Q, Brookes PC (2011) Short term soil priming effects and the mineralisation of biochar following its incorporation to soils of different pH. *Soil Biology and Biochemistry* 43:2304–2314. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.07.020>
- Ma S, He F, Tian D, Zou D, Yan Z, Yang Y, Zhou T, Huang K, Shen H, Fang J (2018) Variations and determinants of carbon content in plants: a global synthesis. *Biogeosciences* 15:693–702. <https://doi.org/10.5194/bg-15-693-2018>
- Machinet GE (2009) Utilisation de la variabilité génétique du maïs pour évaluer le rôle de la qualité chimique des racines sur le processus de décomposition dans les sols. These de doctorat, Reims
- Majdi H (1996) Root sampling methods - applications and limitations of the minirhizotron technique. *Plant Soil* 185:255–258. <https://doi.org/10.1007/BF02257530>
- Makita N, Hirano Y, Mizoguchi T, Kominami Y, Dannoura M, Ishii H, Finér L, Kanazawa Y (2011) Very fine roots respond to soil depth: biomass allocation, morphology, and physiology in a broad-leaved temperate forest. *Ecological Research* 26:95–104. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0764-5>
- Makkonen M, Berg MP, Handa IT, Hättenschwiler S, Ruijven J van, Bodegom PM van, Aerts R (2012) Highly consistent effects of plant litter identity and functional traits on decomposition across a latitudinal gradient. *Ecology Letters* 15:1033–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01826.x>
- Masutha TH, Muofhe ML, Dakora FD (1997) Evaluation of N₂ fixation and agroforestry potential in selected tree legumes for sustainable use in South Africa. *Soil Biology and Biochemistry* 29:993–998. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00216-7)
- Mehnaz KR, Corneo PE, Keitel C, Dijkstra FA (2019) Carbon and phosphorus addition effects on microbial carbon use efficiency, soil organic matter priming, gross nitrogen mineralization and nitrous oxide emission from soil. *Soil Biology and Biochemistry* 134:175–186. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.04.003>
- Merckx R, den Hartog A, van Veen JA (1985) Turnover of root-derived material and related microbial biomass formation in soils of different texture. *Soil Biology and Biochemistry* 17:565–569. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90026-4)
- Micuți M-M, Bădulescu L, Israel-Roming F (2017) A review on the enzymatic indicators for monitoring soil quality. *Scientific Bulletin XXI*:6
- Minasny B, Malone BP, McBratney AB, Angers DA, Arrouays D, Chambers A, Chaplot V, Chen Z-S, Cheng K, Das BS, Field DJ, Gimona A, Hedley CB, Hong SY, Mandal B, Marchant BP, Martin M, McConkey BG, Mulder VL, O'Rourke S, Richer-de-Forges AC, Odeh I, Padarian J, Paustian K, Pan G, Poggio L, Savin I, Stolbovoy V, Stockmann U, Sulaeman Y, Tsui C-C, Vågen T-G, van Wesemael B, Winowiecki L (2017) Soil carbon 4 per mille. *Geoderma* 292:59–86. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.01.002>
- Mokgolodi NC, Setshogo MP, Shi L, Liu Y, Ma C (2011) Achieving food and nutritional security through agroforestry: a case of *Faidherbia albida* in sub-Saharan Africa. *For Stud China* 13:123–131. <https://doi.org/10.1007/s11632-011-0202-y>
- Müller K, Kramer S, Haslwimmer H, Marhan S, Scheunemann N, Butenschön O, Scheu S, Kandeler E (2016) Carbon transfer from maize roots and litter into bacteria and fungi depends on soil depth and time. *Soil Biology and Biochemistry* 93:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.10.015>

- Mume ID, Workalemahu S (2021) Review on Windbreaks Agroforestry as a Climate Smart Agriculture Practices. *AJAF* 9:342. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20210906.12>
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *The plant Cell* 7:869–885
- Nair PKR, Kumar BM, Nair VD (2021) Definition and Concepts of Agroforestry. In: Nair PKR, Kumar BM, Nair VD (eds) *An Introduction to Agroforestry: Four Decades of Scientific Developments*. Springer International Publishing, Cham, pp 21–28
- Nair PKR, Nair VD, Kumar BM, Haile SG (2009) Soil carbon sequestration in tropical agroforestry systems: a feasibility appraisal. *Environmental Science & Policy* 12:1099–1111. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.01.010>
- Nakhforoosh A, Nagel KA, Fiorani F, Bodner G (2021) Deep soil exploration vs. topsoil exploitation: distinctive rooting strategies between wheat landraces and wild relatives. *Plant Soil* 459:397–421. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04794-9>
- Naylor D, McClure R, Jansson J (2022) Trends in Microbial Community Composition and Function by Soil Depth. *Microorganisms* 10:540. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030540>
- Noulekoun F, Birhane E, Chude S, Zenebe A (2017) Characterization of *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. population in agroforestry parklands in the highlands of Northern Ethiopia: impact of conservation, environmental factors and human disturbances. *Agroforest Syst* 91:123–135. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9910-6>
- Nyfelner D, Huguenin-Elie O, Suter M, Frossard E, Lüscher A (2011) Grass–legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.11.022>
- Oburger E, Jones DL (2018) Sampling root exudates – Mission impossible? *Rhizosphere* 6:116–133. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004>
- Oelbermann M, Paul Voroney R, Gordon AM (2004) Carbon sequestration in tropical and temperate agroforestry systems: a review with examples from Costa Rica and southern Canada. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 104:359–377. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.04.001>
- Oelbermann M, Voroney RP (2007) Carbon and nitrogen in a temperate agroforestry system: Using stable isotopes as a tool to understand soil dynamics. *Ecological Engineering* 29:342–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.09.014>
- Ollinaho OI, Kröger M (2021) Agroforestry transitions: The good, the bad and the ugly. *Journal of Rural Studies* 82:210–221. <https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2021.01.016>
- Olson KR, Al-Kaisi MM, Lal R, Lowery B (2014) Experimental Consideration, Treatments, and Methods in Determining Soil Organic Carbon Sequestration Rates. *Soil Science Society of America Journal* 78:348–360. <https://doi.org/10.2136/sssaj2013.09.0412>
- Pagliai M, Vignozzi N, Pellegrini S (2004) Soil structure and the effect of management practices. *Soil and Tillage Research* 79:131–143. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.07.002>
- Pandey DN (2002) Carbon sequestration in agroforestry systems. *Climate Policy* 2:367–377. <https://doi.org/10.3763/cpol.2002.0240>

- Pausch J, Kuzyakov Y (2018) Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology* 24:1–12. <https://doi.org/10.1111/gcb.13850>
- Peixoto L, Elsgaard L, Rasmussen J, Olesen JE (2021) Nitrogen and phosphorus co-limit mineralization of labile carbon in deep subsoil. *European Journal of Soil Science* 72:1879–1884. <https://doi.org/10.1111/ejss.13083>
- Pellerin S (ed), Bamiere L (ed), Launay C, Martin R, Schiavo M, Angers D, Augusto L, Balesdent J, Basile-Doelsch I, Bellassen V, Cardinael R, Cécillon L, Ceschia E, Chenu C, Constantin J, Darroussin J, Delacote P, Delame N, Gastal F, Gilbert D, Graux A-I, Guenet B, Houot S, Klumpp K, Letort E, Litrico I, Martin M, Menasseri S, Meziere D, Morvan T, Mosnier C, Roger-Estrade J, Saint-André L, Sierra J, Théron O, Viaud V, Gâteau R, Le Perchec S, Savini I, Réchauchère O (2019) Stocker du carbone dans les sols français. Quel potentiel au regard de l'objectif 4 pour 1000 et à quel coût ? Ed. Quae
- Picon-Cochard C, Pilon R, Tarroux E, Pagès L, Robertson J, Dawson L (2012) Effect of species, root branching order and season on the root traits of 13 perennial grass species. *Plant Soil* 353:47–57. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1007-4>
- Piotrowska-Długosz A, Długosz J, Frąç M, Gryta A, Breza-Boruta B (2022a) Enzymatic activity and functional diversity of soil microorganisms along the soil profile – A matter of soil depth and soil-forming processes. *Geoderma* 416:115779. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115779>
- Piotrowska-Długosz A, Długosz J, Gryta A, Frąç M (2022b) Responses of N-Cycling Enzyme Activities and Functional Diversity of Soil Microorganisms to Soil Depth, Pedogenic Processes and Cultivated Plants. *Agronomy* 12:264. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020264>
- Plieninger T, Muñoz-Rojas J, Buck LE, Scherr SJ (2020) Agroforestry for sustainable landscape management. *Sustain Sci* 15:1255–1266. <https://doi.org/10.1007/s11625-020-00836-4>
- Poeplau C, Vos C, Don A (2017) Soil organic carbon stocks are systematically overestimated by misuse of the parameters bulk density and rock fragment content. *SOIL* 3:61–66. <https://doi.org/10.5194/soil-3-61-2017>
- Poirier V, Roumet C, Munson AD (2018) The root of the matter: Linking root traits and soil organic matter stabilization processes. *Soil Biology and Biochemistry* 120:246–259. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.02.016>
- Pries CEH, Sulman BN, West C, O'Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Prieto I, Roumet C, Cardinael R, Dupraz C, Jourdan C, Kim JH, Maeght JL, Mao Z, Pierret A, Portillo N, Rroupsard O, Thammahacksa C, Stokes A (2015) Root functional parameters along a land-use gradient: evidence of a community-level economics spectrum. *Journal of Ecology* 103:361–373. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12351>
- Prieto I, Stokes A, Roumet C (2016) Root functional parameters predict fine root decomposability at the community level. *Journal of Ecology* 104:725–733. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12537>
- Rao MR, Nair PKR, Ong CK (1997) Biophysical interactions in tropical agroforestry systems. *Agroforestry Systems* 38:3–50. <https://doi.org/10.1023/A:1005971525590>
- Rasmussen C, Heckman K, Wieder WR, Keiluweit M, Lawrence CR, Berhe AA, Blankinship JC, Crow SE, Druhan JL, Hicks Pries CE, Marin-Spiotta E, Plante AF, Schädel C, Schimel JP, Sierra CA,

- Thompson A, Wagai R (2018) Beyond clay: towards an improved set of variables for predicting soil organic matter content. *Biogeochemistry* 137:297–306. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0424-3>
- Rasse DP, Rumpel C, Dignac M-F (2005) Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil* 269:341–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0907-y>
- Redondo-Brenes A, Montagnini F (2006) Growth, productivity, aboveground biomass, and carbon sequestration of pure and mixed native tree plantations in the Caribbean lowlands of Costa Rica. *Forest Ecology and Management* 232:168–178. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.067>
- Remus R, Augustin J (2016) Dynamic linking of ¹⁴C partitioning with shoot growth allows a precise determination of plant-derived C input to soil. *Plant Soil* 408:493–513. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3006-y>
- Resh SC, Binkley D, Parrotta JA (2002) Greater Soil Carbon Sequestration under Nitrogen-fixing Trees Compared with Eucalyptus Species. *Ecosystems* 5:217–231. <https://doi.org/10.1007/s10021-001-0067-3>
- Richards JH, Caldwell MM (1987) Hydraulic lift: Substantial nocturnal water transport between soil layers by *Artemisia tridentata* roots. *Oecologia* 73:486–489. <https://doi.org/10.1007/BF00379405>
- Ridgeway JR, Morrissey EM, Brzostek ER (2022) Plant litter traits control microbial decomposition and drive soil carbon stabilization. *Soil Biology and Biochemistry* 175:108857. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108857>
- Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J, Mosquera-Losada MR (2008) *Agroforestry in Europe: Current Status and Future Prospects*. Springer Science & Business Media
- Rizvi SJH, Tahir M, Rizvi V, Kohli RK, Ansari A (1999) Allelopathic Interactions in Agroforestry Systems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:773–796. <https://doi.org/10.1080/07352689991309487>
- Rosenstock T, Tully K, Arias-Navarro C, Neufeldt H, Butterbach-Bahl K, Verchot L (2014) Agroforestry with N₂-fixing trees: sustainable development's friend or foe? *Current Opinion in Environmental Sustainability* 6:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.09.001>
- Roumet C, Urcelay C, Díaz S (2006) Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist* 170:357–368. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01667.x>
- Roupsard O, Audebert A, Ndour AP, Clermont-Dauphin C, Agbohessou Y, Sanou J, Koala J, Faye E, Sambakhe D, Jourdan C, le Maire G, Tall L, Sanogo D, Seghieri J, Cournac L, Leroux L (2020) How far does the tree affect the crop in agroforestry? New spatial analysis methods in a *Faidherbia parkland*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 296:106928. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106928>
- Rumpel C, Amiraslani F, Chenu C, Garcia Cardenas M, Kaonga M, Koutika L-S, Ladha J, Madari B, Shirato Y, Smith P, Soudi B, Soussana J-F, Whitehead D, Wollenberg E (2020) The 4p1000 initiative: Opportunities, limitations and challenges for implementing soil organic carbon sequestration as a sustainable development strategy. *Ambio* 49:350–360. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01165-2>
- Ryan MG, Law BE (2005) Interpreting, measuring, and modeling soil respiration. *Biogeochemistry* 73:3–27. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-5167-7>

- Salomé C, Nunan N, Pouteau V, Lerch TZ, Chenu C (2010) Carbon dynamics in topsoil and in subsoil may be controlled by different regulatory mechanisms. *Global Change Biology* 16:416–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01884.x>
- Sanaullah M, Chabbi A, Leifeld J, Bardoux G, Billou D, Rumpel C (2011) Decomposition and stabilization of root litter in top- and subsoil horizons: what is the difference? *Plant Soil* 338:127–141. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0554-4>
- Sanaullah M, Chabbi A, Maron P-A, Baumann K, Tardy V, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y, Rumpel C (2016) How do microbial communities in top- and subsoil respond to root litter addition under field conditions? *Soil Biology and Biochemistry* 103:28–38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.017>
- Sanchez PA (2000) Linking climate change research with food security and poverty reduction in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 82:371–383. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00238-3)
- Sanderman J, Hengl T, Fiske GJ (2017) Soil carbon debt of 12,000 years of human land use. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:9575–9580. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706103114>
- Scheu S, Schauermaun J (1994) Decomposition of roots and twigs: Effects of wood type (beech and ash), diameter, site of exposure and macrofauna exclusion. *Plant Soil* 163:13–24. <https://doi.org/10.1007/BF00033936>
- Schollenberger CJ (1945) Determination of soil organic matter. *Soil Science* 59:53–56
- Schroth G (1995) Tree root characteristics as criteria for species selection and systems design in agroforestry. In: Sinclair FL (ed) *Agroforestry: Science, Policy and Practice: Selected papers from the agroforestry sessions of the IUFRO 20th World Congress, Tampere, Finland, 6–12 August 1995*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 125–143
- Shahzad T, Anwar F, Hussain S, Mahmood F, Arif MS, Sahar A, Nawaz MF, Perveen N, Sanaullah M, Rehman K, Rashid MI (2019) Carbon dynamics in surface and deep soil in response to increasing litter addition rates in an agro-ecosystem. *Geoderma* 333:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.018>
- Sharrow SH, Ismail S (2004) Carbon and nitrogen storage in agroforests, tree plantations, and pastures in western Oregon, USA. *Agroforestry Systems* 60:123–130. <https://doi.org/10.1023/B:AGFO.0000013267.87896.41>
- Silver WL, Miya RK (2001) Global patterns in root decomposition: comparisons of climate and litter quality effects. *Oecologia* 129:407–419. <https://doi.org/10.1007/s004420100740>
- Smith A (1932) Seasonal subsoil temperature variations. *Journal of Agricultural Research* 44:421–428
- Smith SW, Woodin SJ, Pakeman RJ, Johnson D, Wal R van der (2014) Root traits predict decomposition across a landscape-scale grazing experiment. *New Phytologist* 203:851–862. <https://doi.org/10.1111/nph.12845>
- Solly EF, Schöning I, Boch S, Kandeler E, Marhan S, Michalzik B, Müller J, Zscheischler J, Trumbore SE, Schrupf M (2014) Factors controlling decomposition rates of fine root litter in temperate forests and grasslands. *Plant Soil* 382:203–218. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2151-4>

- Solly EF, Schöning I, Herold N, Trumbore SE, Schrumpf M (2015) No depth-dependence of fine root litter decomposition in temperate beech forest soils. *Plant Soil* 393:273–282. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2492-7>
- Song X, Wang Z, Tang X, Xu D, Liu B, Mei J, Huang S, Huang G (2020) The contributions of soil mesofauna to leaf and root litter decomposition of dominant plant species in grassland. *Applied Soil Ecology* 155:103651. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103651>
- Spohn M (2020) Increasing the organic carbon stocks in mineral soils sequesters large amounts of phosphorus. *Global Change Biology* 26:4169–4177. <https://doi.org/10.1111/gcb.15154>
- Stotzky G (1965) Microbial Respiration. In: *Methods of Soil Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 1550–1572
- Sun T, Dong L, Zhang L, Wu Z, Wang Q, Li Y, Zhang H, Wang Z (2016) Early Stage Fine-Root Decomposition and Its Relationship with Root Order and Soil Depth in a *Larix gmelinii* Plantation. *Forests* 7:234. <https://doi.org/10.3390/f7100234>
- Sun T, Mao Z, Dong L, Hou L, Song Y, Wang X (2013) Further evidence for slow decomposition of very fine roots using two methods: litterbags and intact cores. *Plant Soil* 366:633–646. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1457-3>
- Sun Z, Liu S, Zhang T, Zhao X, Chen S, Wang Q (2019) Priming of soil organic carbon decomposition induced by exogenous organic carbon input: a meta-analysis. *Plant Soil* 443:463–471. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04240-5>
- Suresh KK, Vinaya Rai RS (1987) Studies on the allelopathic effects of some agroforestry tree crops. *International Tree Crops Journal* 4:109–115. <https://doi.org/10.1080/01435698.1987.9752816>
- Swarup A, Manna MC, Singh GB (2000) Impact of Land Use and Management Practices on Organic Carbon Dynamics in Soils of India. In: *Global Climate Change and Tropical Ecosystems*. CRC Press
- Tao Z, Neil E, Si B (2021) Determining deep root water uptake patterns with tree age in the Chinese loess area. *Agricultural Water Management* 249:106810. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106810>
- Terrer C, Phillips RP, Hungate BA, Rosende J, Pett-Ridge J, Craig ME, van Groenigen KJ, Keenan TF, Sulman BN, Stocker BD, Reich PB, Pellegrini AFA, Pendall E, Zhang H, Evans RD, Carrillo Y, Fisher JB, Van Sundert K, Vicca S, Jackson RB (2021) A trade-off between plant and soil carbon storage under elevated CO₂. *Nature* 591:599–603. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03306-8>
- Thenail C, Viaud V, Hao H (2014) Initial Stakeholder Meeting Report Bocage agroforestry in Brittany, France. Agforward, Agroforestry for Europe, Plouguenast Municipality, Brittany, France
- Torquebiau E (2022) Le livre de l'agroforesterie: comment les arbres peuvent sauver l'agriculture. Actes sud, Arles
- Torquebiau EF (2000) A renewed perspective on agroforestry concepts and classification. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 323:1009–1017. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(00\)01239-7](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(00)01239-7)
- Torquebiau EF, Kwesiga F (1996) Root development in a *Sesbania sesban* fallow-maize system in Eastern Zambia. *Agroforest Syst* 34:193–211. <https://doi.org/10.1007/BF00148162>

- Torralba M, Fagerholm N, Burgess PJ, Moreno G, Plieninger T (2016) Do European agroforestry systems enhance biodiversity and ecosystem services? A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 230:150–161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.002>
- Tramblay Y, Llasat MC, Randin C, Coppola E (2020) Climate change impacts on water resources in the Mediterranean. *Reg Environ Change* 20:83. <https://doi.org/10.1007/s10113-020-01665-y>
- Tückmantel T, Leuschner C, Preusser S, Kandeler E, Angst G, Mueller CW, Meier IC (2017) Root exudation patterns in a beech forest: Dependence on soil depth, root morphology, and environment. *Soil Biology and Biochemistry* 107:188–197. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.01.006>
- Upton MA, Burgess PJ (2013) Soil organic carbon and root distribution in a temperate arable agroforestry system. *Plant Soil* 373:43–58. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1733-x>
- Van Groenigen KJ (2022) Limits and Benefits of Soil Carbon Sequestration in Croplands.
- Van Noordwijk M, Lawson G, Hairiah K, Wilson J (2015) Root distribution of trees and crops: competition and/or complementarity. *Tree–Crop Interactions: Agroforestry in a Changing Climate* CABI, Wallingford, UK 221–257
- Van Noordwijk M, Purnomosidhi P (1995) Root architecture in relation to tree-soil-crop interactions and shoot pruning in agroforestry. In: Sinclair FL (ed) *Agroforestry: Science, Policy and Practice: Selected papers from the agroforestry sessions of the IUFRO 20th World Congress, Tampere, Finland, 6–12 August 1995*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 161–173
- Vanlauwe B, Nwoke OC, Sanginga N, Merckx R (1996) Impact of residue quality on the C and N mineralization of leaf and root residues of three agroforestry species. *Plant Soil* 183:221–231. <https://doi.org/10.1007/BF00011437>
- Vítková M, Müllerová J, Sádlo J, Pergl J, Pyšek P (2017) Black locust (*Robinia pseudoacacia*) beloved and despised: A story of an invasive tree in Central Europe. *Forest Ecology and Management* 384:287–302. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.10.057>
- Vuuren MMIV, Berendse F, Visser WD (1993) Species and site differences in the decomposition of litters and roots from wet heathlands. *Can J Bot* 71:167–173. <https://doi.org/10.1139/b93-019>
- Wang J, Defrenne C, McCormack ML, Yang L, Tian D, Luo Y, Hou E, Yan T, Li Z, Bu W, Chen Y, Niu S (2021) Fine-root functional trait responses to experimental warming: a global meta-analysis. *New Phytologist* 230:1856–1867. <https://doi.org/10.1111/nph.17279>
- Wang Y, Dong X, Wang H, Wang Z, Gu J (2016) Root tip morphology, anatomy, chemistry and potential hydraulic conductivity vary with soil depth in three temperate hardwood species. *Tree Physiol* 36:99–108. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv094>
- Wanga W, Ohse K, Liu J, Mo W, Oikawab T (2005) Contribution of root respiration to soil respiration in a C3/C4 mixed grassland. *J Biosci* 30:507–514. <https://doi.org/10.1007/BF02703725>
- Watson RT, Noble IR, Bolin B, Ravindranath NH, Verardo DJ, Dokken DJ (2000) *Land Use, Land-Use Change, and Forestry — IPCC*. Cambridge University Press, The Edinburgh Building Shaftesbury Road, Cambridge CB2 2RU ENGLAND
- Weemstra M, Mommer L, Visser EJW, van Ruijven J, Kuyper TW, Mohren GMJ, Sterck FJ (2016) Towards a multidimensional root trait framework: a tree root review. *New Phytologist* 211:1159–1169. <https://doi.org/10.1111/nph.14003>

-
- Wickings K, Grandy AS, Reed SC, Cleveland CC (2012) The origin of litter chemical complexity during decomposition. *Ecology Letters* 15:1180–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01837.x>
- Williams PA, Gordon AM, Garrett HE, Buck L (1997) Agroforestry in North America and its role in farming systems. *Temperate agroforestry systems* 9–84
- Xiang S-R, Doyle A, Holden PA, Schimel JP (2008) Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.004>
- Zak DR, Holmes WE, White DC, Peacock AD, Tilman D (2003) PLANT DIVERSITY, SOIL MICROBIAL COMMUNITIES, AND ECOSYSTEM FUNCTION: ARE THERE ANY LINKS? *Ecology* 84:2042–2050. <https://doi.org/10.1890/02-0433>
- Zhang D, Hui D, Luo Y, Zhou G (2008) Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology* 1:85–93. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtn002>
- Zhang Y, Yao S, Mao J, Oik DC, Cao X, Zhang B (2015) Chemical composition of organic matter in a deep soil changed with a positive priming effect due to glucose addition as investigated by ¹³C NMR spectroscopy. *Soil Biology and Biochemistry* 85:137–144. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.013>
- Zhou G, Zhang J, Qiu X, Wei F, Xu X (2018) Decomposing litter and associated microbial activity responses to nitrogen deposition in two subtropical forests containing nitrogen-fixing or non-nitrogen-fixing tree species. *Sci Rep* 8:12934. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30666-5>

CHAPITRE II

STRATÉGIE DE RECHERCHE

1. Objectifs

La précédente synthèse bibliographique identifie les rôles que peuvent jouer les racines dans les stocks de carbone dans le sol. Ils peuvent être directs avec les entrées de carbone dérivé des racines *via* la rhizodéposition lorsque la plante est vivante et *via* la décomposition des litières racinaires (mortalité de la plante lors de la récolte ou *turnover*). Ils peuvent aussi être indirects avec l'impact de ces entrées sur le carbone du sol et sur les dynamiques des nutriments du sol. Les racines représentent en ce sens un levier d'action pour augmenter le stockage de carbone dans le sol. En système agroforestier, l'association spatiale de plusieurs espèces végétales suggère une diversité de systèmes racinaires variés en termes de biomasse, distribution et caractéristiques, et pourrait représenter une opportunité d'optimisation de l'utilisation des ressources et des entrées de carbone dérivé des racines. Cependant des informations précises manquent à ce sujet dans la littérature, surtout dans les horizons profonds de sol.

L'objectif général de cette thèse est d'**évaluer la contribution des racines d'espèces pérennes et annuelles aux stocks de carbone dans les sols agroforestiers, en étudiant leurs biomasses, distributions et propriétés, ainsi que la décomposition de leurs litières et l'impact sur l'activité microbienne.**

Remarque 1 – Les horizons profonds de sol. La prise en compte des horizons profonds de sol est nécessaire dans les études sur les stocks et flux de carbone dans le sol. En effet, comme mis en évidence par la synthèse bibliographique, les sols profonds ont un fonctionnement microbiologique et des conditions édaphiques généralement très différents de ceux en surface et auraient donc des mécanismes de flux de carbone potentiellement différents. Par conséquent, cette thèse intègre ses études jusqu'à la profondeur maximale d'enracinement des cultures annuelles (100 à 150 cm de profondeur) et on considère un sol comme profond lorsqu'il se trouve sous la zone travaillée.

Remarque 2 – Les nutriments. Les questions de stœchiométrie dans le vivant rendent obligatoire la prise en compte des cycles biogéochimiques des nutriments (azote et phosphore principalement) dans les études sur les stocks et flux de carbone dans le sol. Les différentes études réalisées dans cette thèse considèrent lorsque possible les quantités et les flux des nutriments du le sol : l'azote, et parfois le phosphore.

Remarque 3 – La rhizodéposition. Comme relevé dans le chapitre précédent, la quantification de la rhizodéposition présente un réel challenge méthodologique qu'il n'a pas été possible d'aborder dans cette thèse. Cette thèse se concentre donc sur les litières racinaires et ne prend pas en compte l'étude du processus de rhizodéposition.

De l'objectif général découlent trois questions détaillées ci-dessous avec leurs hypothèses respectives rédigées d'après la synthèse bibliographique (Fig. II-1).

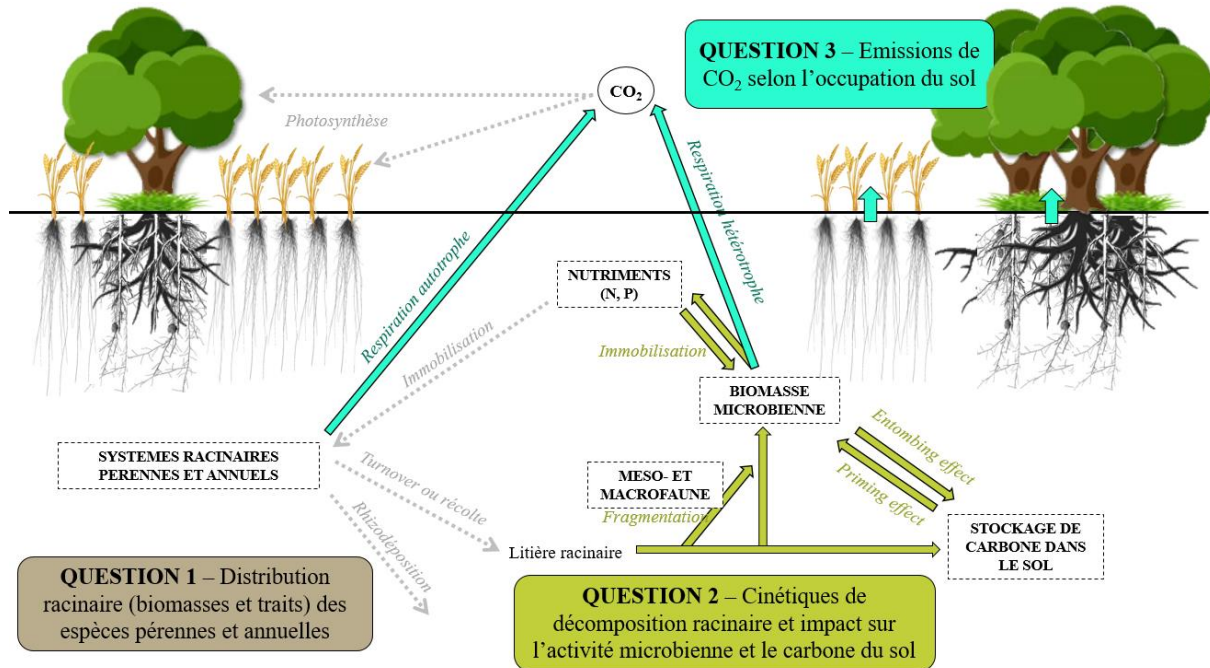


Fig. II-1 Schéma récapitulatif des 3 questions de recherche de la thèse dans le cycle simplifié du carbone dans un agroécosystème. Les flèches colorées représentent les flux ou les mécanismes mesurés et les flèches en pointillées représentent des flux non mesurés. La question 3 est la seule partie de la thèse comparant le système agroforestier à des systèmes de culture annuelle pure et plantation d'arbres équivalents (cf. Fig. II-8). La rhizodéposition n'est pas reliée au reste du cycle de façon exacte par soucis de simplification car elle n'est pas traitée dans la thèse. La bande enherbée est représentée sur ce schéma mais parfois elle est absente (cas du parc agroforestier).

Question 1 – Quelle est la distribution spatiale (horizontale et verticale) des systèmes racinaires (biomasses et traits) des différentes espèces dans les systèmes agroforestiers étudiés ?

H-1.1. Sur le gradient vertical, la distribution et les traits des systèmes racinaires sont principalement impactés par les propriétés physico-chimiques du sol. Sur le gradient horizontal, la distribution et les traits des systèmes racinaires sont hétérogènes en relation avec (i) la cohabitation d'espèces pérennes et annuelles dans le système (appartenance aux différentes espèces et interactions interspécifiques) et (ii) la différenciation des propriétés physico-chimiques du sol selon la distance à l'arbre. En plus, le partage de ressource lumineuse et le microclimat variables en fonction de la distance à l'arbre peuvent également impacter localement les conditions d'humidité et de température.

H-1.2. Les entrées de carbone dérivé des litières racinaires des espèces pérennes et des cultures annuelles dans les différents horizons de sol, ont une contribution significative sur les parcelles agroforestières. De plus, parmi elles, celles des espèces pérennes (arbres et herbacées de la bande enherbée le cas échéant) représentent une part significative, et notamment en profondeur.

Question 2 – Quelles sont les cinétiques de décomposition des racines dans les systèmes agroforestiers et quelles conséquences sur l'activité microbienne et le carbone de la matière organique des sols ?

H-2.1. En plus de varier avec la profondeur du fait de la pédologie, les conditions bio-physico-chimiques des sols des systèmes agroforestiers ont la spécificité de varier avec la distance à l'arbre. Par conséquent, la décomposition des litières racinaires serait plus lente en profondeur qu'en surface, et plus lente loin de l'arbre que sous l'arbre.

H-2.2. Le suivi de la décomposition racinaire reste un challenge avec la méthode des *litterbags*. Un système d'imagerie enterré permettrait d'appréhender la décomposition *in situ* soit dans la rhizosphère sans remaniement du sol, en présence des microorganismes et de la faune autochtone et sans manipulation des racines (lavage, tri, mise en sachet *etc...*).

H-2.3. La stœchiométrie des éléments carbone, azote et phosphore contrôle la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche dans le sol. Dans les horizons profonds d'enracinement, la limitation en nutriments serait responsable d'un *priming effect* plus important qu'en surface. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'intensité du *priming effect* est réduite si la limitation en nutriments est levée dans les horizons de sol profonds.

Question 3 – Quelle est l'importance et l'hétérogénéité (spatiale et temporelle) de la contribution racinaire à la respiration des sols agroforestiers par rapport aux cultures pures (sans arbres) et aux plantations d'arbres conduites en conditions équivalentes ?

H-3.1. Dans les systèmes agroforestiers, l'hétérogénéité spatiale de la respiration des sols selon la distance à l'arbre s'explique par l'hétérogénéité spatiale de la respiration autotrophe, contrôlée par la biomasse et les traits racinaires, et de la respiration hétérotrophe, contrôlée par la biomasse microbienne et les sources de matière organique, du fait de la différenciation des propriétés physico-chimiques du sol et des pratiques agricoles.

H-3.2. Dans les systèmes agroforestiers, il y a une hétérogénéité temporelle de la respiration des sols en fonction de la distance à l'arbre, car les racines des espèces pérennes sont présentes toute l'année et les racines vivantes des cultures annuelles sont présentes uniquement entre le semis et la récolte. L'écart entre la respiration du sol de la bande enherbée et celle de l'inter-rang cultivé serait plus important hors période cultivée.

2. Présentation des 2 sites d'étude

Parmi les 4 sites inclus dans le projet DSCATT – Dynamic of Soil Carbon sequestration in Tropical and Temperate agricultural systems (France, Zimbabwe, Kenya et Sénégal), les 2 sites agroforestiers expérimentaux et instrumentés ont été choisis pour répondre aux objectifs de la thèse : Faidherbia-Flux (Sénégal, Fig. II-2) et DIAMS (France, Fig. II-3). Les caractéristiques de ces sites sont résumées dans le Tableau II-1.



Fig. II-2 Photographie du site Faidherbia-Flux (Niakhar, Sénégal, Octobre 2021, Crédits : Lorène Siegwart)

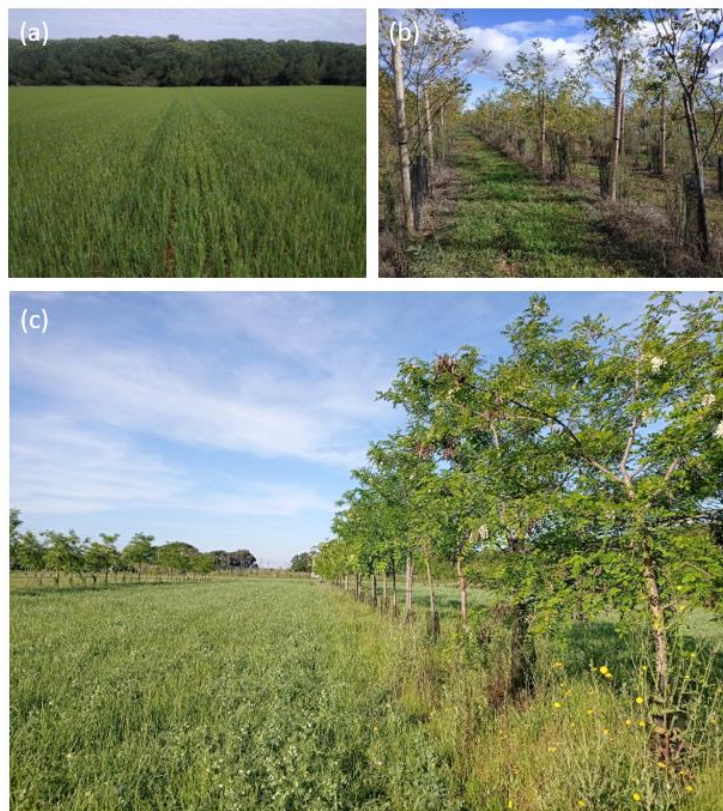


Fig. II-3 Photographie du site DIAMS : a) culture annuelle pure (Mai 2021), b) plantation d'arbres (Octobre 2020) et c) agroforesterie en arrangement linéaire (Mauguio, France, Juin 2022, Crédits : Lorène Siegwart)

Tableau II-1 Caractéristiques des sites d'étude

	Faidherbia-Flux	DIAMS
Localisation	Dans le bassin arachidier du Sénégal, plus précisément sur la commune de Sob, à 6 km au Nord-Ouest de Niakhar (région de Bambey-Fattick) au sein de l'Observatoire Santé Population Environnement de l'IRD 14.495833°N; -16.453333°W	A Manguio, situé à 10 km au Sud-Est de Montpellier (Hérault) au sein d'une station expérimentale INRAE (UE Diascope) 7 ha divisés en 3 blocs indépendants constituant des réplicats, chacun regroupant 3 usages des sols : culture annuelle pure, plantation d'arbres et agroforesterie 43.612°N; 3.976°E
Climat	1 saison sèche de 8 mois (novembre-juin) et 1 saison humide de 4 mois (juillet-octobre) ; une moyenne de 500 mm de précipitations annuelles	Tempéré méditerranéen (4 saisons) : caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers doux et humides
Type d'agroforesterie	Parc agroforestier mature de type agrosylvo-pastoralisme à dispersion naturelle des arbres : 6.8 arbres ha ⁻¹ et couverture du houppier au sol : 5.14 % Elevage : bétail gardé à l'ombre des arbres en saison sèche	Système agroforestier récent (arbres plantés en 2017) en arrangement linéaire : 294 arbres ha ⁻¹ espacés de 2 m (vs. 1693 arbres ha ⁻¹ dans la plantation) Largeur de l'interrang cultivé : 15 m Largeur de la bande enherbée : 2 m
Arbre	<i>Faidherbia albida</i> dominant Espèce fixatrice d'azote (légumineuse) Phénologie inversée : feuillage pendant la saison sèche et arbre nu pendant la saison humide Espèce phréatophyte : racines atteignant la nappe	<i>Robinia pseudoacacia</i> Espèce fixatrice d'azote (légumineuse) Croissance rapide
Instrumentation et suivi du site	Site ancien suivi depuis 1965. Instrumentation en 2017 avec 3 tours à flux eddy covariance et 3 puits profonds pour le suivi racinaire et eau, suivi du rendement des parcelles...	Site récent suivi depuis la plantation des arbres en 2017. Instrumentation en cours jusque 3 m de profondeur avec des sondes température et humidité du sol, des bougies poreuses, des scanners...
Gestion des parcelles	Agriculteur selon pratiques habituelles : (travail du sol jusque 10 cm de profondeur avec une charrue tractée par un cheval, semis manuel ou semoir tracté, désherbage manuel avec hilaire ; pas de fertilisants organo-minéraux)	UE Diascope en discussion avec UMR Eco&Sols pour une logique d'apports d'engrais raisonnés (dernier apport P-K en 2018 (faible intrant) et apports N selon plan de fumure), limitation du travail du sol malgré la menace des adventices et de la compaction du sol et traitement phytosanitaires classés IFT1 (1 ou 2 désherbage, fongicide et insecticide)
Rotation cultures annuelles	Arachide (légumineuse) – <i>Arachis hypogaea</i> (2019, 2021) Mil (graminée) – <i>Pennisetum glaucum</i> variété 'Souna' (2020, 2022)	Blé dur d'hiver (graminée) – <i>Triticum turgidum</i> L. subsp. <i>durum</i> (2020) Orge de printemps (graminée) – <i>Hordeum vulgare</i> (2021) Pois protéagineux (légumineuse) – <i>Pisum sativum</i> (2022)

Sol	Arenosols, très sableux (+70%), pauvres en argile, carbone organique (<10 g kg ⁻¹) et en nutriments	Rhodic Skeleton Luvisols, limoneux en surface et argileux en profondeur, pauvre en carbone (<10 g kg ⁻¹) et en nutriments, très riche en cailloux
Carbonates	<1 g kg ⁻¹	<1 g kg ⁻¹ entre 0 et 150 cm de profondeur puis > 400 g kg ⁻¹ entre 150 et 200 cm

Les horizons de sol sont difficilement identifiables sur le profil de Faidherbia-Flux (Fig. II-4). Ces sols sont classés comme Arenosols : très riches en sable (Fig. II-6) et assez homogènes sur tout le profil enraciné par la culture annuelle (jusque 150 cm de profondeur maximum).



Fig. II-4 Photographie d'un profil de sol sur le site Faidherbia-Flux jusque 150 cm de profondeur. Chaque carré de la grille fait 10 cm².

Sur le site DIAMS, les luvisols sont des sols plus complexes et une analyse pédologique en début de thèse a permis de caractériser précisément le profil de sol jusque 165 cm de profondeur et d'identifier les horizons de sol sur une fosse par bloc. Les 3 blocs présentent des profils variables mais caractéristiques du type de sol de la zone d'étude (Fig. II-5). Deux horizons labourés appelés Ap1 (0 à 20 cm) et Ap2 (20 à 40-60 cm) sont identifiés avec une structure grumeleuse. Ensuite, deux horizons Bt1 (40-60 à 80-120) très riches en cailloux et Bt2 (80-120 à 125-140 cm) sans cailloux traduisent une éluviation avec une teneur importante en argile. Dans le bloc 1, un 5^{ème} horizon appelé IICk est issu de

la roche mère avec une accumulation de carbonates. Les expériences menées sur DIAMS dans le cadre de cette thèse se sont basées sur cette analyse pédologique pour étudier un horizon à 0-20 cm de profondeur correspondant à Ap1, puis 20-50 cm pour Ap2 et 50-100 pour Bt, comprenant Bt1 et Bt2 (Fig. II-6).

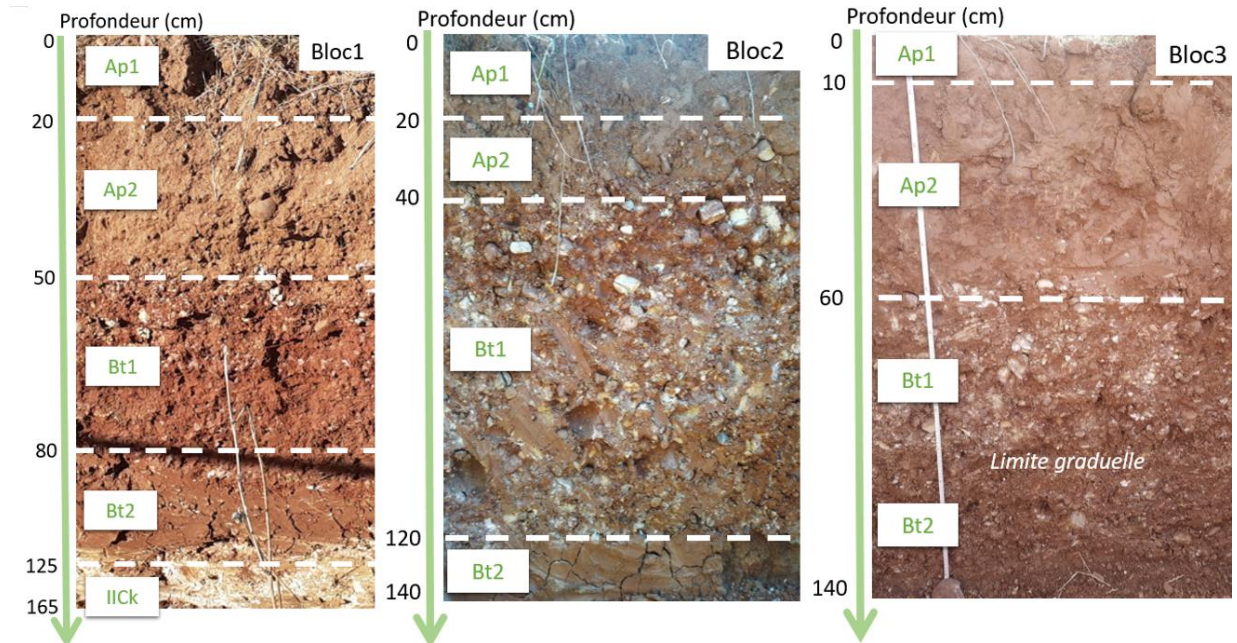


Fig. II-5 Identification des horizons dans les profils de sols de chacun des 3 blocs sur le site DIAMS en fonction de la profondeur.

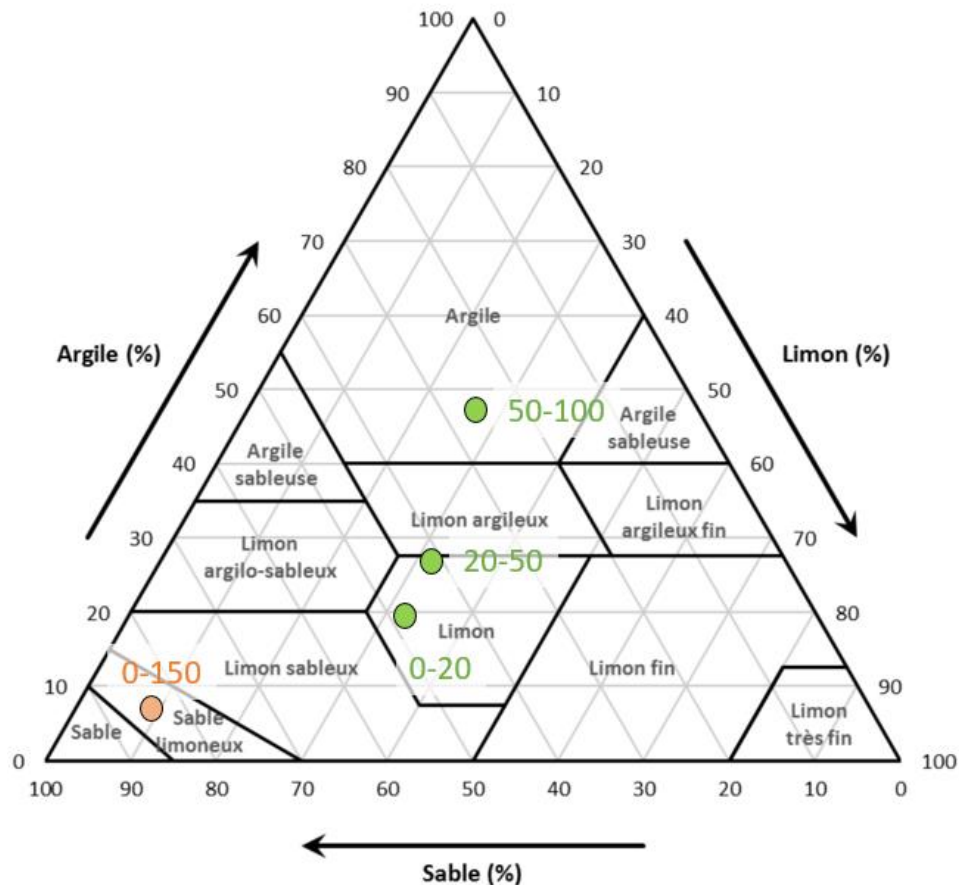


Fig. II-6 Sols de DIAMS (en vert les 3 horizons identifiés 0-20, 20-50 et 50-100 cm de profondeur) et de Faidherbia-Flux (en orange, l'intégralité du profil) dans un triangle des textures.

La description précédente illustre le contraste fort entre les 2 sites d'étude, tant dans leur contexte pédologique, y compris climatique, que les itinéraires techniques agricoles qui y sont menés. Ainsi, il ne sera pas possible de comparer les données des deux sites ; aucune publication scientifique commune aux 2 sites n'est donc envisagée dans le cadre de cette thèse. Toutefois, une confrontation légère des ordres de grandeurs sera tentée dans le Chapitre VI – Discussion générale, parce que s'agissant de 2 systèmes agroforestiers avec des arbres fixateurs d'azote, une rotation légumineuse/céréale, en climat sec et un sol dépourvu de carbonates (sur les profondeurs étudiées). Ces 2 sites ne représentent qu'un échantillon de la diversité des systèmes agroforestiers possibles, mais illustrent la complexité au sein et entre ces systèmes ; ils représentent une opportunité de tester des hypothèses communes (citées précédemment) dans des contextes et organisations très différents.

3. Démarche expérimentale

3.1. Stratégie générale de réponse à l'objectif de la thèse

Pour répondre aux 3 questions de recherche en utilisant les 2 sites agroforestiers proposés, le choix d'une approche expérimentale avec des expérimentations *in situ* a été privilégié, ce qui n'est pas courant. En effet, cette thèse vise à quantifier des stocks et des flux de carbone, ainsi que les cinétiques des mécanismes mis en jeu sur le court terme, comme représenté sur la Fig. II-1. Par conséquent, 5 études *in situ* ont permis des quantifications réelles des stocks et des flux, et 1 étude au laboratoire sur des sols fraîchement échantillonnés à différentes profondeurs du site DIAMS a permis d'avancer la compréhension de mécanismes microbiens. Ces 6 études correspondent aux 6 articles scientifiques rédigés. Ces articles sont répartis dans 3 chapitres, chacun axé autour d'une des 3 questions de la thèse (tableau II-2).

Les 2 sites d'études n'ont pas bénéficié du même investissement au cours de la thèse. Seulement 2 études ont été conduites sur Faidherbia-Flux et 4 sur DIAMS. Il ne s'agissait pas d'un choix mais d'une adaptation obligatoire aux contraintes rencontrées. En effet, la situation sanitaire mondiale (COVID-19), débutant juste après le début de la thèse, a significativement impacté la stratégie prévue initialement ; la première campagne terrain sur DIAMS a été décalée et l'échantillonnage revu à la baisse, le terrain au Sénégal réduit à une mission tardive d'une durée de seulement 3 semaines. De plus, il n'y a pas eu d'expérimentation visant à évaluer la respiration du sol sur Faidherbia-Flux puisqu'elle est déjà traitée dans un autre projet, dans le cadre de la thèse de Seydina Ba (en cours).

Tableau II-2 Organisation générale de la thèse. **Question 1** – Quelle est la distribution spatiale (horizontale et verticale) des systèmes racinaires (biomasses et traits) des différentes espèces cohabitant dans les systèmes agroforestiers étudiés ?, **Question 2** – Quelles sont les cinétiques de décomposition des racines dans les systèmes agroforestiers et quelles conséquences sur l'activité microbienne et le carbone de la matière organique des sols ?, **Question 3** – Quelle est l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la contribution racinaire à la respiration des sols agroforestiers par rapport aux cultures pures (sans arbres) et aux plantations d'arbres conduites en conditions équivalentes ?

Chapitre	Site concerné	N° article et type d'expérimentation	Hypothèses associées	Type d'expérimentation	Dimension spatiale	Dimension temporelle
Distribution racinaire (biomasse et traits) des espèces pérennes et annuelles en système agroforestier Question 1 – Chapitre III	Faidherbia-Flux	Article 1	H-1.1. H-1.2.	<i>In situ</i> : échantillonnage sur le terrain	Profondeur × Distance à l'arbre	Echantillonnage à date de la floraison de la culture
	DIAMS	Article 2	H-1.1. H-1.2.	<i>In situ</i> : échantillonnage sur le terrain	Profondeur × Distance à l'arbre	Echantillonnage à date de la floraison de la culture
Cinétiques de décomposition racinaire et impact sur l'activité microbienne et le carbone du sol Question 2 – Chapitre IV	Faidherbia-Flux	Article 3	H-2.1.	<i>In situ</i> : suivi de la décomposition racinaire	Profondeur × Distance à l'arbre	Suivi pendant 15 mois
	DIAMS	Article 4	H-2.2.	<i>In situ</i> : suivi de la décomposition racinaire	Profondeur	Suivi pendant 15 mois
	DIAMS	Article 5	H-2.3.	<i>Au laboratoire</i> : suivi de la réponse microbienne à l'apport de matière organique	Profondeur	Suivi pendant 2 mois
Respiration du sol selon l'occupation Question 3 – Chapitre V	DIAMS	Article 6	H-3.1. H-3.2.	<i>In situ</i> : mesures des émissions de CO ₂ à la surface du sol	Distance à l'arbre	Suivi pendant 2 ans

3.2. Dimension spatiale de la stratégie expérimentale

Au départ, la stratégie expérimentale comprenait deux axes : (i) un axe vertical qui prend en compte la profondeur du sol, allant de la surface du sol à la profondeur maximale des racines lorsqu'elle est atteignable avec les moyens humains et budgétaires disponibles, et (ii) un axe horizontal, qui prend en compte la distance à l'arbre et les différentes communautés de plantes soumises ou non à l'influence de l'arbre (et de la bande enherbée lorsqu'elle est présente). Finalement, la démarche expérimentale a été adaptée pour chaque site expérimental, avec seulement 2 distances à l'arbre étudiées dans le site Faidherbia-Flux vs. un gradient détaillé de plusieurs distances à la ligne d'arbres (autant que possible) sur DIAMS. La démarche expérimentale a aussi été adaptée à chaque question, en fonction des connaissances acquises au cours de la thèse, par exemple avec la réduction de l'échantillonnage sur DIAMS dans l'Article 4 suite aux résultats de l'Article 2.

Sur le site Faidherbia-Flux, pour répondre à la **Question 1**, un bilan quantitatif et qualitatif des systèmes racinaires a été réalisé grâce à un échantillonnage destructif sur les 2 gradients spatiaux. Pour l'axe vertical, vu l'absence d'identification d'horizons nets, 5 horizons (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 et 100-150 cm) ont été choisis pour correspondre à d'autres études réalisées dans le bassin arachidier du Sénégal (Malou 2021). L'horizon 0-30 cm habituellement trouvé dans la littérature a été découpé en 2 horizons 0-10 et 10-30 cm car les premières observations sur le terrain ont montré une grande hétérogénéité entre 0 et 30 cm de profondeur, notamment avec la couleur plus foncée en surface du fait de l'importance de la teneur en matière organique. De plus, le travail du sol est réalisé jusque 10 cm de profondeur. Sur l'axe horizontal de la distance à l'arbre, 2 positions ont été choisies (position « sous » : sous la couronne de l'arbre et position « loin » : à au moins 30 m de l'arbre sélectionné et de n'importe quel autre arbre). Pour répondre à la **Question 2**, le suivi de la décomposition *in situ* des racines a été réalisé sur les mêmes distances à l'arbre, mais uniquement sur 4 profondeurs (20, 40, 90 et 180 cm) dans la limite du matériel racinaire disponible (Fig. II-7).

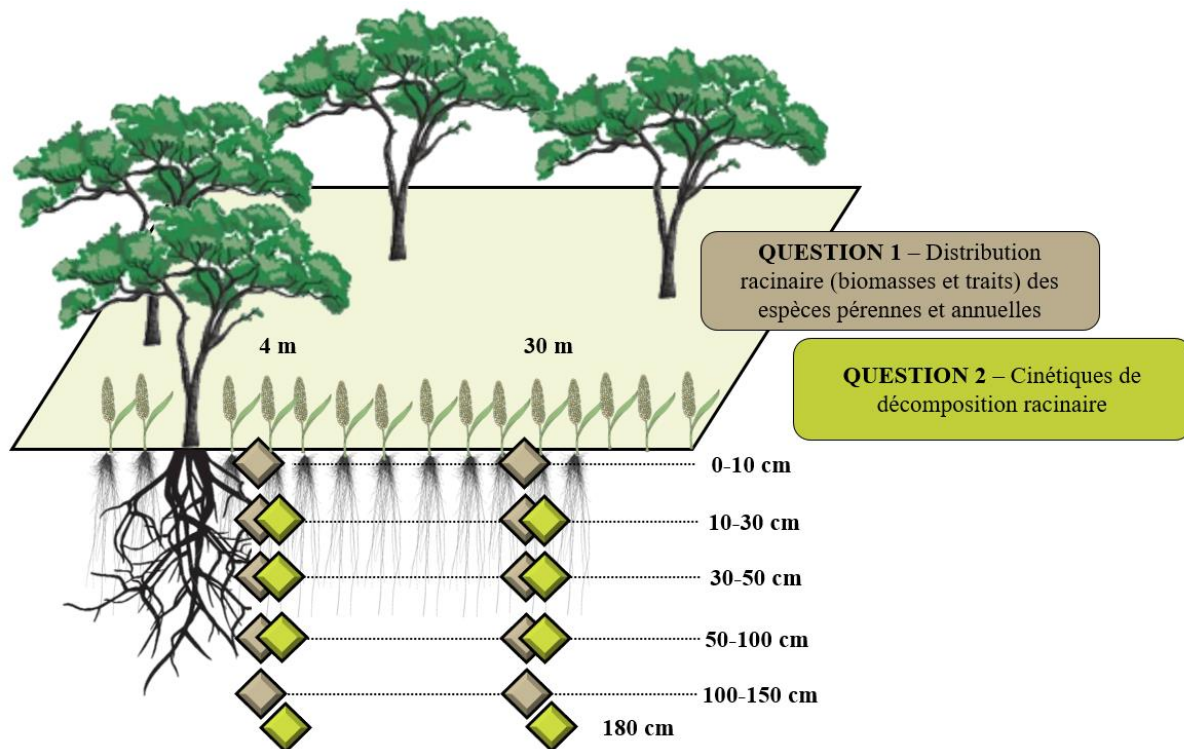


Fig. II-7 Schéma récapitulatif des dispositifs expérimentaux mis en place sur le site Faidherbia-Flux (Sénégal) pour répondre à chaque question. Les losanges représentent les points d'échantillonnages et leur couleur de remplissage correspond à la question à laquelle ils répondent. Le schéma de la question 1 a été répliqué sur 3 arbres et celui de la question 2 a été répliqué sur 3 faces de la fosse.

Sur DIAMS, pour répondre à la **Question 1**, un bilan quantitatif et qualitatif des systèmes racinaires a été réalisé grâce à un échantillonnage destructif sur chacun des 3 horizons (0-20, 20-50 et 50-100 cm) identifiés en amont et à 3 positions : 3 distances à la ligne d'arbres sur lesquelles on fait l'hypothèse de 3 communautés racinaires (*cf.* Chapitre I – Synthèse bibliographique) avec arbres + herbacées, culture annuelle + herbacées + arbres, culture annuelle sans influence des arbres ni des herbacées (0.5m, 1.5m et 4m de la ligne d'arbres respectivement). Cette caractérisation des systèmes racinaires dans la parcelle agroforestière a été accompagnée de mesures complémentaires sur le sol pour évaluer certaines propriétés physico-chimiques et microbiologiques, afin de réaliser une étude corrélative entre les données « sols » et les données « racines ». Les résultats ont mis en évidence une absence de différence significative des propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol selon la distance à l'arbre. Par conséquent pour répondre à la **Question 2**, la stratégie expérimentale n'a ciblé qu'une position éloignée de la ligne d'arbres, en gardant cependant les 3 horizons de sol. Enfin, pour répondre à la **Question 3**, les émissions de CO₂ ont été mesurées *in situ* pendant 2 ans sur le système agroforestier, ainsi que sur des témoins culture annuelle pure et plantation d'arbres. La durée de cette expérience étant de 2 ans, l'hypothèse principale était que l'hétérogénéité spatiale de la respiration du sol allait s'accroître au cours du temps avec la différenciation du gradient spatial des propriétés pédoclimatiques du système agroforestier. Par conséquent, il a été décidé d'ajouter une distance à l'arbre sur le gradient horizontal perpendiculaire à la ligne d'arbres par rapport aux précédents chapitres (0.5, 1.5, 3.5 et 8.5m) et d'ajouter

le facteur orientation (nord et sud) pour capter une éventuelle mise en place d'un microclimat au pied de l'arbre. Pour cette question centrée sur la respiration du sol, l'axe vertical n'a pas été pris en compte puisqu'on s'intéresse ici aux émissions de CO₂ émanant de la surface du sol, quelle que soit la profondeur d'où elles sont émises (Fig.II-8).

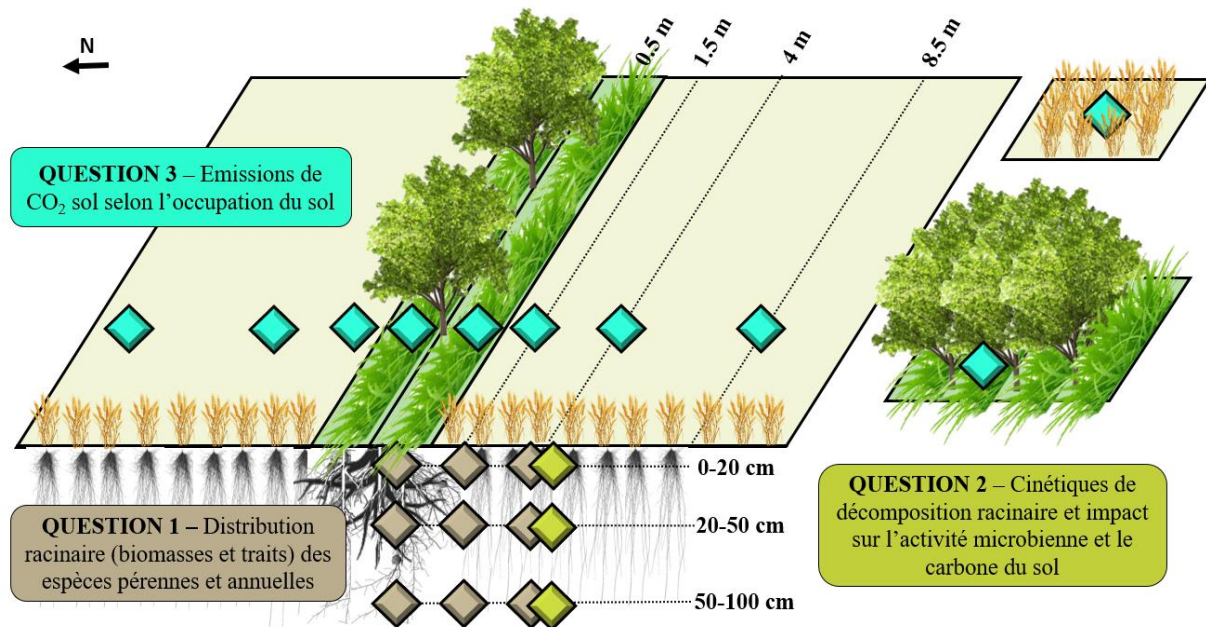


Fig. II-8 Schéma récapitulatif des dispositifs expérimentaux mis en place sur le site DIAMS (France) pour répondre à chaque question. Les losanges représentent les points d'échantillonnages ou de mesures et leur couleur de remplissage correspond à la question à laquelle ils répondent. Les schémas des questions 1, 2 et 3 ont été répliqués sur 3 blocs, avec des pseudo-réplicas supplémentaires et différents pour chaque étude.

3.3. Dimension temporelle de la stratégie expérimentale

Dans la stratégie expérimentale, les dimensions temporelles des expérimentations ont été réfléchies selon la question de recherche et les hypothèses visées. Elles sont résumées dans la Fig. II-9.

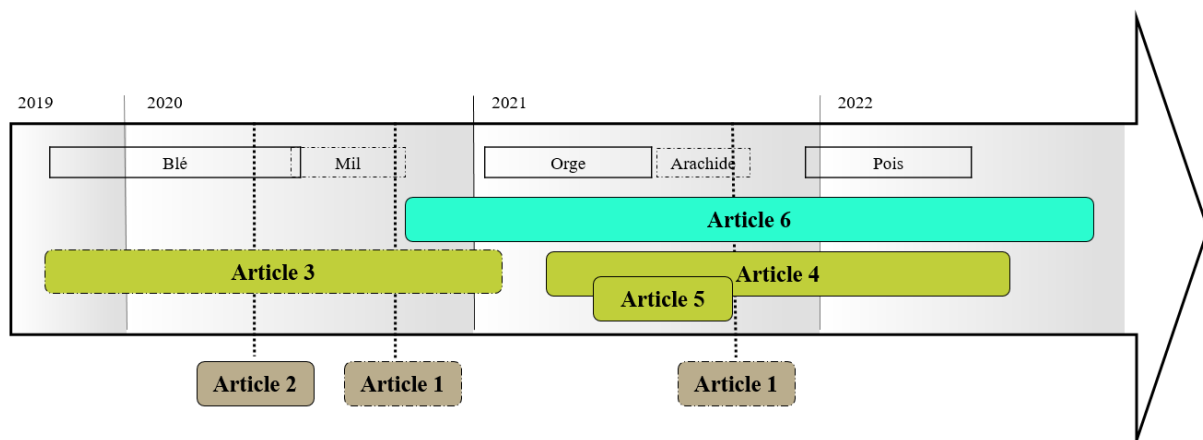


Fig. II-9 Dimension temporelle de la stratégie expérimentale au cours de la thèse pour chaque article. Les expérimentations des Articles 1 et 2 sont des échantillonnages à une date précise, tandis que les 4 autres sont des suivis qui durent dans le temps. La succession des cultures annuelles est également représentée pour DIAMS (ligne pleine) et Faidherbia-Flux (lignes en pointillés).

L'étude de la distribution racinaire des espèces pérennes et annuelles a été réalisée sur DIAMS en mai 2020 avant la récolte du blé (**Article 2**). Le site DIAMS étant récent et en cours de différenciation par les pratiques agroforestières depuis 2017, on peut considérer que cette étude était valable à l'instant t de l'échantillonnage (3 ans d'agroforesterie). Sur Faidherbia-Flux, l'expérience a été répétée sur 2 campagnes : l'une en Octobre 2020 avant la récolte du mil et la seconde en Octobre 2021 avant la récolte de l'arachide (**Article 1**). Cette répétition permet d'effectuer un bilan complet pour la rotation de cultures de 2 ans effectuée sur ce parc agroforestier mature.

L'étude de la décomposition des litières racinaires nécessite un suivi cinétique au cours du temps. Les décompositions de litières ont donc été suivies sur des durées estimées nécessaires pour la disparition de la matière organique apportée (15 mois après la récolte à DIAMS (**Article 4**) et Faidherbia-Flux (**Article 3**) pour les litières racinaires et 28 jours pour le glucose qui constitue un substrat simple donc rapidement décomposé (**Article 5**)).

L'étude de la respiration du sol en agroforesterie en comparaison avec les autres occupations du sol sur DIAMS (**Article 6**) a été réalisée pendant 2 années complètes dans l'objectif d'établir un bilan carbone du sol et de suivre les variations des émissions de CO₂ au cours des saisons, *i.e.* pour différentes conditions pédoclimatiques dans l'année. Pour cette expérimentation, 4 campagnes d'échantillonnages de sol et de racines ont eu lieu à différentes périodes de l'année (automne 2020, printemps 2021, été 2021 et printemps 2022) pour tenter d'établir un lien entre la respiration du sol et plusieurs variables explicatives comme la biomasse racinaire et la biomasse microbienne.

Références

Malou OP (2021) Le carbone organique dans les sols cultivés du bassin arachidier du Sénégal : variabilité spatiale et effets des pratiques culturales. Doctorat, Université Cheikh Anta Diop De Dakar

CHAPITRE III

DISTRIBUTION RACINAIRE DES ESPÈCES PÉRENNES ET
ANNUELLES EN SYSTÈME AGROFORESTIER

Rappel des objectifs

Le premier objectif de la thèse était de réaliser un bilan quantitatif et qualitatif des systèmes racinaires des différentes espèces des 2 systèmes agroforestiers étudiés afin de connaître la distribution spatiale (horizontale et verticale) des racines (biomasses et traits). Ce chapitre y répond avec une première étude sur le parc Faidherbia-Flux au Sénégal et une seconde sur le dispositif DIAMS en France. Ces 2 études sont basées sur des hypothèses communes :

H-1.1. Sur le gradient vertical, la distribution et les traits des systèmes racinaires sont principalement impactés par les propriétés physico-chimiques du sol. Sur le gradient horizontal, la distribution et les traits des systèmes racinaires sont hétérogènes en relation avec (i) la cohabitation d'espèces pérennes et annuelles dans le système (appartenance aux différentes espèces et interactions interspécifiques) et (ii) la différenciation des propriétés physico-chimiques du sol selon la distance à l'arbre. En plus, le partage de ressource lumineuse et le microclimat variables en fonction de la distance à l'arbre peuvent également impacter localement les conditions d'humidité et de température.

H-1.2. Les entrées de carbone dérivé des litières racinaires des espèces pérennes et des cultures annuelles dans les différents horizons de sol, ont une contribution significative sur les parcelles agroforestières. De plus, parmi elles, celles des espèces pérennes (arbres et herbacées de la bande enherbée le cas échéant) représentent une part significative, et notamment en profondeur.

Les dispositifs expérimentaux ont été adaptés aux spécificités de chaque site et dans les 2 cas ont pris en compte un axe vertical et un axe horizontal (Fig. III-1).

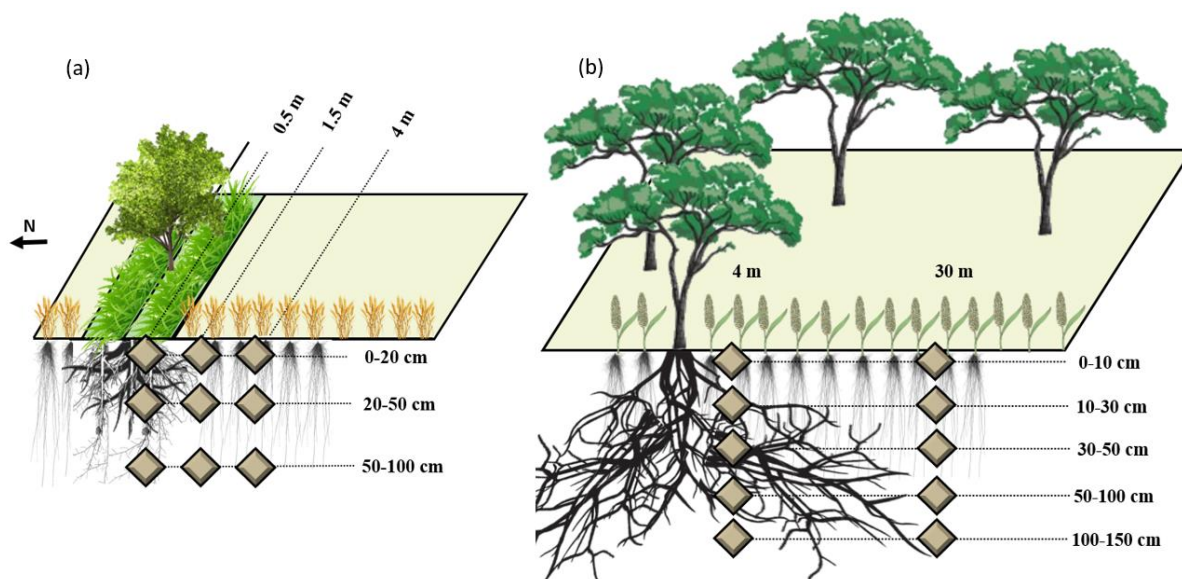


Fig. III-1 Schéma récapitulatif des dispositifs expérimentaux mis en place sur les sites DIAMS (France, a) et Faidherbia-Flux (Sénégal, b) pour répondre à la question 1 traitée dans le chapitre III. Les losanges représentent les points d'échantillonnages ou de mesures.

La caractérisation des systèmes racinaires a été réalisée en échantillonnant les racines sur un volume de sol important (environ 1 m³) pour mesurer la biomasse ainsi que plusieurs propriétés (composition chimique, traits fonctionnels, anatomie), en réalisant des cartographies racinaires dans des fosses (méthode des cubes et grilles, Fig. III-2) et en échantillonnant du sol, suivant la même stratégie expérimentale que les racines, pour mesurer des propriétés physico-chimiques (et microbiologiques pour le site DIAMS du sol). Le travail de terrain s'est déroulé en mai 2020, période de floraison du blé sur DIAMS en France et en octobre 2020, avant la récolte du mil et en octobre 2021, avant celle de l'arachide sur le site Faidherbia-Flux au Sénégal.

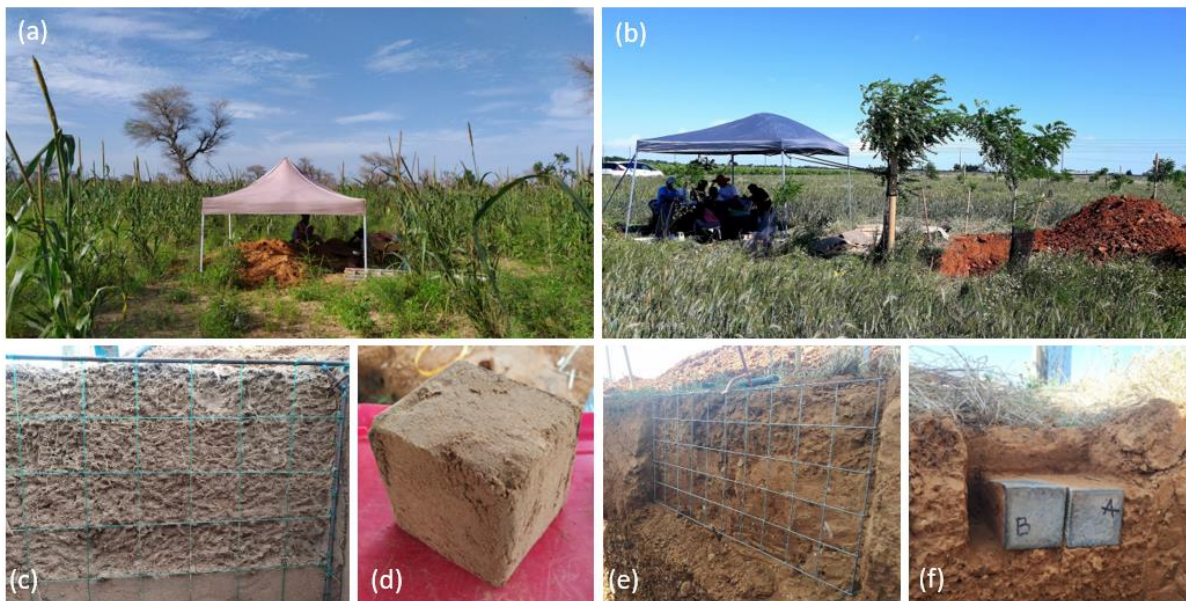


Fig. III-2 Photographies d'une partie du travail expérimental de terrain sur Faidherbia-Flux (Sénégal, a, c et d) et DIAMS (France, b, e et f) – Tri des racines dans un volume connu de sol (a et b), cartographie racinaire, méthode des grilles (c et e) et des cubes (d et f).

Chacune de ces études a donné suite à un article scientifique. L'Article 1 sur le site Faidherbia-Flux est accepté pour publication dans *Agriculture, Ecosystems & Environment* le 08/12/2022. L'Article 2 sur le site DIAMS est paru le 15/10/2022 dans *Plant and Soil*.

Article 1

Contribution of tree and crop roots to soil carbon stocks in a Sub-Saharan agroforestry parkland

Siegwart Lorène¹, Bertrand Isabelle¹, Roupsard Olivier^{1,3,4}, Jourdan Christophe^{1,2}

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, InstitutAgro Montpellier, Montpellier, France

² CIRAD, UMR Eco&Sols, F-34398 Montpellier, France

³ CIRAD, UMR Eco&Sols, Dakar, Senegal

⁴ LMI IESOL, Centre IRD-ISRA de Bel Air, Dakar, Senegal



Abstract

In the Sub-Saharan region, *Faidherbia albida* trees have been maintained for years in agroforestry parklands for their numerous services offered to people and to crops. The aerial crop biomass and yield are notably greater under the tree crown, but most of this biomass is exported and does not contribute to soil carbon (C) inputs. Belowground litter inputs are crucial, but little is known about the root system distribution, productivity and contribution to soil C inputs. This study aims to assess the field heterogeneity of *F. albida* and crop root systems along the soil profile and according to the distance to the tree to evaluate the root contribution to soil C stocks.

During two successive rotations of pearl millet in 2020 and groundnut in 2021, soils and roots were sampled from two locations, under and far from the tree, in 5 soil layers to a depth of 150 cm and with three tree replicates. The aerial biomass was also sampled. The annual relative contribution of roots to soil C stocks was estimated as the ratio between root litter-derived C inputs (considering hypothetical root turnover only for trees and the whole root biomass for crops) and soil C stocks.

We found a similar crop root biomass density under and far from the tree, but the higher root:shoot ratio far from than under the tree confirmed the beneficial effect of trees belowground. Unexpectedly, the tree root biomass density was higher at +30 m from the trunk than under the tree in the 30-100 cm layer, suggesting a long-distance influence of the trees. Down to 150 cm depth, the tree root litter contribution to soil C stocks represented 6.1 and 7.1% of the total root litter-derived C inputs (under and far from the tree, respectively). In this type of Sub-Saharan parklands with low soil C stocks, increasing the tree density or selecting deep and highly rooted crop varieties should be favoured.

1. Introduction

Lands in tropical climates are particularly affected by soil degradation (Lal 1984). In these regions, soil carbon (C) sequestration could be a key strategy to improve food security and sustainable agriculture management, in addition to reducing the concentration of atmospheric greenhouse gases (Chenu et al. 2019). Compared to temperate soils, tropical soils have high vegetal biomass production (Nair et al. 2009) and a low soil C content, which should be enhanced to improve soil properties and food security. Agroforestry, which is recognized for fostering soil C sequestration (Albrecht and Kandji 2003; Nair et al. 2009; Atangana et al. 2014), is an ancient practice in tropical climates. More specifically, in the Sub-Saharan area, agroforestry is mostly based on cultivated tree parklands (Bayala et al. 2014) with a natural dispersion of trees. The tree *Faidherbia albida* is a common species that has been maintained by farmers due to the numerous services it provides for crops (Barnes and Fagg 2003) and its reverse phenology, offering fodder during the dry season (Roupsard et al. 1999). While the effects of *F. albida* pruning (Toib et al. 2021) and aerial litter (Gnankambary et al. 2008) on pedo-climatic conditions (Ong et al. 2015; Sileshi 2016), crop yield, soil fertility and soil C stocks have been widely studied (Charreau and Vidal 1965; Dancette and Poulain 1968; Rao et al. 1997; Diallo et al. 2021), few studies have included roots, despite their main role in deep soil water extraction (Bayala and Prieto 2020) and nutrient uptake (Danthu et al. 2002; Roupsard et al. 1999). Studying the root interspecific interactions in *Faidherbia* parklands is needed to understand the competition or complementarity with the associated plant root systems and their contribution to soil C sequestration as an important source of C.

In contrast to crop aerial biomass, crop root biomass density has been observed to be equivalent regardless of distance to trees (Defrenet et al. 2016; Roupsard et al. 2020). Between depths of 0 and 200 cm, crop root biomass density was twice the tree fine root biomass, and *F. albida* fine root biomass was absent at 30 m from the tree trunk (Siegwart et al. 2022). In addition, the soil profile distributions of tree and crop root systems in agroforestry parklands are different. Crop roots are mostly concentrated in the topsoil with a maximum rooting depth of 80-100 cm and are exposed to moisture variations (rainfall, topsoil evaporation, plant water use, etc.) (Van Noordwijk et al. 2015). Due to competition in agroforestry systems (Cardinael et al. 2015) and their internal genetic program, trees explore deeper soil layers than annual crops (Van Noordwijk et al. 2015), sometimes reaching the water table (Akinnifesi et al. 2004), as is the case for *F. albida* (Roupsard et al. 1999). Indeed, the deepest rooting patterns are found in semi-arid ecosystems (Canadell et al. 1996), and tree rooting under the crop root zone is a key factor in agroforestry according to Van Noordwijk et al. (1996). ‘Complementarity theory’ (Van Noordwijk and Purnomosidhi 1995; Das and Chaturvedi 2008) suggests that such tree rooting favours efficient soil resource use thanks to the association of different species with different belowground strategies, in contrast to monocultures (Schroth 1998), where soil acts as a buffer that stores water and nutrients for crop needs (Van Noordwijk et al. 1996), especially in poor tropical soils. Such soil layer division between crop and tree roots is desired but is not always reached (Battie-Laclau et al. 2020), and

more precise evaluation of root systems in relation to soil properties is needed to validate and understand the complementarity theory in Sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *F. albida*.

In addition to root biomass and distribution differences between trees and crops, root properties, including root functional traits and chemical composition, are expected to be different between different species associated with the agroforestry system. For example, functional traits indicate an acquisition strategy for crop roots and a conservation strategy for tree fine roots (Roumet et al. 2006). Moreover, crop roots generally have a higher specific root length and root N content than tree fine roots (Roumet et al. 2006), but *F. albida* is a N-fixing tree, and its root litter is enriched in N (Stephen et al. 2020; Siegwart et al. 2022). Not only genetics but also the environment can impact root functional traits (Schroth 1998; Van Noordwijk et al. 2015). First, root functional traits can inform the distribution strategy in response to belowground competition in agroforestry (Cardinael et al. 2015). Second, strategies responding to soil nutrient shortages can involve root functional trait changes (Pan et al. 2018). Indeed, under water and nutrient shortages and in infertile or stressed conditions, such as those found far from trees in tropical parklands (Traore et al. 2004; Bayala et al. 2015), roots are expected to have higher specific root lengths to maximize soil exploration (Fitter 1985; Eissenstat 1991; López-Bucio et al. 2003). Last, soil depth is a major factor controlling root C stabilization (Lorenz and Lal 2005; Cotrufo et al. 2013; Poirier et al. 2018) due to different root decomposition kinetics according to depth (Pries et al. 2018; Siegwart et al. 2022).

In agroforestry parklands, the heterogeneity of trees and crop root systems along the soil profile and according to the distance to the tree directly impacts the quantity, distribution and quality of root litter-derived C inputs to the soil (at harvest for crops and during root turnover for trees), which could contribute to heterogeneity in the soil C stocks. This study aimed to evaluate the impact of the association of trees and crops in a Sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *F. albida* on crop and tree root distribution, biomass and properties according to soil depth, and distance from the tree (under or far from the tree). Furthermore, this study aimed to investigate the contribution of tree and crop root litter-derived C inputs to soil C stocks along the soil profile.

We first hypothesized that the heterogeneity of the root systems (biomass, distribution and properties) in the agroforestry parkland would be the result of the interactions of trees and crop species, with deeper, vertically oriented and N-richer root systems of the N-fixing tree than the crops. Second, we hypothesized that the root systems would be influenced by variations in soil chemical properties, with a higher root:shoot ratio in poor soils (far from the trees, no interspecific competition) despite equivalent root mass than in zones with higher nutrient levels (under trees, with interspecific competition). Last, the crop root contribution to soil C stocks was expected to be higher in the topsoil but equivalent at all distances from the tree (similar crop root biomass density), while the tree roots would contribute to C stocks mainly in the subsoils and near the tree trunk.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The natural agro-silvo-pastoral parkland called “Faidherbia-Flux” is located in Sob (14°29'45N, 16°27'13W), West Senegal (<https://lped.info/wikiObsSN/?Faidherbia-Flux>). With an average 550 mm annual rainfall regime and temperature of 29.6°C (Ndiaye et al. 2001; Lalou et al. 2019), this Sub-Saharan climate is classified as tropical semi-arid with wet and dry seasons (Diongue et al. 2022). The soil belongs to the Arenosols (IUSS Working group, WRB 2014); it is a typical sandy ferralitic soil.

In this agroforestry system, *Faidherbia albida* trees (6.8 trees ha⁻¹, Roupsard et al. 2020; Rahimi et al. 2021) are associated with a yearly rotation of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and groundnut (*Arachis hypogaea*), corresponding to bush fields, where most of the crop aerial biomass is exported by the end of the wet season. In June 2020, pearl millet was manually sown on the studied plot with a distance of 90 cm between each sowing pocket. In July 2021, groundnut was manually sown on the plot in lines separated by 30 cm. There was no amendment of pesticides or herbicides, and harvest occurred in October 2020 and October 2021. In 2021, the groundnut crop was affected by weeds, which is typical in these agricultural practices. In the entire manuscript, “crop roots”, when referring to the 2021 sampling year, includes roots belonging to both groundnut and weeds, as distinction between the two species was too difficult.

2.2. Aerial and root biomass sampling

One month before each crop harvest, a sampling campaign was conducted. Three *F. albida* trees representative of the tree population were chosen as replicates (Diatta 2021), with a height of 13 ± 0.9 m and a circumference at breast height of 2.6 ± 0.4 m. The trees were located more than 50 m apart and were thus considered independent from each other. The same trees were used for both campaigns (2020 and 2021). In each sampling year and for each tree, two subplots of 1 m² were defined: one subplot was located under the tree crown, at 3 to 4 m from the trunk in the southern direction (average crown radius of 7.2 ± 0.3 m), and the second subplot was located far from the tree, at a minimum distance of 30 m from any tree. This resulted in 6 subplots for each sampling year for aerial and root biomass quantification. In 2020, one pearl millet plant was sampled per subplot, and its aerial parts were split into ears, stems and leaves for biomass quantification. In addition, the heights of the 10-neighbouring pearl millet plants were measured. In 2021, the total aerial biomass of groundnuts+weeds and the shells of groundnuts were sampled on the total surface of each subplot. All samples were oven-dried for 48 hours at 65°C before weighing.

The following protocol was repeated for both sampling years (2020 and 2021). Immediately after aerial biomass sampling, 6 pits (3 trees \times 2 locations) of 1 m² and 150 cm depth were dug in the same subplots. In the total soil volume of 1.5 m³ of each pit, roots were sorted manually on a 2 mm sieve and split

according to the plant species (Supplementary Table III-1), type (crop fine roots, crop medium roots (only for groundnut+weeds in 2021), *F. albida* fine (diameter < 2 mm) and *F. albida* medium roots (10 mm > diameter > 2 mm)) and to the corresponding soil layers (0-10, 10-30, 30-50, 50-100, 100-150 cm). All samples were washed on a 0.5 mm sieve and oven-dried for 48 hours at 65°C before weighing. In total, the root biomass in the pit was assessed for 2 sampling years (2020 and 2021) × 3 trees (replicates) × 2 locations (under and far from the trees) × 5 soil layers × 2 plant species (× 2 root diameter categories for *F. albida* and groundnut+weeds). Knowing the volume of excavation, the root biomass density (g dm^{-3}) was calculated ($n=3$).

2.3. Root mapping

In each sampling year and in each of the 6 pits, fine root mapping was carried out on the four pit walls, from 0 to 150 cm of depth, and each wall of the pit was considered a pseudo-replicate. Grids of size 100 × 100 cm were hung against the fresh wall and were moved down to 150 cm deep to map the entire rooting profile from 0 to 150 cm deep. Each grid was made of 150 elementary tiles of 10 × 10 cm in which the number of root intersects with the vertical plane was counted. The number of root intersects was considered the root intersect density for each plant species. For each location (under and far from the tree), for each soil layer (from 0 to 150 cm, i.e., 5 layers) and for the two plant species (*F. albida* and pearl millet in 2020 and *F. albida* and groundnut+weeds in 2021), the average root intersect density was calculated for 3 replicated trees × 4 pseudo-replicated walls × 10 tiles ($n=120$) to establish a representative root density map.

Soil cubes were sampled in two walls of each pit (the northern- and eastern-oriented walls, i.e., 6 cubes per location and soil layer) following the root intersect method from Chopart and Siband (1999). Briefly, two iron cubes of 10 × 10 × 10 cm exhibiting 3 open faces with opposite orientations (a: open faces orientated upward, and b: open faces orientated downward) were inserted in the soil profile next to each other and then extracted with the soil as intact as possible (see details in Maurice et al. (2010)). The soil cubes were taken at each location (under and far from the tree) and in 4 soil layers (20, 40, 80 and 120 cm depth). A total of 96 soil cubes were sampled with 2 cube orientations × 4 soil layers × 2 locations × 2 pit faces (pseudo-replicates) × 3 trees (replicates). On each extracted soil cube, the root intersect method was applied (Chopart and Siband 1999; Battie-Laclau and Laclau 2009; Maurice et al. 2010). Each cube had three open faces: one horizontal face (H) perpendicular to the profile and parallel to the topsoil, one transversal face (T) parallel to the profile and perpendicular to the topsoil and one lateral face (L) perpendicular to the profile and to the topsoil. On each face, a knife was used to expose roots by removing surrounding soil, and the number of root intersects with the vertical plane was counted. The number of intersects represented the cube root intersect density. The coefficient A was calculated for each cube as the deviation degree from a random orientation of roots within a soil cube, i.e., root orientation (Chopart and Siband 1999).

$$A = \sqrt{\frac{(RID_T - \overline{RID})^2 + (RID_L - \overline{RID})^2 + (RID_H - \overline{RID})^2}{6 \times \overline{RID}^2}}$$

where RID_i is the root intersect density on face i (H, L and T for the horizontal, lateral and transversal faces, respectively) and \overline{RID} is the average root intersect density on all faces of the cube. When $A=0$, there is root isotropy, i.e., no specific orientation for root growth. When $A=1$, the roots grow only in one direction. Then, the fine roots inside each soil cube were sorted and carefully washed with water on a 0.5 mm sieve. All roots were stored at 4°C a few days prior to analyses.

Due to the proximity between cubes a and b, they were spatially correlated for each soil layer and location, and they were thus not considered individual replicates. We considered cubes a and b to correspond to one sample and used their average value.

2.4. Root analyses

Roots from the sampling soil cubes were spread out in a transparent bin with deionized water and scanned at 300 dpi with a flatbed scanner (Epson Expression © 10000 XL). The resulting images were processed with image analysis software (WinRHIZO v. 2005b ©, Regent Instruments Inc., Québec, Canada) to determine the total root length (m) and the mean root diameter (mm) for the contents of each cube. Knowing the volume of the cubes (1 dm³), the root length density (m dm⁻³) was then calculated. After the scans, roots were air-dried at 50°C for 72 hours and weighed. The specific root length (m g⁻¹) was calculated as the ratio of fine root length to fine root dry mass in each cube. In the scanned images, no distinction of plant species (crop and tree) was made. Consequently, these results were used to characterize root functional traits in the agroforestry plot without the ability to compare different species.

Dry roots from the biomass sampling were used for chemical analyses. Root C and N elemental composition was determined by the LAMA laboratory (IRD-US Imago, Dakar, Senegal) with an automatic elemental analyser on 3 mg subsamples of root litter. Root C stocks (g_C dm_{soil}⁻³) were calculated for each soil layer and each location as the product of the root biomass density (g_{root} m_{soil}⁻³) and the root C content (g_C g_{root}⁻¹) and are reported on a per m² basis.

2.5. Soil sampling and analyses

Immediately after digging the pits each year, soil sampling was conducted in each soil layer (0-10, 10-30, 30-50, 50-100, 100-150 cm) of each pit with a composite sample originating from the 4 pit walls. In 2020 only, the soil total C, total N, total P, clay, silt, and sand contents and bulk density were measured. In 2020 and 2021, the mineral N and Olsen P contents were measured. The LAMA laboratory (IRD-US Imago, Dakar, Senegal) analysed the soil samples for total soil C and N contents by dry combustion (Matejovic 1997). The mineral C content was assumed to be insignificant in these soils, and the measured total soil C thus accounted for soil organic C. Available P was determined according to the

Olsen method and measured by the malachite green method (Ohno and Zibilske 1991). After extraction with a 1:4 soil-1 M KCl solution, NO_3^- and NH_4^+ were determined by continuous flow colorimetry, and the sum of NO_3^- and NH_4^+ accounted for the soil total mineral N content. Soil texture was determined according to five fractions (clay, silt (fine + coarse), sand (fine + coarse)). The soil bulk density was assessed according to the cylinder method (Blake and Hartge 1986) for each pit (under and far from tree) with two faces out of four (as replicates) and at ten soil layers (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 and 140 cm), as usually measured in this experimental site.

Soil C stocks (g m^{-3}) were calculated for each soil layer and each location as the product of the soil bulk density (g m^{-3}) and the amount of total soil C ($\text{g g}_{\text{soil}}^{-1}$) and are reported on a per m^2 basis. For this calculation, the average bulk density at 60, 80, and 100 cm represented the 50-100 cm soil layer, and the average bulk density at 120 and 140 cm represented 100-150 cm of depth.

2.6. Data analyses

For the annual crops pearl millet and groundnut+weeds, the totality of the root carbon stocks entered the soil at each harvest and thus in each year; i.e., 100% of the fine and medium root C stocks represented the root litter-derived C inputs. For the perennial tree *F. albida*, we considered that 0.56% of the root carbon entered the soil each year according to the acacia root turnover (Jha and Prasad Mohapatra 2010; Siegwart et al. 2022). This estimation of the root litter-derived C inputs did not take rhizodeposition into account.

The contribution of roots to soil C stocks was calculated as the ratio of annual root litter-derived C inputs to soil C stocks.

For each measurement, data are presented as the mean values \pm standard deviations. All statistical analyses were processed with R software (version 4.0.0).

Data from the same soil profile were considered dependent on each other. Several linear mixed models were fitted with the three replicated profiles (for each tree) as random factors. The effect of location on the crop aerial and total root biomass density (0-150 cm) was tested. The effects of soil layer, location, root diameter class, sampling year and their interactions on fine root biomass density, medium root biomass density, the coefficient A and annual root litter-derived C inputs were tested. To analyse the root orientations, the effect of the cubes' faces (H, L and T), the soil layer, the location, the root species and the sampling year on the root intersect density were tested. The effects of soil layer, location, sampling year and their interactions on root length, average root diameter and specific root length were tested. The effects of soil layer, location, root type and their interactions on the root C, N and P contents were tested. The effects of soil layer, location and their interactions on the soil total C, total N, total P, mineral N, and Olsen P contents, C:N, N:P, C:P and organic C stocks were tested.

For all the linear mixed models and analyses of variance, the lme4 and car packages were used. The normality of the residuals was always verified with a Shapiro–Wilk test, and the homogeneity of the variances was verified with a Bartlett test. When necessary (variance homogeneity p values < 5%), logarithmic, square root, Box–Cox or Yeo Johnson transformations were applied. Post hoc Tukey tests were used to establish the significance of the differences between each category.

3. Results

3.1. Pedo-climatic context

The soil physical properties presented slight differences across the depths and locations but were globally homogeneous (Table III-1). While the soil sand content was very high (approx. 80%) at all locations and layers, the clay content increased with depth, ranging from $6.0 \pm 1.1\%$ at 0-10 cm to $13.0 \pm 1.5\%$ at 100-150 cm (p value = 6.13×10^{-8}). At depths of 0-10 cm, the silt content was lower under (7.70 ± 0.20%) than far from the tree ($10.17 \pm 1.45\%$; p value = 3.22×10^{-2}). The soil bulk density was equivalent in all layers (p value = 0.62) and was lower under than far from the tree (p value = 9.55×10^{-3} , Supplementary Table III-2).

The soil chemical properties were strongly impacted by the soil depth. The soil total C content, not exceeding 3 g kg^{-1} , decreased significantly with depth (p value = 1.06×10^{-4}), especially from 0-10 to 10-30 cm (-30%, Table III-1). At all locations, the soil total N content was higher at 0-10 cm than at all the other layers (p value = 2.07×10^{-3}) and globally low at all depths and locations (maximum 0.18 g kg^{-1}). The soil total P content was equivalent in the topsoils and in the subsoils, with no distinction between the locations, ranging from 0.44 to 0.51 g kg^{-1} (Table III-1). The soil C:N was higher between depths of 0 and 50 cm (11.9 ± 3.6) than between depths of 50 and 100 cm (7.8 ± 1.6 , p value = 1.04×10^{-3} , Supplementary Table III-6). The soil C:P and N:P ratios decreased with depth (p value = 1.17×10^{-4} and 9.62×10^{-4} , respectively, Supplementary Table III-2).

The soil nutrient contents were globally low and even lower in 2021 than in 2020 (p value = 6.86×10^{-4} for mineral N and 1.09×10^{-13} for Olsen P content). In all the soil samples, the mineral N content was very low (less than 3 mg kg^{-1}). For both sampling years and at all locations, it was significantly higher at 0-10 cm than in the deeper soil layers, and it was higher under than far from the tree only in the 0-10, 10-30 and 100-150 cm layers (Table III-1, p value = 3.81×10^{-2} , Supplementary Table III-3). The soil Olsen P content was higher under than far from the tree (p value = 4.64×10^{-2}) and decreased with soil depth, similar to the other variables (Table III-1, p value = 1.73×10^{-2} , Supplementary Table III-3).

Table III-1 Soil physical and chemical properties according to soil layer (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm) and location (under and far from the tree). Data are mean values \pm standard deviations (n=3).

	0-10 cm		10-30 cm		30-50 cm		50-100 cm		100-150 cm	
	Under	Far	Under	Far	Under	Far	Under	Far	Under	Far
Soil physical properties										
Clay content (%)	6.80 \pm 0.44	5.23 \pm 0.95	7.93 \pm 1.21	8.7 \pm 2.14	11.87 \pm 0.7 4	10.9 \pm 0.79	10.97 \pm 1.5 0	10.6 \pm 1.71	12.30 \pm 1.2 2	13.6 \pm 1.71
Silt content (%)	7.70 \pm 0.20	10.17 \pm 1.4 5	9.53 \pm 0.76	8.87 \pm 0.76	8.53 \pm 0.90	8.60 \pm 0.96	8.90 \pm 1.14	9.00 \pm 0.98	8.20 \pm 0.61	8.23 \pm 0.93
Sand content (%)	85.47 \pm 0.1 5	84.10 \pm 2.2 5	82.53 \pm 1.2 7	82.00 \pm 3.0 8	79.80 \pm 1.7 0	80.17 \pm 2.0 1	79.60 \pm 1.4 4	80.23 \pm 2.5 3	78.87 \pm 1.2 3	77.9 \pm 2.17
Bulk density (g cm ⁻³)	1.72 \pm 0.03	1.80 \pm 0.02	1.73 \pm 0.08	1.75 \pm 0.04	1.75 \pm 0.08	1.77 \pm 0.05	1.73 \pm 0.04	1.80 \pm 0.01	1.75 \pm 0.04	1.82 \pm 0.07
Soil chemical properties										
Total C content g kg ⁻¹	2.01 \pm 0.61	1.50 \pm 0.60	1.15 \pm 0.26	1.32 \pm 0.39	1.16 \pm 0.11	1.29 \pm 0.52	0.88 \pm 0.16	0.88 \pm 0.13	0.74 \pm 0.12	0.67 \pm 0.15
Total N content g kg ⁻¹	0.18 \pm 0.04	0.13 \pm 0.06	0.11 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
Total P content g kg ⁻¹	0.49 \pm 0.03	0.44 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03	0.39 \pm 0.06	0.50 \pm 0.05	0.51 \pm 0.10	0.44 \pm 0.04	0.47 \pm 0.06	0.47 \pm 0.07	0.48 \pm 0.10
C:N	11.33 \pm 1.6 7	11.5 \pm 3.12	10.10 \pm 0.9 8	11.53 \pm 1.3 6	11.63 \pm 0.3 5	15.33 \pm 8.5 0	6.53 \pm 5.78	8.47 \pm 0.81	7.40 \pm 1.35	6.43 \pm 1.25
C:P	4.10 \pm 1.02	3.44 \pm 1.68	3.41 \pm 1.01	3.52 \pm 1.51	2.33 \pm 0.15	2.67 \pm 1.47	1.91 \pm 0.22	1.91 \pm 0.53	1.58 \pm 0.16	1.42 \pm 0.46
N:P	0.36 \pm 0.06	0.31 \pm 0.16	0.33 \pm 0.07	0.30 \pm 0.10	0.20 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04	0.22 \pm 0.04	0.22 \pm 0.05
Soil nutrients contents under Pearl millet (2020)										
Mineral N content (mg kg ⁻¹)	2.53 \pm 0.75	1.45 \pm 0.32	1.12 \pm 0.68	0.61 \pm 0.21	0.65 \pm 0.38	0.34 \pm 0.10	0.48 \pm 0.08	0.26 \pm 0.20	0.58 \pm 0.10	0.31 \pm 0.12
Olsen P content (mg kg ⁻¹)	3.08 \pm 0.74	2.55 \pm 0.14	1.74 \pm 0.23	2.23 \pm 0.16	1.79 \pm 0.78	1.88 \pm 0.14	2.19 \pm 1.11	1.88 \pm 0.54	2.77 \pm 1.37	1.88 \pm 0.27
Soil nutrients contents under Groundnut (2021)										
Mineral N content (mg kg ⁻¹)	2.43 \pm 0.46	1.04 \pm 0.32	0.55 \pm 0.29	0.17 \pm 0.06	0.24 \pm 0.06	0.17 \pm 0.16	0.21 \pm 0.36	0.04 \pm 0.06	1.34 \pm 1.52	0.10 \pm 0.10
Olsen P content (mg kg ⁻¹)	1.18 \pm 0.45	1.12 \pm 0.16	1.03 \pm 0.20	0.76 \pm 0.16	0.94 \pm 0.58	0.63 \pm 0.21	1.12 \pm 0.43	0.72 \pm 0.35	0.91 \pm 0.17	0.67 \pm 0.13

3.2. Root distribution

The total crop aerial and root biomass density behaved in similar ways for pearl millet (2020) and groundnut+weeds (2021). Despite 2 to 2.8 times (2020 and 2021, respectively) higher aerial biomass under than far from the tree, the total crop root biomass density found between depths of 0 and 150 cm was not significantly different between locations (p value = 0.86 and 0.60, Supplementary Table III-4). This resulted in lower root:shoot ratios under than far from the trees. These differences were significant for pearl millet (0.07 ± 0.01 and 0.14 ± 0.02) but not for groundnut+weeds (0.06 ± 0.03 and 0.12 ± 0.11 , respectively).

The crop and tree root systems presented differences in fine root biomass density and distribution in the soil profile. Between depths of 0 and 150 cm, the fine root biomass density was in a higher range for the crops (maximum 350 g m^{-3}) than for the trees (maximum 15 g m^{-3} , Fig. III-3a). The crop roots were concentrated between 0 and 10 cm, representing $83.8 \pm 3.8\%$ and $70.8 \pm 3.9\%$ of the total root biomass density in the soil profile for pearl millet (2020) and groundnut+weeds (2021), respectively, while the tree had a deeper rooting system (p value = 6.31×10^{-3} , Supplementary Table III-5). In both sampling years, *F. albida* fine roots were found far from the tree (Fig. III-3a) with a root biomass density even higher than that under the tree between 30 and 100 cm depth (p value = 3.88×10^{-3} , Supplementary Table III-5). Furthermore, the medium root biomass density was higher in 2021 than in 2020 for all species (p value = 4.96×10^{-2} , Supplementary Table III-5); groundnut+weeds (2021) had medium tap roots, in contrast to pearl millet, whose root system was only composed of fine roots (2020, Fig. III-3b). *F. albida* medium roots were rare between 0 and 50 cm at both locations. At depth, their biomass density was higher far from than under the tree (Fig. III-3b, p value = 3.59×10^{-2} , Supplementary Table III-5).

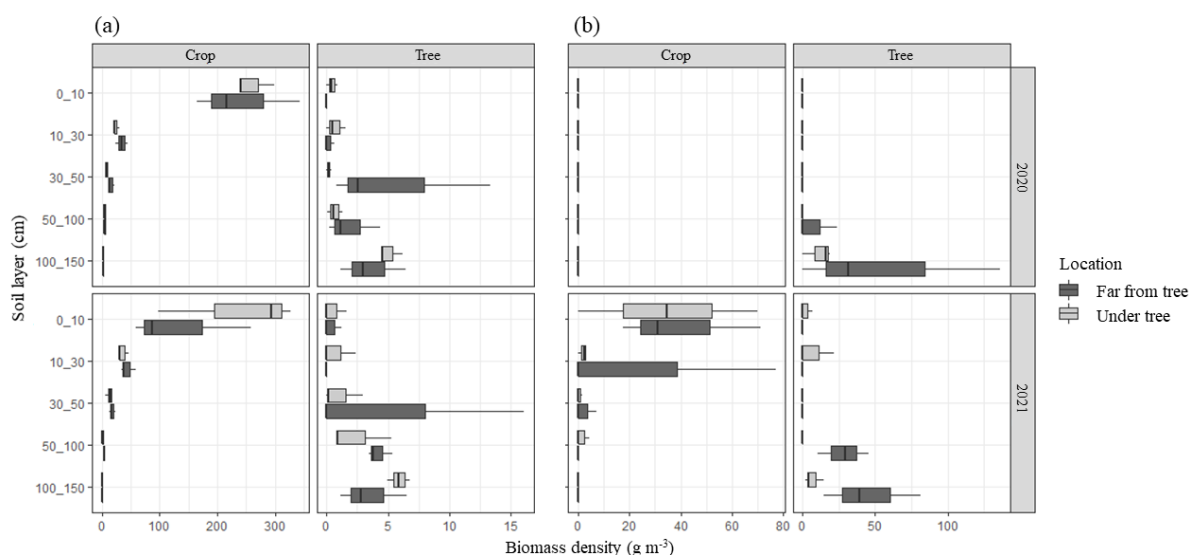


Fig. III-3 Fine (a) and medium (b) root biomass density ($n=3$) according to soil layer (0–10, 10–30, 30–50, 50–100 and 100–150 cm) for pearl millet (crop) and *F. albida* (tree) in 2020 and for groundnut+weeds (crop) and *F. albida* (tree) in 2021 at both locations (far from the tree in dark and under the tree in white).

The root orientation was given by the coefficient A, which slightly, but not significantly, increased with soil depth and always remained lower than 0.5 (Supplementary Fig. III-1). Consistently, the root intersect density was not affected by the face of the cube (H, L and T, p value = 0.97) or by any interaction of this factor with other factors (Supplementary Fig. III-2, statistics not shown). From the cube analysis, we deduced that root isotropy occurred for all soil layers, locations, root types and sampling years.

3.3. Root functional traits

No distinction of root species was assessed in the cubes, but the agreement between length and biomass density suggested that the majority of crop roots were located at 20 and 40 cm and that the majority of tree roots were located at 80 and 120 cm depth. The total root length measured in the cubes was higher at 20 cm and then decreased sharply with soil depth (Fig. III-4a, p value = 2.27×10^{-34} , Supplementary Table III-6). At 20 cm, the root average diameter was lower under than far from the tree, while it was equivalent between both locations in the other soil layers (Fig. III-4b, p value = 3.72×10^{-4} , Supplementary Table III-6). At 20 and 40 cm, the specific root length was equivalent at both locations ($148.6 \pm 74.4 \text{ m g}^{-1}$), and it was very variable (reaching up to 811.0 m g^{-1}) at 80 and 120 cm depth (Fig. III-4c). The specific root length was higher in 2020 with pearl millet than in 2021 with groundnut+weeds for all locations and at all soil layers (p value = 3.79×10^{-3} , Supplementary Table III-6).

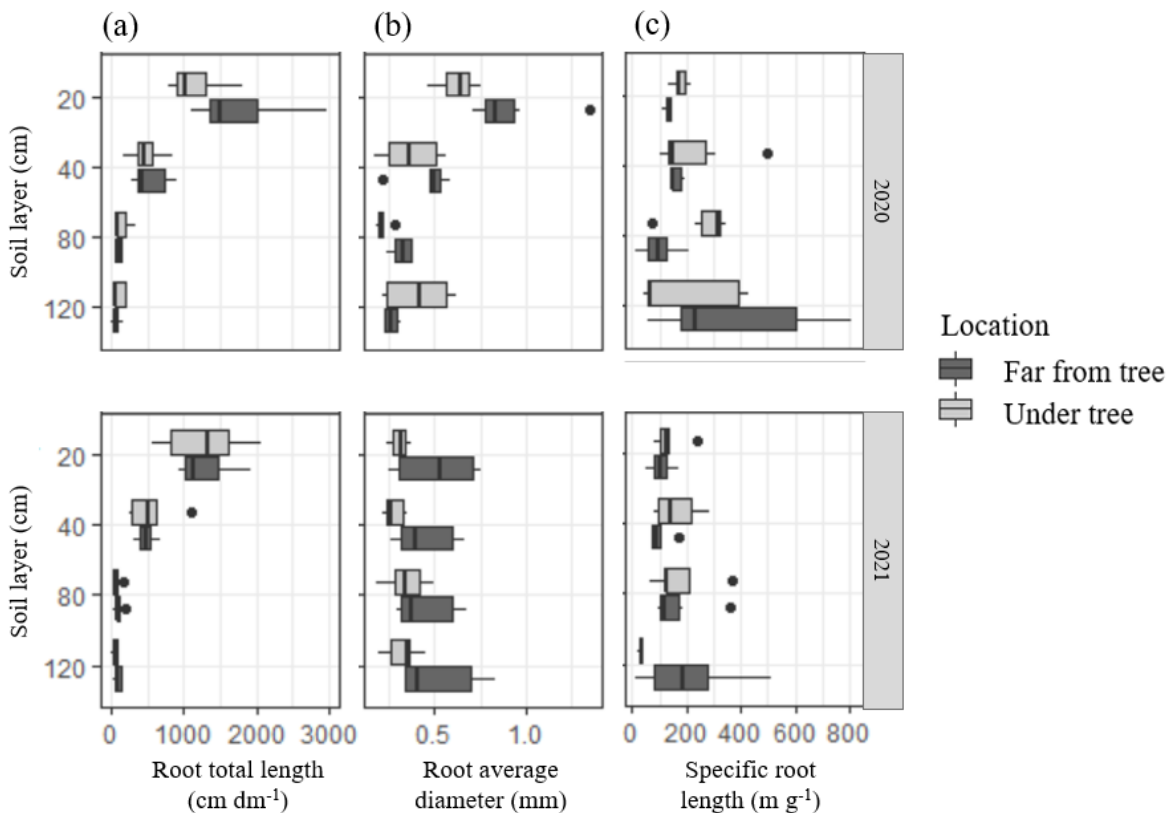


Fig. III-4 Root length (a), average root diameter (b) and specific root length (c) according to soil layer (20, 40, 80 and 120 cm) for pearl millet and *F. albida* in 2020 and for groundnut+weeds and *F. albida* in 2021 at both locations (far from the tree in the dark and under the tree in white, n=6).

3.4. Root chemical characteristics

The root chemical characteristics highly depended on the plant species but not on the location. The root C content was lower for pearl millet than for the other species (Fig. III-5a, p value = 4.07×10^{-2} , Supplementary Table III-7). Both legumes, *F. albida* ($23.1 \pm 10.4 \text{ mg g}^{-1}$) and groundnut+weeds ($17.6 \pm 8.2 \text{ mg g}^{-1}$), had significantly higher root N contents than pearl millet ($11.5 \pm 3.2 \text{ mg g}^{-1}$) between 50 and 100 cm depth (Fig. III-5b, p value = 4.35×10^{-2} , Supplementary Table III-7). In contrast, at all layers, pearl millet ($1.0 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$) had a higher root P content than groundnut+weeds ($0.5 \pm 0.3 \text{ mg g}^{-1}$), and *F. albida* roots had intermediate values ($0.8 \pm 0.3 \text{ mg g}^{-1}$, Fig. III-5c, p value = 2.25×10^{-4} , Supplementary Table III-7). The root C:N was higher for pearl millet than for groundnut+weeds and *F. albida* at all layers and locations, and it tended to decrease with soil depth for all species (data not shown).

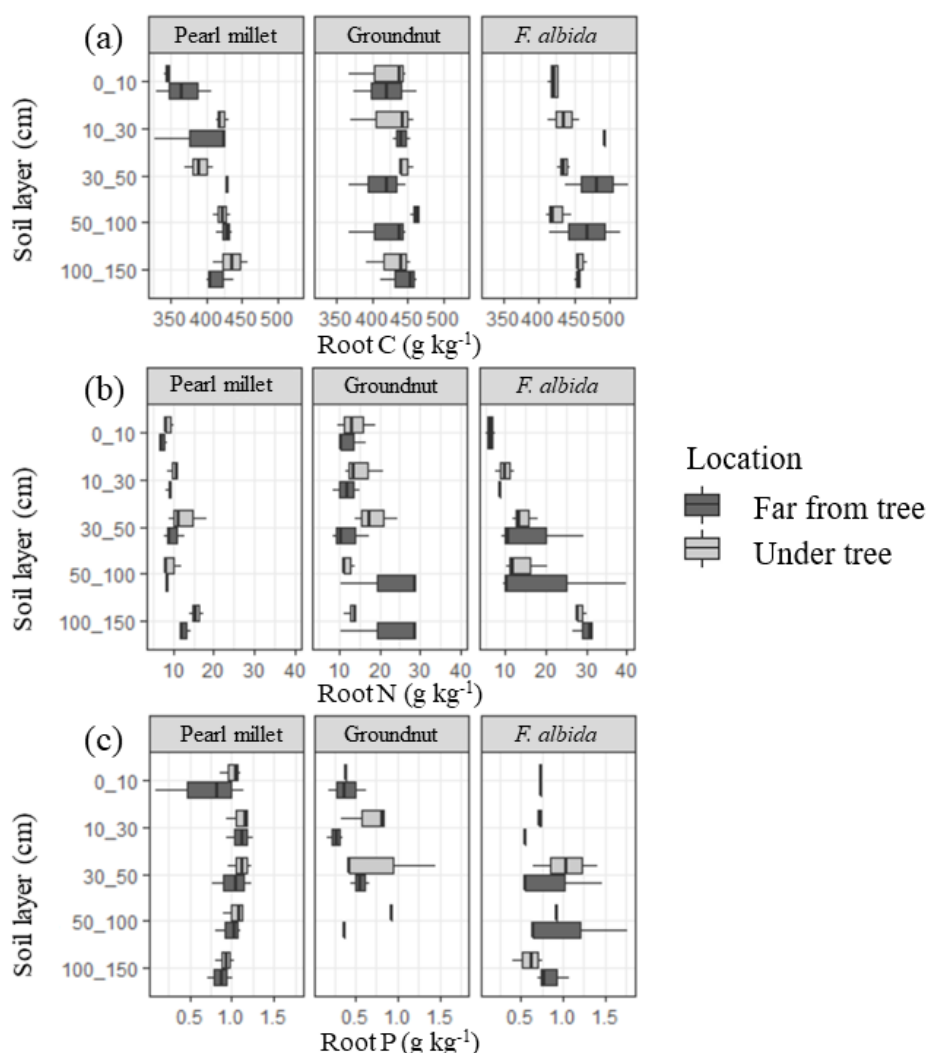


Fig. III-5 Fine root C (a), N (b), and P (c) contents (n=3) according to soil layer (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm of depth) for pearl millet (2020), groundnut+weeds (2021) and *F. albida* (2020) at both locations (under and far from the tree).

3.5. Contribution of root litter to soil C stocks

The soil C stocks were not significantly impacted by the location (p value = 0.96). However, they tended to be higher under ($346 \text{ g}_C \text{ m}_{\text{soil}}^{-2}$) than far from the tree ($270 \text{ g}_C \text{ m}_{\text{soil}}^{-2}$), although only at 0-10 cm of depth. The soil C stocks decreased significantly with soil depth (p value = 9.0×10^{-5} , Supplementary Table III-8), and 85% of the soil C stocks measured between 0 and 150 cm were found below 10 cm depth (Fig. III-6).

The mapping of the root intersect density was similar to that of the root biomass density (Fig. III-6). In both locations, the annual C inputs by roots increased significantly with soil depth for *F. albida* trees and decreased with depth for both crops (p value = 5.37×10^{-3} , Supplementary Table III-5). For all the plant species, the annual root litter-derived C inputs were equivalent in both locations, except at 30-50 cm depth, where the root inputs were significantly higher far from the tree than under it. This was due to higher medium root biomass density (groundnut+weed tap roots) and tree and crop fine root biomass density at this depth far than under the trees.

Between 0 and 150 cm depth, the tree and crop annual root litter-derived C inputs represented low proportions of the soil C stocks (Table III-2). When considering the 0-10 cm layer only, the root litter-derived C inputs were much higher than those in the rest of the studied soil profile and represented a higher part of the soil C stocks (2.70 and 3.67% under and far from the tree for pearl millet and 3.71 and 3.49% for groundnut+weeds).

The tree root litter-derived C inputs through annual root turnover were lower than the crop inputs and represented 0.08 to 0.11% of the soil C stocks at 100-150 cm depth (Table III-2), being equivalent in both sampling years (Fig. III-6). More specifically, between 50 and 150 cm, the annual tree fine root litter-derived C inputs were estimated at 0.88 and 0.84 g m^{-2} under and far from the tree, respectively, which represented 92 and 73% of the tree fine root litter-derived C inputs and 5.6 and 5.2% of the total fine root litter-derived C inputs (crop and tree) in the studied soil profile (0-150 cm, Table III-2).

No significant relationship could be established between the soil nutrient contents and some root variables (Supplementary Fig. III-3).

(a)

	UNDER					FAR					Depth (cm)
	<i>F. albida</i>		Pearl millet			<i>F. albida</i>		Pearl millet			
	Soil C stocks gC m ⁻²	RID	Root litter derived C inputs gC m ⁻²	RID	Root litter derived C inputs gC m ⁻²	Soil C stocks gC m ⁻²	RID	Root litter derived C inputs gC m ⁻²	RID	Root litter derived C inputs gC m ⁻²	
	346 ± 104	0,0	0.01 ± 0.01	22,3	8.96 ± 1.21	270 ± 105	0,0	0 ± 0	23,3	8.71 ± 2.64	0
	400 ± 102	0,0	0.03 ± 0.04	15,3	2.05 ± 0.40	460 ± 136	0,0	0.01 ± 0.02	16,3	2.68 ± 1.00	10
		0,1		10,7			0,0		13,4		30
	405 ± 32	0,3	0.01 ± 0.01	8,4	0.59 ± 0.15	186 ± 928	0,0	0.30 ± 0.36	9,9	1.30 ± 0.54	50
		0,5		6,5			0,0		7,1		100
	766 ± 160	0,6	0.08 ± 0.08	5,2	1.03 ± 0.19	789 ± 125	0,1	0.27 ± 0.32	5,3	1.12 ± 0.49	150
		0,4		3,6			0,4		4,1		500
		0,9		2,8			0,7		3,8		600
		0,9		2,0			0,7		3,3		
		1,0		2,2			1,4		2,3		
	645 ± 120	1,2	0.65 ± 0.14	1,7	0.53 ± 0.15	611 ± 159	1,2	0.45 ± 0.35	2,0	0.46 ± 0.04	
		1,0		1,8			1,0		1,7		
		0,7		1,6			1,2		1,4		
		0,8		1,3			1,2		0,9		
		1,7	1,0	1,5			0,5				
	Water table (wet season)										
	Water table (dry season)										
Total 0-150 cm	2562		0.78		13.16	2316		1.03		14.27	

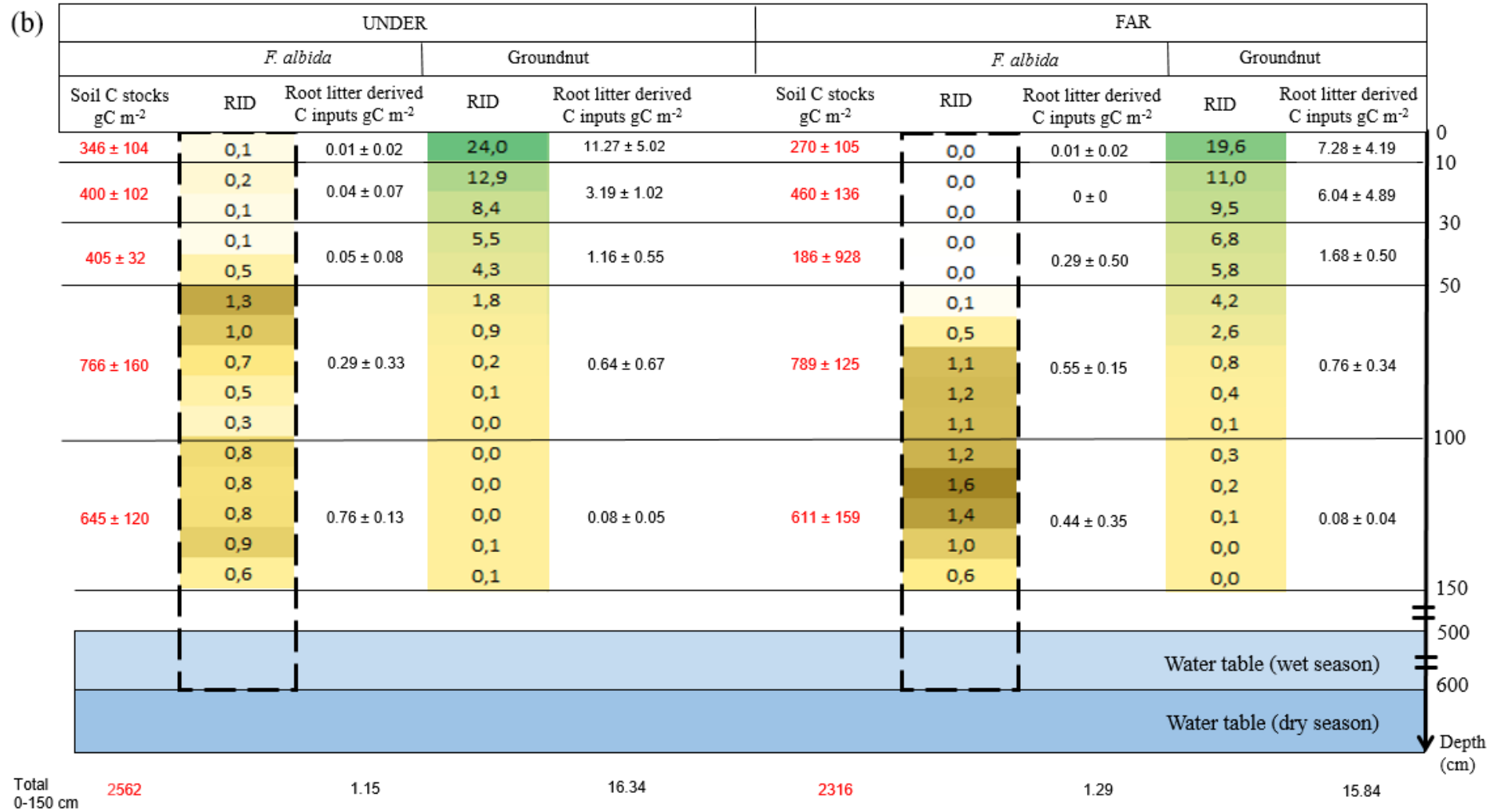


Fig. III-6 Annual root litter-derived C inputs and soil C stocks for crop (pearl millet in 2020 (a) and groundnut+weed in 2021 (b)) and *F. albida* fine roots according to soil layer and location (under (3 m from the tree) and far (30 m) from the tree). Background: mapping of the root intersect density for each soil layer, location, species (tree and crop) and sampling year (n=120). Significant differences in the soil C stocks between each soil layer are indicated by the lowercase letters on the right.

Table III-2 Contribution of annual root litter-derived C inputs to soil C stocks according to the soil layer (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm) and location (under and far from the tree).

Soil layer (cm)	Under			Far		
	Pearl millet	Groundnut+weeds	<i>F. albida</i>	Pearl millet	Groundnut+weeds	<i>F. albida</i>
0-10	2.70±0.60%	3.67±2.61%	0.00±0.01%	3.71±1.92%	3.49±3.38%	0.00±0.00%
10-30	0.54±0.18%	0.86±0.45%	0.01±0.02%	0.65±0.38%	1.44±1.26%	0.00±0.00%
30-50	0.14±0.03%	0.28±0.12%	0.01±0.01%	0.30±0.10%	0.47±0.37%	0.06±0.07%
50-100	0.14±0.01%	0.11±0.06%	0.01±0.01%	0.15±0.08%	0.10±0.05%	0.05±0.03%
100-150	0.08±0.01%	0.01±0.01%	0.11±0.03%	0.08±0.03%	0.01±0.01%	0.08±0.07%

4. Discussion

4.1. Root distribution and properties according to tree presence and soil characteristics

Our first hypothesis was that the heterogeneity of the root systems, characterized by their biomass, distribution and properties, in the agroforestry parkland would be the result of the simultaneous presence of trees and crop species, with deeper and vertically oriented root systems of the N-fixing tree than the crops. As expected, the crop roots were concentrated in the topsoil (more than 70% of the crop root biomass density was distributed between depths of 0 and 30 cm), which represented the crop root zone as defined by Van Noordwijk et al. (1996) and as classically observed in crop systems (Fageria and Moreira 2011), particularly in nutrient-poor areas (Schmid and Kazda 2002). Soil ploughing could also be responsible for crop root accumulation in ploughed soil below 30 cm (Maurya and Lal 1980). As expected, the tree fine and medium root biomass density was much lower than that of pearl millet and groundnut+weeds between 0 and 150 cm of depth, and deep soil layers were colonized down to the water table, located 6 m deep in this area (Diongue et al. 2022), despite the absence of any preferential root orientation. In contrast to tree monoculture in Brazil, where acacia root biomass decreased with depth (Laclau et al. 2013) and despite the absence of vertical orientations, *F. albida* fine roots preferentially colonized the soil layers below the crop root zone (below 30 cm depth). In addition, a surprising observation was the presence of *F. albida* fine and medium roots at a distance of more than 30 m to any tree trunk, with a higher root biomass density than under the trees, probably due to the advanced maturity of the trees, as reflected by the large crown size. This was especially true in the 30-50 cm layer. The absence of any nutrient accumulation below the crop root zone excluded the hypothesis of the accumulation of tree fine roots under the crop root zone to capture the drained nutrients that were not taken up by the crop roots between depths of 0 and 30 cm. We concluded that competition with the crop roots colonizing the 0-30 cm layer prevented the tree roots from exploring shallower layers during the wet season and that the lack of water and superficial soil ploughing prevented the tree roots from occupying the topsoil during the dry season. As a result, in this agroforestry system, trees and crops occupied and explored different soil layers in agreement with complementarity theory (Van Noordwijk et al. 1996) and with the phreatophyte faculty of *F. albida*, which allows the tree to use deep water (Roupsard et al. 1999).

Our second hypothesis was that the root systems would be influenced by variations in soil chemical properties, with a higher root:shoot ratio in poor soils (far from the trees, no interspecific competition) despite equivalent root mass than in zones with higher nutrient levels (under trees, with interspecific competition). Indeed, the higher nutrient contents under than far from the tree in the first 10 cm of soil induced no major difference in crop root biomass density or in chemical quality. Only the crop aerial biomass was increased under the tree compared to far from it, as found previously (Mubarak et al. 2012;

Roupsard et al. 2020; Siegwart et al. 2022), thanks to the high soil nutrient levels and the milder climate under the tree (Tschardt et al. 2011). This led to a higher root:shoot ratio far from the tree than under it, as expected. In addition, the root average diameter was the only crop root trait that was impacted by the location, for both pearl millet and groundnut+weeds. Thinner roots were observed under the tree, probably because of a higher root branching rate. This would favour nutrient absorption under the tree, where the aerial biomass was more important than far from the tree; thus, higher nutrient needs would be expected. Larger roots far from the tree, probably due to a lower root branching rate, would be preferred for soil exploration in a more stressful environment (Roumet et al. 2006). We concluded that the crop roots adapted to the poorer soil far from the tree by developing a higher diameter rather than by modifying the specific root length (Ostonen et al. 2007), which was observed to be constant in both locations.

4.2. Annual contribution of tree and crop root litter-derived C inputs to soil C stocks along the soil profile

Last, the crop root contribution to soil C stocks was expected to be higher in the topsoil but equivalent at all distances from the tree (similar crop root biomass density), while the tree roots would contribute to C stocks mainly in the subsoils and near the tree trunk. The contribution of the annual root litter-derived C inputs to the soil C stocks decreased with soil depth for the two annual crops, while it increased with depth for *F. albida*. The annual crop root litter-derived C inputs from crops were much higher than those from the tree and represented up to 3.67% ($11.27 \text{ g}_C \text{ m}_{\text{soil}}^{-3} \text{ yr}^{-1}$ for groundnut+weeds under the tree) of the soil C stocks ($346 \text{ g}_C \text{ m}_{\text{soil}}^{-3}$) in the 0-10 cm soil layer. When considering the studied root profile down to 150 cm deep, the tree root litter contribution to soil C stocks represented 6.1 and 7.1% of the total root litter-derived C inputs (under and far from the tree, respectively). We speculated that the tree root litter contribution to soil C stocks on the entire soil profile down to the water table was even more important, as tree fine roots were found in great abundance at 5 m depth according to our observations collected with minirhizotrons and buried scanners (C. Jourdan, pers. comm.). Regarding the root contribution to soil nutrient contents, despite the higher N content in the *F. albida* and groundnut+weed roots due to atmospheric N fixation (Ndoye et al. 1995; Campa et al. 2000), no noteworthy increase in soil total N or mineral N was observed in the studied deeper layers or in the groundnut cultivation year (2021), suggesting that the turnover of deep tree roots and the annual inputs of groundnut+weed root litters were not sufficient to foster soil N availability. However, soil nutrient kinetics should be assessed throughout the year to build consistent conclusions.

The estimated contributions of roots to soil C stocks were based on the annual root litter C inputs, without taking into account the decomposition coefficient (Henin et al. 1959). At the same experimental site, pearl millet and *F. albida* fine root litter lost 71 and 64%, respectively, of their mass in the first 1.5 months of decomposition (Siegwart et al. 2022). The litter mass then remained almost constant,

suggesting that only 29 and 36% (respectively) of the root litter left in the soil after 1.5 months could contribute to the soil C stocks in the long term. However, this study did not separate different classes of root diameter to establish their decomposition rate, and the larger roots found far from the tree could actually decompose more rapidly than the very fine roots found under the tree crown (Sun et al. 2013), thus adding more complexity to the spatial heterogeneity of the root contribution to soil C sequestration.

Ultimately, the estimated annual tree and crop root contributions to soil C stocks were rather low in all soil layers in this ecosystem. However, the roots were the only source of soil C from the crops, given that the major part of the aerial crop biomass (groundnut+weeds and pearl millet) was exported and used as grain for food or fodder for livestock (Mason et al. 2015; Faye et al. 2021). In these fields under groundnut/pearl millet rotation, soil C stocks have been found to decrease with increasing years of cultivation: 6 gC kg⁻¹ in the topsoil of an 8-year-old field and only 4 g kg⁻¹ in a 40-year-old field (Elberling et al. 2003). Our study site showed an even lower soil C content (< 2 gC kg⁻¹), which could result from the absence of manure application and the great distance from the village (bushfield) in contrast to the study of (Elberling et al. 2003) and from the long-term cultivation over decades under these conditions. Our soil C stocks were also low compared to those measured in different land uses in Senegal by Woomer et al. (2004). We think that increasing the belowground biomass density by selecting crop varieties that maximize rooting depth and lateral colonization and by increasing the tree density could help to counterbalance aerial export, increase root litter-derived C inputs to soil, and ultimately increase soil C stocks (Supplementary Fig. III-4). However, the effects of an increase in root litter-derived C inputs on soil C stocks are not yet completely understood in the literature, and mechanisms such as the priming effect could occur, especially at depth (Fontaine et al. 2007).

5. Conclusion

The agroforestry parkland observatory “Faidherbia-Flux” in Senegal presents typical agricultural practices and climate and soil properties of the Sub-Saharan region. *F. albida* and crop (pearl millet/groundnut+weeds) roots are distributed in the soil layers according to complementarity theory. The first 10 cm is mainly colonized by crop roots with equivalent biomass density under the tree crown and at more than 30 m from the tree trunk, but a larger root:shoot ratio was observed far from the trees. The annual crop root litter-derived C inputs contributed slightly to soil C storage, representing less than 3.7% of the soil C stocks. In the topsoil, pearl millet roots contributed far from the tree, while groundnut+weeds contributed under it. Furthermore, the tree root biomass density was 5 times lower than the crop root biomass density, and between depths of 0 and 150 cm, the tree root litter represented 6.1 and 7.1% of the total root litter-derived C inputs (under and far from the tree, respectively). In addition, the fine roots reached the water table at 5-6 m. Despite the low density of trees (7 trees ha⁻¹), tree root litter plays an important role in limiting soil C depletion due to aerial biomass exportation, but it is not sufficient; solutions for increasing root biomass density and rooting depth should be considered.

First, increasing the tree density in the parkland would increase the proportion of lignin-rich and thus recalcitrant root litter and increase the soil nutrient status, which is very low. Second, selecting deep-rooting crop varieties could additionally favour drought resistance (Nakhforoosh et al. 2021).

References

- Akinnifesi FK, Rowe EC, Livesley SJ, Kwesiga FR, Vanlauwe B, Alegre JC (2004) Tree root architecture. In: Noordwijk M van, Cadisch G, Ong CK (eds) *Below-ground interactions in tropical agroecosystems: concepts and models with multiple plant components*. CABI, Wallingford, pp 61–81
- Albrecht A, Kandji ST (2003) Carbon sequestration in tropical agroforestry systems. *Agric Ecosyst Environ* 99:15–27. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00138-5](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00138-5)
- Atangana A, Khasa D, Chang S, Degrande A (2014) Carbon Sequestration in Agroforestry Systems. In: Atangana A, Khasa D, Chang S, Degrande A (eds) *Tropical Agroforestry*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 217–225
- Barnes R, Fagg C (2003) *Faidherbia albida: monograph and annotated bibliography*. Oxford Forestry Institute, University of Oxford
- Battie-Laclau P, Laclau J-P (2009) Growth of the whole root system for a plant crop of sugarcane under rainfed and irrigated environments in Brazil. *Field Crops Res* 114:351–360. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.09.004>
- Battie-Laclau P, Taschen E, Plassard C, Dezette D, Abadie J, Arnal D, Benezech P, Duthoit M, Pablo A-L, Jourdan C, Laclau J-P, Bertrand I, Taudière A, Hinsinger P (2020) Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant Soil* 453:153–171. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04181-z>
- Bayala J, Prieto I (2020) Water acquisition, sharing and redistribution by roots: applications to agroforestry systems. *Plant Soil* 453:17–28. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04173-z>
- Bayala J, Sanou J, Teklehaimanot Z, Kalinganire A, Ouédraogo S (2014) Parklands for buffering climate risk and sustaining agricultural production in the Sahel of West Africa. *Curr Opin Environ Sustain* 6:28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.10.004>
- Bayala J, Sanou J, Teklehaimanot Z, Ouedraogo SJ, Kalinganire A, Coe R, Noordwijk M van (2015) Advances in knowledge of processes in soil–tree–crop interactions in parkland systems in the West African Sahel: A review. *Agric Ecosyst Environ* 205:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.02.018>
- Blake GR, Hartge KH (1986) Bulk Density. In: Klute A (ed) *SSSA Book Series*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 363–375
- Campa C, Diouf D, Ndoye I, Dreyfus B (2000) Differences in nitrogen metabolism of *Faidherbia albida* and other N₂-fixing tropical woody acacias reflect habitat water availability. *New Phytol* 147:571–578. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00714.x>
- Canadell J, Jackson RB, Ehleringer JB, Mooney HA, Sala OE, Schulze E-D (1996) Maximum rooting depth of vegetation types at the global scale. *Oecologia* 108:583–595. <https://doi.org/10.1007/BF00329030>
- Cardinael R, Mao Z, Prieto I, Stokes A, Dupraz C, Kim JH, Jourdan C (2015) Competition with winter crops induces deeper rooting of walnut trees in a Mediterranean alley cropping agroforestry system. *Plant Soil* 391:219–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2422-8>

- Charreau C, Vidal P (1965) Influence de l'Acacia albida Del. sur le sol, nutrition minérale et rendements des mils Pennisetum au Sénégal. *Agron Trop Sér 3 Agron Générale Etudes Sci*
- Chenu C, Angers DA, Barré P, Derrien D, Arrouays D, Balesdent J (2019) Increasing organic stocks in agricultural soils: Knowledge gaps and potential innovations. *Soil Tillage Res* 188:41–52. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.04.011>
- Chopart JL, Siband P (1999) Development and validation of a model to describe root length density of maize from root counts on soil profiles. *Plant Soil* 214:61–74. <https://doi.org/10.1023/A:1004658918388>
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Glob Change Biol* 19:988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Dancette C, Poulain JF (1968) Influence de l'Acacia albida sur les facteurs pédoclimatiques et les rendements des cultures. Niamey (Niger) Maison de l'Afrique
- Das DK, Chaturvedi OP (2008) Root biomass and distribution of five agroforestry tree species. *Agrofor Syst* 74:223–230. <https://doi.org/10.1007/s10457-008-9159-9>
- Defrenet E, Roupsard O, Van den Meersche K, Charbonnier F, Pastor Pérez-Molina J, Khac E, Prieto I, Stokes A, Roumet C, Rapidel B, de Melo Virginio Filho E, Vargas VJ, Robelo D, Barquero A, Jourdan C (2016) Root biomass, turnover and net primary productivity of a coffee agroforestry system in Costa Rica: effects of soil depth, shade trees, distance to row and coffee age. *Ann Bot* 118:833–851. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw153>
- Diallo MB, Akponikpè PBI, Abasse T, Fatondji D, Agbossou EK (2021) Combined effect of trees and soil fertility management practices on millet yields in the Sahel. *Agrofor Syst* 95:717–730. <https://doi.org/10.1007/s10457-021-00624-8>
- Diatta S (2021) Estimation du stock et du stockage annuel de carbone dans la biomasse aérienne de *Faidherbia albida* du parc agroforestier de Sob (Observatoire de Niakhar, Sénégal) : approches par inventaires et dendrochronologie.
- Diongue DML, Stumpp C, Roupsard O, Orange D, Do FC, Faye S (2022) Estimating water fluxes in the critical zone using water stable isotope approaches in the Groundnut and Ferlo basins of Senegal. Preprints
- Eissenstat DM (1991) On the relationship between specific root length and the rate of root proliferation: a field study using citrus rootstocks. *New Phytol* 118:63–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00565.x>
- Elberling B, Touré A, Rasmussen K (2003) Changes in soil organic matter following groundnut–millet cropping at three locations in semi-arid Senegal, West Africa. *Agric Ecosyst Environ* 96:37–47. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00010-0)
- Fageria NK, Moreira A (2011) Chapter Four - The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 251–331
- Faye JB, Hopple AM, Bridgham SD (2021) Indigenous farming practices increase millet yields in Senegal, West Africa. *Agroecol Sustain Food Syst* 45:159–174. <https://doi.org/10.1080/21683565.2020.1815927>

- Fitter AH (1985) Functional significance of root morphology and root system architecture. *Funct Significance Root Morphol Root Syst Archit* 87–106
- Fontaine S, Barot S, Barré P, Bdioui N, Mary B, Rumpel C (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450:277–280. <https://doi.org/10.1038/nature06275>
- Gnankambary Z, Bayala J, Malmer A, Nyberg G, Hien V (2008) Decomposition and nutrient release from mixed plant litters of contrasting quality in an agroforestry parkland in the south-Sudanese zone of West Africa. *Nutr Cycl Agroecosystems* 82:1–13. <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9165-3>
- Henin S, Monnier G, Turc L (1959) Un aspect de la dynamique des matières organiques du sol. *Comptes Rendus Hebd Séances L'Académie Sci* p.138-141
- IUSS Working group WRB (2014) World reference base for soil resources 2014: international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome
- Jha P, Prasad Mohapatra K (2010) Leaf litterfall, fine root production and turnover in four major tree species of the semi-arid region of India. *Plant Soil* 326:481–491. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0027-9>
- Laclau J-P, Nouvellon Y, Reine C, Gonçalves JL de M, Krushe AV, Jourdan C, le Maire G, Bouillet J-P (2013) Mixing Eucalyptus and Acacia trees leads to fine root over-yielding and vertical segregation between species. *Oecologia* 172:903–913. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2526-2>
- Lal R (1984) Soil Erosion from Tropical Arable Lands and its Control. In: *Advances in Agronomy*. Elsevier, pp 183–248
- Lalou R, Sultan B, Muller B, Ndonky A (2019) Does climate opportunity facilitate smallholder farmers' adaptive capacity in the Sahel? *Palgrave Commun* 5:1–11. <https://doi.org/10.1057/s41599-019-0288-8>
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- Lorenz K, Lal R (2005) The Depth Distribution of Soil Organic Carbon in Relation to Land Use and Management and the Potential of Carbon Sequestration in Subsoil Horizons. In: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 35–66
- Mason SC, Maman N, Palé S (2015) Pearl millet production practices in semi-arid west Africa : a review. *Exp Agric* 51:501–521. <https://doi.org/10.1017/S0014479714000441>
- Matejovic I (1997) Determination of carbon and nitrogen in samples of various soils by the dry combustion. *Commun Soil Sci Plant Anal* 28:1499–1511. <https://doi.org/10.1080/00103629709369892>
- Maurice J, Laclau J-P, Scorzoni Re D, Gonçalves JL de M, Nouvellon Y, Bouillet J-P, Stape JL, Ranger J, Behling M, Chopart J-L (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. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0380-8>
- Maurya PR, Lal R (1980) Effects of No-Tillage and Ploughing on Roots of Maize and Leguminous Crops. *Exp Agric* 16:185–193. <https://doi.org/10.1017/S0014479700010899>

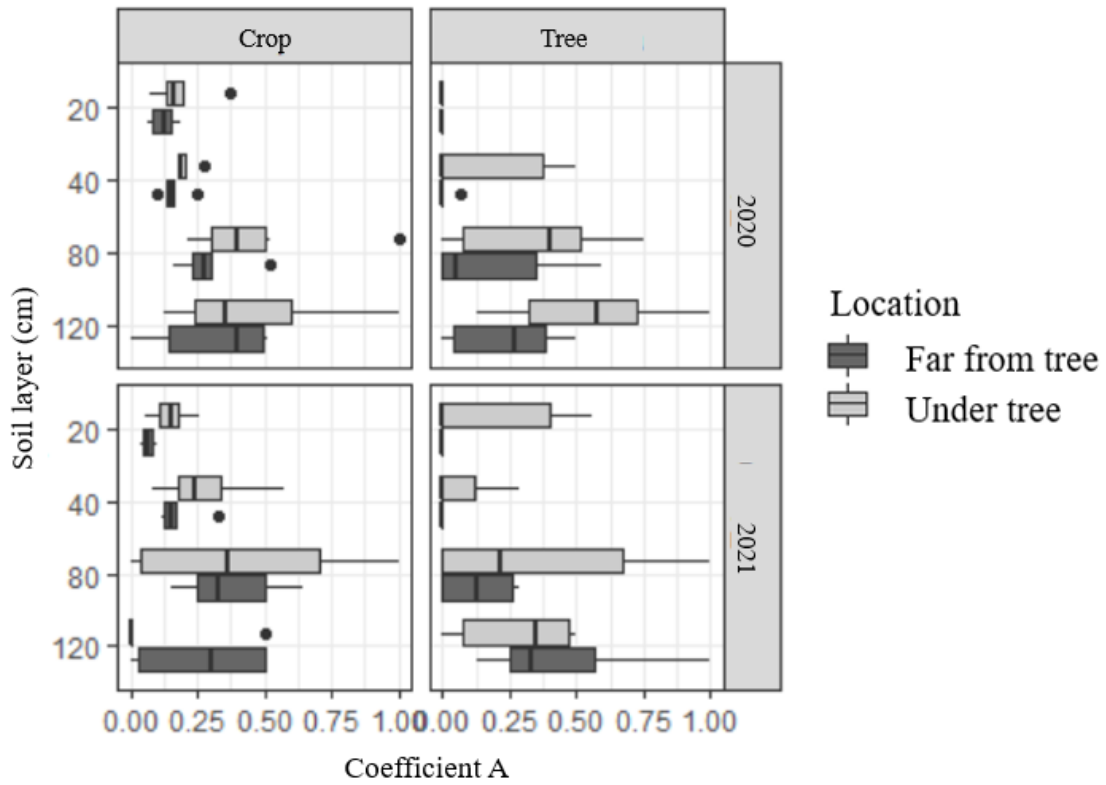
- Mubarak AR, Abdalla MH, Nortcliff S (2012) Millet (*Pennisetum typhoides*) yield and selected soil attributes as influenced by some tree types of the semi-arid tropics of Sudan. *J Arid Environ* 77:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.10.008>
- Nair PKR, Nair VD, Kumar BM, Haile SG (2009) Soil carbon sequestration in tropical agroforestry systems: a feasibility appraisal. *Environ Sci Policy* 12:1099–1111. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.01.010>
- Nakhforoosh A, Nagel KA, Fiorani F, Bodner G (2021) Deep soil exploration vs. topsoil exploitation: distinctive rooting strategies between wheat landraces and wild relatives. *Plant Soil* 459:397–421. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04794-9>
- Ndiaye O, Le Hesran J-Y, Etard J-F, Diallo A, Simondon F, Neil Ward M, Robert V (2001) Variations climatiques et mortalité attribuée au paludisme dans zone de Niakhar, Sénégal, de 1984 à 1996. *Cah Santé* 11:25–33
- Ndoye I, Gueye M, Danso SKA, Dreyfus B (1995) Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ^{15}N isotope dilution technique. *Plant Soil* 172:175–180. <https://doi.org/10.1007/BF00011319>
- Ohno T, Zibilske LM (1991) Determination of Low Concentrations of Phosphorus in Soil Extracts Using Malachite Green. *Soil Sci Soc Am J* 55:892–895. <https://doi.org/10.2136/sssaj1991.03615995005500030046x>
- Ong CK, Black C, Wilson J (2015) *Tree-Crop Interactions, 2nd Edition: Agroforestry in a Changing Climate*. CABI
- Ostonen I, Püttsepp Ü, Biel C, Alberton O, Bakker MR, Löhmus K, Majdi H, Metcalfe D, Olsthoorn AFM, Pronk A, Vanguelova E, Weih M, Brunner I (2007) Specific root length as an indicator of environmental change. *Plant Biosyst - Int J Deal Asp Plant Biol* 141:426–442. <https://doi.org/10.1080/11263500701626069>
- Pan F, Liang Y, Wang K, Zhang W (2018) Responses of Fine Root Functional Traits to Soil Nutrient Limitations in a Karst Ecosystem of Southwest China. *Forests* 9:743. <https://doi.org/10.3390/f9120743>
- Poirier V, Roumet C, Munson AD (2018) The root of the matter: Linking root traits and soil organic matter stabilization processes. *Soil Biol Biochem* 120:246–259. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.02.016>
- Pries CEH, Sulman BN, West C, O'Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biol Biochem* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Rahimi J, Ago EE, Ayantunde A, Berger S, Bogaert J, Butterbach-Bahl K, Cappelaere B, Demarty J, Diouf AA, Falk U, Haas E, Hiernaux P, Kraus D, Roupsard O, Scheer C, Srivastava AK, Tagesson T, Grote R (2021) Modelling Gas Exchange and Biomass Production in West African Sahelian and Sudanian Ecological Zones. *Geosci Model Dev Discuss* 1–39. <https://doi.org/10.5194/gmd-2020-417>
- Rao MR, Nair PKR, Ong CK (1997) Biophysical interactions in tropical agroforestry systems. *Agrofor Syst* 38:3–50. <https://doi.org/10.1023/A:1005971525590>
- Roumet C, Urcelay C, Díaz S (2006) Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytol* 170:357–368. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01667.x>

- Roupsard O, Audebert A, Ndour AP, Clermont-Dauphin C, Agbohessou Y, Sanou J, Koala J, Faye E, Sambakhe D, Jourdan C, le Maire G, Tall L, Sanogo D, Seghieri J, Cournac L, Leroux L (2020) How far does the tree affect the crop in agroforestry? New spatial analysis methods in a *Faidherbia* parkland. *Agric Ecosyst Environ* 296:106928. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106928>
- Roupsard O, Ferhi A, Granier A, Pallo F, Depommier D, Mallet B, Joly HI, Dreyer E (1999) Reverse phenology and dry-season water uptake by *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. in an agroforestry parkland of Sudanese west Africa. *Funct Ecol* 13:460–472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00345.x>
- Schmid I, Kazda M (2002) Root distribution of Norway spruce in monospecific and mixed stands on different soils. *For Ecol Manag* 159:37–47. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00708-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00708-3)
- Schroth G (1998) A review of belowground interactions in agroforestry, focussing on mechanisms and management options. *Agrofor Syst* 43:5–34. <https://doi.org/10.1023/A:1026443018920>
- Siegwart L, Bertrand I, Roupsard O, Duthoit M, Jourdan C (2022) Root litter decomposition in a sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *Faidherbia albida*. *J Arid Environ* 198:104696. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104696>
- Sileshi GW (2016) The magnitude and spatial extent of influence of *Faidherbia albida* trees on soil properties and primary productivity in drylands. *J Arid Environ* 132:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2016.03.002>
- Stephen EA, Evans KD, Akwasi AA (2020) Effects of *Faidherbia albida* on some important soil fertility indicators on agroforestry parklands in the semi-arid zone of Ghana. *Afr J Agric Res* 15:256–268. <https://doi.org/10.5897/AJAR2019.14617>
- Sun T, Mao Z, Dong L, Hou L, Song Y, Wang X (2013) Further evidence for slow decomposition of very fine roots using two methods: litterbags and intact cores. *Plant Soil* 366:633–646. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1457-3>
- Toib AA, Muthuri CW, Gebrekirstos A, Hadgu K, Njoroge J, Sinclair F, Fetene M (2021) To prune or not to prune *Faidherbia albida*: competing needs for water, wheat and tree products in semi-arid Ethiopia. *Agrofor Syst* 95:1661–1673. <https://doi.org/10.1007/s10457-021-00675-x>
- Traore K, Ganry F, Oliver R, Gigou J (2004) Litter Production and Soil Fertility in a *Vitellaria paradoxa* Parkland in a Catena in Southern Mali. *Arid Land Res Manag* 18:359–368. <https://doi.org/10.1080/15324980490497393>
- Tscharntke T, Clough Y, Bhagwat SA, Buchori D, Faust H, Hertel D, Hölscher D, Jührbandt J, Kessler M, Perfecto I, Scherber C, Schroth G, Veldkamp E, Wanger TC (2011) Multifunctional shade-tree management in tropical agroforestry landscapes – a review. *J Appl Ecol* 48:619–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01939.x>
- Van Noordwijk M, Lawson G, Hairiah K, Wilson J (2015) Root distribution of trees and crops: competition and/or complementarity. *Tree-Crop Interact Agrofor Chang Clim* CABI Wallingford UK 221–257
- Van Noordwijk M, Lawson G, Soumaré A, Groot JJR, Hairiah K (1996) Root distribution of trees and crops: competition and/or complementarity. CK Ong P Huxley Eds *Tree-Crop Interact - Physiol Approach* CAB Int Wallingford Pp 319-364
- Van Noordwijk M, Purnomosidhi P (1995) Root architecture in relation to tree-soil-crop interactions and shoot pruning in agroforestry. In: Sinclair FL (ed) *Agroforestry: Science, Policy and*

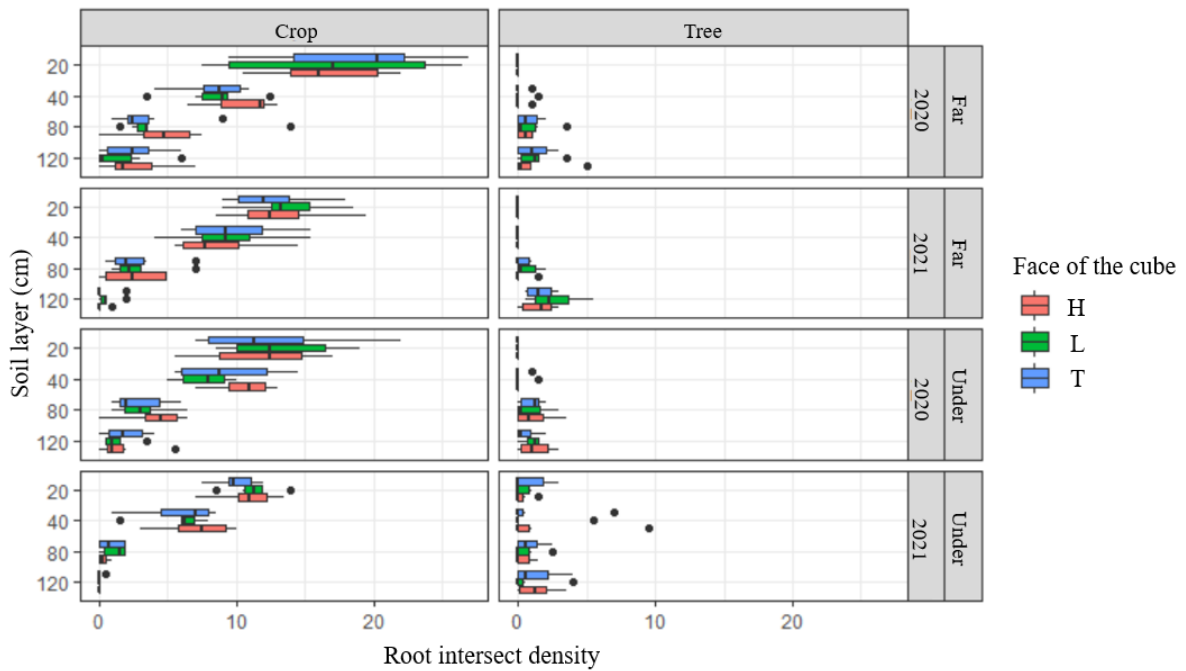
Practice: Selected papers from the agroforestry sessions of the IUFRO 20th World Congress, Tampere, Finland, 6–12 August 1995. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 161–173

Woomer PL, Tieszen LL, Tappan G, Touré A, Sall M (2004) Land use change and terrestrial carbon stocks in Senegal. *J Arid Environ* 59:625–642. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2004.03.025>

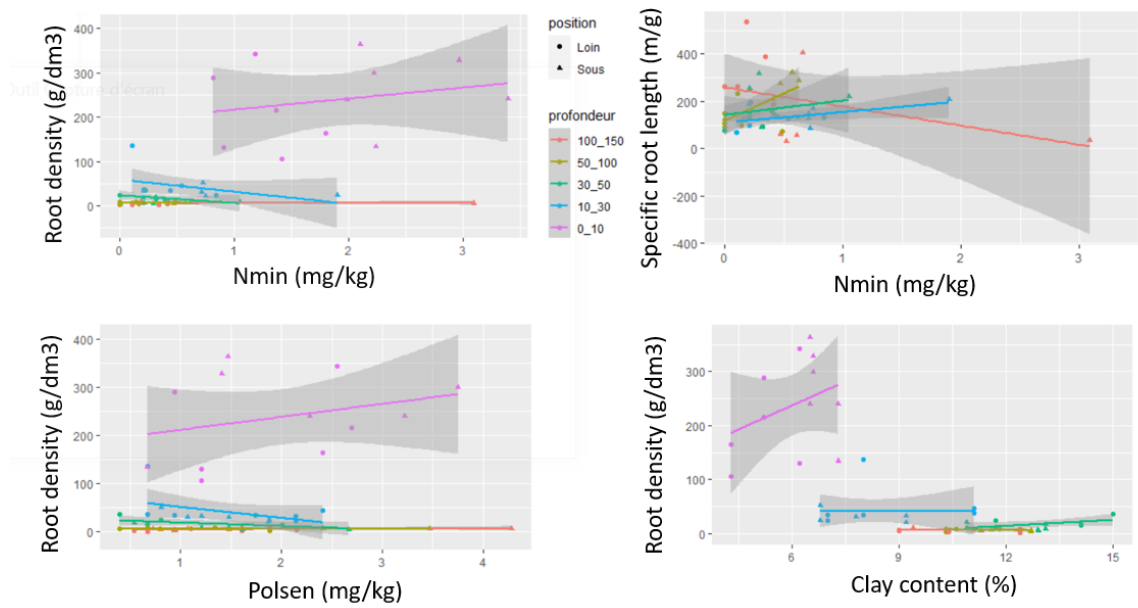
Supplementary Data



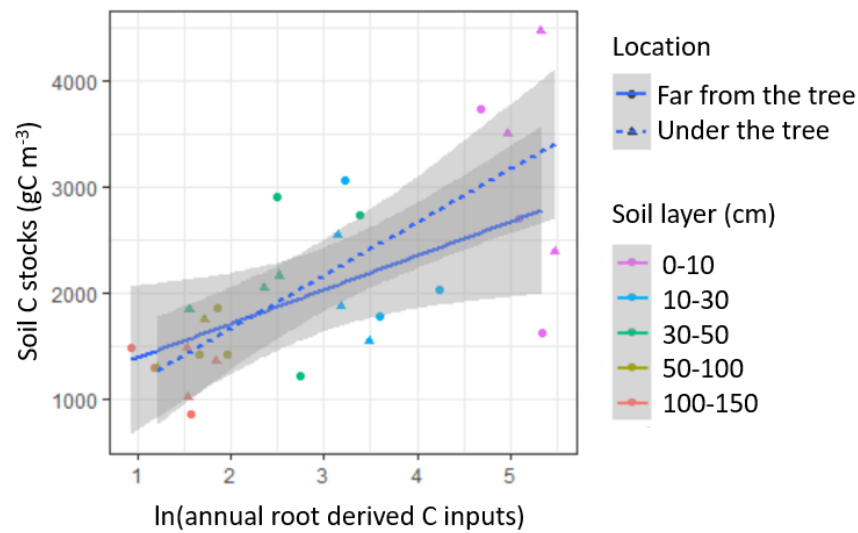
Supplementary Fig. III-1 The coefficient A (indicating root orientation, n=6) according to soil depth (20, 40, 80 and 180 cm) for pearl millet and *F. albida* in 2020 and for groundnut+weed and *F. albida* in 2021 at both locations (far from the tree in dark and under the tree in white).



Supplementary Fig. III-2 Root intersect density (n=6) in each of 3 cube faces (H, L and T) according to soil depth (20, 40, 80 and 180 cm) for pearl millet and *F. albida* in 2020 and for groundnut+weed and *F. albida* in 2021 at both locations (far from the tree in dark and under the tree in white).



Supplementary Fig. III-3 Selected root variables and soil properties according to soil layer (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm) and location (under and far from the tree) in the two sampling years (2020 and 2021)



Supplementary Fig. III-4 Soil C stocks according to annual root litter-derived C inputs

Supplementary Table III-1 Criteria for species determination of the roots (pearl millet or *F. albida*).

Pearl millet roots (2020)	Groundnut roots (2021)	<i>F. albida</i> fine roots
Straight and rigid, brittle when twisted	Diverse	Tortuous and flexible
Highly branched	Taproot and others	Fewly branched
Adherent rhizospheric soil	Adherent rhizospheric soil	No adherent rhizospheric soil
White to yellow	White to brown	White to brown
No particular smell	Specific smell	Specific smell

Supplementary Table III-2 Effect of soil depth (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm), location (under and far from the tree) and their interactions on soil physical and chemical properties. Data are F and p values (n=3).

	Clay content		Silt content		Sand content		Bulk density		Soil total C content		Soil total N content		Soil total P content		Soil C:N		Soil C:P		Soil N:P		Soil C stocks	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Depth	31.8	6.1 3 × 10⁻⁸	1.4	0.28	17.8	4.4 8 × 10⁻⁶	0.7	0.62	11.5	1.0 6 × 10⁻⁴	6.5	2.0 7 × 10⁻³	5.8	3.4 6 × 10⁻³	7.6	1.0 4 × 10⁻³	11.3	1.1 7 × 10⁻⁴	7.5	9.6 2 × 10⁻⁴	11.8	9.0 6 × 10⁻⁵
Location	0.1	0.71	1.9	0.19	0.5	0.49	8.2	9.5 5 × 10⁻³	0.1	0.71	0.9	0.37	0.4	0.52	0.0	0.86	0.0	0.93	0.9	0.36	0.0	0.96
Depth : Location	1.5	0.24	3.4	3.2 2 × 10⁻²	0.5	0.72	0.6	0.66	1.4	0.26	1.2	0.35	0.6	0.66	0.5	0.71	0.5	0.76	0.3	0.88	1.2	0.36

Supplementary Table III-3 Effect of soil depth (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm), location (under and far from the tree), sampling year (pearl millet (2020), groundnut+weed (2021)) and their interactions on soil nutrient contents. Data are F and p values (n=3).

	Soil mineral N content		Soil Olsen P content	
	F-value	p-value	F-value	p-value
Depth	28.6	5.35×10^{-11}	3.4	1.73×10^{-2}
Location	27.8	5.69×10^{-6}	4.2	4.64×10^{-2}
Sampling year	13.7	6.86×10^{-4}	127.2	1.09×10^{-13}
Depth : Location	1.3	3.01×10^{-1}	0.5	0.73
Depth : Sampling year	1.5	0.22	0.3	0.90
Location : Sampling year	1.2	0.27	2.2	0.15
Depth : Location : Sampling year	0.9	0.47	0.7	0.57

Supplementary Table III-4 Crop aerial and root (0 to 150 cm) biomass density in 2020 (pearl millet) and in 2021 (groundnut+weed) according to location (under and far from the tree). Data are mean values, and error bars represent standard deviations (n=3). For each variable, letters indicate significant differences between locations.

	Under the tree	Far from the tree	P-value
Pearl millet (2020)			
Ears (g m ⁻²)	146.1 ± 23.1 b	91.6 ± 33.4 a	3.80×10^{-2}
Stems (g m ⁻²)	277.1 ± 27.8 b	113.4 ± 20.8 a	1.47×10^{-2}
Leaves (g m ⁻²)	97.0 ± 2.5 b	49.8 ± 1.1 a	1.10×10^{-3}
Roots (g m ⁻²)	36.0 ± 3.0	37.6 ± 13.5	0.86
Root:Shoot ratio	0.07 ± 0.01 a	0.14 ± 0.02 b	2.31×10^{-2}
Groundnut+weeds (2021)			
Groundnut aerial parts (g m ⁻²)	474.0 ± 184.7	171.3 ± 138.9	0.08
Weed aerial parts (g m ⁻²)	165.7 ± 99.3	141.3 ± 67.3	0.54
Groundnut hulls (g m ⁻²)	126.0 ± 58.0	68.6 ± 32.6	0.07
Groundnut + weed roots (g m ⁻²)	34.4 ± 10.5	27.8 ± 15.3	0.60
Root:Shoot ratio	0.06 ± 0.03	0.12 ± 0.11	0.39

Supplementary Table III-5 Effect of soil depth (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm), location (under and far from the tree), root type (crop and tree), sampling year (2020 and 2021) and their interactions on fine and medium root biomass density, the coefficient A (indicating root orientation) and annual root litter-derived C inputs. Data are F and p values (n=3).

	Fine root biomass density		Medium root biomass density		Coefficient A		Root litter derived C inputs to soil	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Depth	15.6	1.94×10^{-9}	2.7	3.43×10^{-2}	18.1	4.41×10^{-10}	15.9	1.43×10^{-9}
Location	1.0	0.33	5.2	2.54×10^{-2}	7.0	9.23×10^{-3}	1.2	0.27
Root type	346.4	2.03×10^{-30}	0.9	0.34	13.4	3.54×10^{-4}	475.0	$<2.2 \times 10^{-16}$
Sampling year	1.1	0.29	1.0	4.96×10^{-2}	1.6	0.21	0.2	0.69
Depth : Location	4.2	3.88×10^{-3}	1.5	0.21	0.8	0.52	3.6	9.4×10^{-3}
Depth : Root type	95.5	2.96×10^{-29}	6.9	7.54×10^{-5}	5.9	7.86×10^{-4}	91.7	$<2.2 \times 10^{-16}$
Location : Root type	0.2	0.67	1.7	0.19	1.6	0.21	0.1	0.75
Depth : Sampling year	1.2	0.34	1.7	0.16	1.2	0.32	1.7	0.15
Location : Sampling year	0.1	0.72	0.3	0.58	2.2	0.14	0.1	0.71
Root type : Sampling year	5.1	2.62×10^{-2}	2.3	0.13	1.5	0.23	2.5	0.12
Depth : Location : Root type	1.2	0.32	2.7	3.59×10^{-2}	0.2	0.89	1.3	0.26
Depth : Location : Sampling year	0.9	0.44	0.2	0.96	3.1	2.75×10^{-2}	0.7	0.58
Depth : Root type : Sampling year	3.9	6.31×10^{-3}	1.5	0.20	1.5	0.23	4.0	5.37×10^{-3}
Location : Root type : Sampling year	0.3	0.58	0.2	0.68	0.1	0.74	0.3	0.58
Depth : Location : Root type : Sampling year	0.7	0.60	0.5	0.75	0.4	0.75	0.5	0.77

Supplementary Table III-6 Effect of soil depth (20, 40, 80 and 180 cm), location (under and far from the tree), sampling year (2020 and 2021) and their interactions on root length, root average diameter and specific root length. Data are F and p values (n=6).

	Root length		Root average diameter		Specific root length	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Depth	191.6	2.27×10^{-34}	18.2	8.72×10^{-9}	0.4	0.75
Location	1.1	0.30	21.5	1.61×10^{-5}	0.1	0.81
Sampling year	2.1	0.15	3.1	0.09	9.0	3.79×10^{-3}
Depth : Location	0.4	0.78	2.7	0.05	6.3	7.21×10^{-4}
Depth : Sampling year	0.3	0.79	16.5	3.41×10^{-8}	1.9	0.14
Location : Sampling year	0.5	0.48	2.4	0.13	1.8	0.19
Depth : Location : Sampling year	1.7	0.18	2.8	4.81×10^{-2}	1.1	0.36

Supplementary Table III-7 Effect of soil depth (0-10, 10-30, 30-50, 50-100 and 100-150 cm), location (under and far from the tree), species (pearl millet (2020), groundnut+weed (2021) and *F. albida* (2020)) and their interactions on the root C, N, and P contents, C:N, C:P and N:P. Data are F and p values (n=3).

	Root C content		Root N content		Root P content	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Depth	2.8	3.37×10^{-2}	7.8	4.73×10^{-5}	1.6	0.20
Location	2.1	0.15	0.1	0.71	2.2	0.15
Species	14.9	7.35×10^{-6}	7.6	1.25×10^{-3}	10.4	2.25×10^{-4}
Depth : Location	0.6	0.66	1.3	0.27	0.2	0.91
Depth : Species	1.1	0.37	2.2	4.35×10^{-2}	0.4	0.87
Location : Species	3.4	4.07×10^{-2}	0.9	0.41	0.7	0.50
Depth : Location : Species	1.7	0.14	1.0	0.47	0.5	0.77

Article 2

Root distribution and properties of a young alley-cropping system: effects on soil carbon storage and microbial activity

Siegwart Lorène¹, Jourdan Christophe^{1,2}, Piton Gabin¹, Sugihara Soh³, Van den Meersche Karel^{1,2}, Bertrand Isabelle¹

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, InstitutAgro Montpellier, Montpellier, France

² CIRAD, UMR Eco&Sols, F-34398 Montpellier, France

³ Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchushi, Tokyo 183-8509, Japan



Abstract

In agroforestry systems, the root distributions and properties of the annual and perennial vegetation are poorly known, although they are recognized for fostering soil carbon (C) stocks through annual root-derived C inputs and by altering microbial activity. This study aimed to evaluate the potential contribution of roots from the understory vegetation strip (UVS) and the crop to top- and subsoil C stocks (0-100 cm) to a 3-year-old agroforestry system of the alley-cropping type with associated trees and cereal crops.

Root biomass, chemical composition, functional traits and anatomical structure were assessed in parallel to a characterization of soil physicochemical and microbiological properties, including enzymatic activity, at different depths and locations perpendicular to the tree line, reflecting the effect of the distance to the tree.

The root biomass and properties were heterogeneous in the young alley-cropping system due to the presence of different plant communities and the heterogeneity of the soil mineral N content according to the location perpendicular to the tree line. The soil microbiological properties and organic C stocks did not vary horizontally at this stage of agroforestry but should be monitored through multiple-time samples to confirm a differentiation in subsequent years suggested by the tight link between root stoichiometry and microbial extracellular enzymatic activities that we found.

Altogether, our results suggested that increasing the root biomass in topsoil in agroforestry systems positively contributes to increasing soil organic C stocks, but in deeper soil layers, an increase in litter inputs with a high C:N ratio might accentuate microbial N limitations and limit soil C storage.

Abbreviations

UVS: understory vegetation strip; C: carbon; N: nitrogen; P: phosphorus; CaCO₃: calcium carbonate; NH₄⁺: ammonium ions; NO₃⁻: nitrate ions; HNO₃: nitric acid; MB C and N: microbial biomass carbon and nitrogen; BG: β-1,4 glucosidase; CBH: cellulobiohydrolase; NAG: β-1,4-N-acetylglucosaminidase; LAP: leucine aminopeptidase; AP: alkaline phosphate

1. Introduction

Agroforestry systems are increasingly recognized for their soil C sequestration potential (Kaur et al. 2000; Sharrow and Ismail 2004; Cardinael 2015). The alley-cropping agroforestry system encompasses diverse root systems due to the simultaneous presence of three types of vegetation: trees planted in lines, the understory vegetation strip in the tree lines (UVS) and the crop in the inter-rows (Torquebiau 2000; Boinot et al. 2019; D’Hervilly 2021). Three plant communities (i.e., vegetation cover type) would result from species cohabitation in these systems: UVS+tree in the tree line, crop+UVS at the interface between the crop and UVS, and the crop in the inter-row. At the community scale, these root systems might differ in their properties, encompassing root chemical quality (C, N, P, lignin, cellulose, hemicellulose, and soluble compound contents), dynamics (growth rate and turnover) and average functional traits (specific root length, root tissue density and diameter). Indeed, the trade-off between resource acquisition and conservation would control plant tissues, resulting in differences in the root systems at the community level that operate within all root types (Prieto et al. 2015). The spatial heterogeneity of root and soil properties suggest different mechanisms of soil C dynamics including soil C sequestration at the plant-community scale. However, characterization of these differences in alley-cropping systems and especially in deep soil layers is still lacking, despite their higher soil C sequestration potential (Tautges et al. 2019) with longer C turnover times (Balesdent et al. 2018) compared with the topsoil (0-30 cm), which is mainly composed of younger, fast cycling organic matter. The tree and herbaceous roots in the UVS, which is dominated by perennial species, might have a higher root biomass density, with roots colonizing deeper soil layers than the annual crop roots (Beniston et al. 2014; Ferchaud et al. 2015; Duchene et al. 2020). Furthermore, perennials use a conservative strategy, compared to annual plants, preferring soil exploration for better resource absorption with greater specific root length (root length per root mass) and root N concentration and lower root tissue density (Roumet et al. 2006; Hummel et al. 2007; Weemstra et al. 2016).

The heterogeneity of the root systems (distribution, biomass and properties) at the communities level in alley-cropping systems would induce a heterogeneity of the root contribution to soil C storage (i) as direct inputs of root-derived C through rhizodeposition and root mortality (Bolinder et al. 1997; Pausch and Kuzyakov 2018) since root quality (recalcitrance) controls root litter decomposition kinetics (Bonanomi et al. 2021) and subsequently induces the formation of stable soil organic matter at a level 2 to 5 times greater than aerial plant parts (Balesdent and Balabane 1996; Rasse et al. 2005; Lin et al. 2020; Villarino et al. 2021). Additionally, the heterogeneous root contribution to soil C storage (ii) is due to the effect on soil microbial activity, since the plant, soil and microbial (including enzymatic) C:N:P ratios respond positively to increasing plant diversity (Chen and Chen 2021). The root system diversity in agroforestry systems also has consequences for the temporal dynamics of root-derived C inputs that occur mainly with the death of plant roots at each crop harvest (Carvalho et al. 2013; Hirte et al. 2018) and through root turnover for the perennial species of the UVS and trees (Houde et al. 2020).

Alley-cropping systems have modified environmental conditions compared to conventional cropping systems (Batish et al. 2007; Garrett et al. 2021) that may induce further spatial heterogeneity of the root biomass and root properties of plant communities (Deyn et al. 2008). Perpendicular to the tree line, gradients of soil properties (Guillot 2018; D'Hervilly 2021), competition for light (Dufour et al. 2013; Querné et al. 2017; Zhang et al. 2019) and water acquisition *vs.* redistribution (Livesley et al. 2004; Bayala and Prieto 2020) have been observed. Indeed, the crop yield was often shown to be reduced near the tree or hedge rows (Singh et al. 1989; Eastham and Rose 1990; Lawson and Kang 1990; Miller and Pallardy 2001), despite the improved soil qualities at these locations (Guillot et al. 2021). Furthermore, at the UVS-crop interface, hydraulic constraints and nutrient shortage conditions may occur due to interspecific competition (Cardinael et al. 2015; de Parseval et al. 2017; Battie-Laclau et al. 2020) induced by the colonization of the crop zone by UVS roots (Battie-Laclau et al. 2020). In response to these constraints, crops at the vicinity of the UVS could, for example, modify their root functional traits by increasing the diameter or increasing the specific root length to improve absorption capacity and soil exploration, respectively (Pradier 2016; Duan et al. 2019). However, the few studies observing differences in soil and root properties between alley-cropping and conventional cropping systems analyzed mature agroforestry systems (Udawatta et al. 2014; Cardinael et al. 2017; Dufour et al. 2020). To our knowledge, no study has assessed period required for the root horizontal gradient to be established in agroforestry systems, while few studies have shown modifications of the soil properties starting 5 years after the introduction of trees (Nyberg and Högberg 1995; Wang et al. 2005). A better understanding of the root system growth and distribution is necessary to fully understand the mechanisms underlying the spatiotemporal variation in C stocks in agroforestry.

The vertical variations in soil physical and chemical properties (Hartemink et al. 2020) also affect root development and root properties (Eissenstat et al. 2000; Konopka et al. 2009; Hodge et al. 2009; Freschet et al. 2017), and the different components of alley-cropping systems might respond differentially to this vertical variation. In the crops of the agroforestry system, vertical variations in the crop root system depend only on the crop phenotypic plasticity that might involve a response to competition with the perennial vegetation at the border of the inter-row (Duan et al. 2019; Battie-Laclau et al. 2020). On the other hand, root system variations along the soil profile in the perennial part of the agroforestry system are due to a combination of individual root system plasticity and the vertical organization of the different plant species composing the perennial community (Milchunas and Lauenroth 1989; Aerts 1999; Prieto et al. 2015). In the literature, studies analyzing the relationships between soil and root properties across the soil profile are mainly conducted on tree plantations (Makita et al. 2011; Tückmantel et al. 2017; Germon et al. 2020). Wang et al. (2016) and Prieto et al. (2015) compared topsoil roots with those found in deeper layers and showed that deep roots had a larger diameter for better soil penetration, less N because of less available nutrients at depth, and larger and more numerous xylem vessels for better hydraulic conductivity. In contrast, the finer textured soil that is sometimes observed at depth is

characterized by a smaller pore size and thus induces a smaller root diameter (Castle and Krezdorn 1979), while the soil bulk density favors thicker and denser fine roots (Freschet et al. 2017). An understanding of the vertical response of root systems in alley cropping is essential for understanding their potential for C sequestration in the subsoil.

The root systems directly (as C inputs) and indirectly (by controlling microbial decomposing activity) affect the soil C stocks (Smith et al. 2014; Poirier et al. 2018; Freschet et al. 2021). As the root properties might be heterogeneous in agroforestry systems (due to the presence of several plant communities with different strategies and the effects of soil physicochemical properties) along vertical and horizontal axes, our study aimed to investigate vertical and horizontal variations in the roots, soil and microbiological characteristics associated with CNP cycles along the rooted soil profile (up to a depth of 100 cm) in a young alley cropping agroforestry system from a Mediterranean climate to evaluate the potential contribution of roots to soil organic C stocks.

We first hypothesized that the response of root properties to depth (and the associated vertical gradient of soil physicochemical properties) differs between perennial (UVS) and annual (crop) plant communities and at the interface of the perennial-annual communities' interface in an agroforestry system. More precisely, we hypothesized that perennial UVS has a deeper root system, uses a conservative strategy (lower specific root length and a higher root C:N ratio) and exhibits a more important variation of root properties than the annual crop. We expected this depth response to be characterized by changes in root properties indicating a shift from exploitative nutrient acquisition function (high nutrient content) in the shallow, nutrient-rich layer to conservative water acquisition and transport functions in deeper, nutrient-poor layers (larger diameter and higher lignin content). For the crop, we expected the root response to depth to be more pronounced at the interface with the UVS as a response to interspecific competition.

Second, we hypothesized that the horizontal variations (i.e. under the different plant communities perpendicular to the tree line) in the root biomass and properties would (i) induce a horizontal differentiation of the soil microbial activity that would already be visible after 3 years of agroforestry and (ii) show an initial differentiation of the soil organic C stocks across the agroforestry system, with an increased microbial biomass, activity and soil C stock under perennial UVS and at the interface between the crop and UVS. Moreover, we expected these horizontal differences to be greater at depth, where roots are the principal source of soil organic matter.

We sampled and analyzed roots and soils in a 3-year-old alley-cropping system with a Mediterranean climate to test these hypotheses. The sampling design considered 3 locations in a horizontal gradient perpendicular to the tree line (UVS, crop near the UVS and crop far from the UVS) and 3 soil depths up to 100 cm. Average root properties of plant communities were assessed and related to microbial and soil

properties to assess the effects of the plants on ecosystem functioning (Lavorel and Garnier 2002; Legay et al. 2014).

2. Materials and methods

2.1. Study site

The “Dispositif Instrumenté en Agroforesterie Méditerranéenne sous contrainte hydrique” (DIAMs) is located 10 km south of Montpellier (France) under a Mediterranean climate (43.612°N; 3.976°E). The soils are classified as Skeletic Rhodic Luvisols (IUSS Working group WRB 2014), according to the high proportions of stones (up to 60%), a pronounced red color and a layer deeper than 100 cm with accumulation of clay. The following layers were identified: Ap1: plow layer with a lumpy texture (0-20 cm), Ap 2: second plow layer (20-50 cm), Bt 1: illuvial layer with lattice clays and stones (50-80 cm), Bt2: illuvial layer with lattice clays without stones (80-125 cm) and IICk: bedrock with calcium carbonates (Fig. III-7b). Before setting the agroforestry system (2017), the annual crops were cereals (wheat and alfalfa).

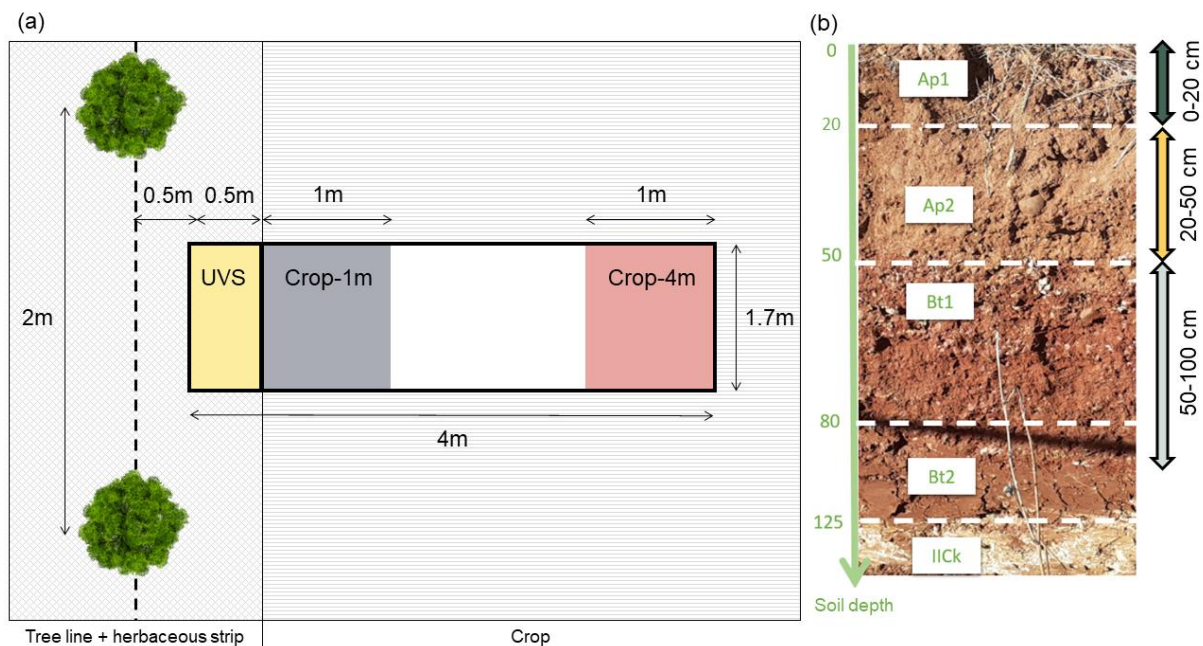


Fig. III-7 Aerial view of the pit (a) with the three types of vegetation (trees, UVS and crop) and of the soil profile with the identified soil layers (Skeletic Rhodic Luvisols) according to depth (from 0 to 165 cm of depth) and the 3 studied soil depths (0-20, 20-50 and 50-100 cm).

This agroforestry site of 5 ha is divided into three blocks separated by several hundred meters and representing independent replicates. The alley-cropping system was planted in 2017 with black locust (*Robinia pseudoacacia*), a N-fixing species, in 2-m-wide rows covered with an understory vegetation strip (UVS). The herbaceous species sown in 2019 (*Festuca arundinacea*, *Dactylis glomerata*, *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*), however, were only scarcely present. Instead, some of the common species found in the UVS were *Lolium arundinaceum*, *Bromus*, *Papaver rhoeas*, *Crepis sancta*,

Sonchus arvensis, *Lolium perenne*: community of plurennial plants. The trees were planted every 2 m on the rows, leading to a density of 294 trees ha⁻¹, and were intercropped with 17 m crop alleys made of rotations of cereal and legume (wheat/barley/pea) crops. Beginning in October 2019, the soil was plowed to 20 to 50 cm. At the end of October 2019, durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) was sown as a winter crop with a sowing density of 140 kg ha⁻¹. A phytosanitary treatment (Atlantis Pro) was applied on January 30, 2020. Fertilization campaigns were conducted on February 6, 2020, with Nexens 46 fertilizer (60.0 kg N ha⁻¹) and on the April 11, 2020, with Smart N 46 fertilizer (80.0 kg N ha⁻¹). Crop harvest occurred on June 25, 2020, and straw was left on the topsoil.

To evaluate the homogeneity of N fertilizer spread, 3 pseudoreplicates x 3 blocks = 9 replicated cups with a diameter of 19.5 cm were set in the crop at 1.5 and at 4 m from the tree line. Immediately after fertilizer application, the granules were collected in the cup, weighed, and reported on a per m² basis.

2.2. Sampling strategy

Sampling started on May 19, 2020, after 3 years of agroforestry. It corresponded to the flowering stage of the wheat and herbaceous species in the UVS. The tree DBH (diameter at breast height) was 4.3 ± 1.2, 4.0 ± 1.3 and 3.9 ± 0.9 cm in blocks 1, 2 and 3 respectively. The tree height was 338 ± 65, 323 ± 72 and 327 ± 56 cm in blocks 1, 2 and 3 respectively (measured in January 2021). One pit (4 m long × 1.7 m wide × 1.5 m deep) was dug per plot (3 replicates) with a backhoe. The pits were dug between two trees (spaced by 2 m) instead of at the base of a tree, perpendicular to the herbaceous strip and starting from 0.5 m from the middle of the tree row to the intercrop to focus on the interaction between the UVS and wheat in the transition zone (Fig. III-7a). All pits were oriented toward the south, i.e., the sunny side of the trees. In addition to the vertical axis with 3 soil depths (0-20, 20-50 and 50-100 cm of depth) established according to the identified soil layers (Fig. III-7b), the sampling strategy also considered a horizontal axis with three locations depending on the distance to the tree (Fig. III-7a): the UVS (between 0.5 and 1 m from the tree line), the Crop-1 m (between 1 and 2 m from the tree line) and the Crop-4 m (between 3.5 and 4.5 m from the tree line). In summary, the sampling strategy was defined by 3 independent plots × 3 locations according to the distance from the tree line × 3 soil depths.

Just before digging the pits, aboveground biomass was sampled on each subplot and location in a 1 m² area. Samples were air-dried at 50°C for 72 hours and weighed, and values were reported on a per m² basis.

2.3. Root characterization

2.3.1. Root biomass

During the excavation of the pits, a backhoe bucket was used to sample a volume of 28 dm³ of soil at each location and depth. All living roots were sorted manually from this volume, carefully washed on a 0.5 mm sieve, air-dried at 50°C for 72 hours and weighed. Knowing the volume of the backhoe bucket,

the root biomass density (g dm^{-3}) was calculated for each location and soil depth ($n=3$). Root dry biomass was reported on a per m^2 basis (g m^{-2}), and the proportion of root biomass in each soil depth (%) was calculated as the ratio of the root biomass in the soil depth to the total root biomass in the entire sampled soil profile.

2.3.2. Root mapping

For each pit and at each location, 4 replicated grids with a size of 50×100 cm were hung against the refreshed pit soil profile (Chopart and Siband 1999). The grids were composed of elementary tiles of 10×10 cm (5 in width and 10 in length). The number of root intersections in each elementary tile in the grids was manually counted. At each location, the root map was then established from depths of 0 to 100 cm and the mean value of the root impact density was calculated for the 3 blocks and the 4 pseudoreplicates ($n=12$).

The root intersect method from Chopart and Siband (1999) was applied to analyze the root isotropy (preferred orientation of the direction of root growth). Two stainless steel cubes of $10 \times 10 \times 10$ cm (1 dm^3) with opposite orientations were placed in 2 soil profiles (pseudoreplicates) of each pit and at each location. However, because the soil compaction at 50-100 cm was too high, it was not possible to use the cubes at that depth. The cubes were then extracted as intact as possible. On each of the 3 faces (H- perpendicular to the profile and parallel to the soil surface, T- parallel to the profile and perpendicular to the soil surface and L- perpendicular to the profile and to the soil surface), the root impact density was determined as the number of root intersections with the vertical plane; see Maurice et al. (2010) for details. The A coefficient was calculated as an indicator of the root isotropy (Chopart and Siband 1999):

$$A = \sqrt{\frac{(RID_T - \overline{RID})^2 + (RID_L - \overline{RID})^2 + (RID_H - \overline{RID})^2}{6 \times \overline{RID}^2}}$$

where RID_i is the root impact density on face i and \overline{RID} is the average root impact density on all faces of the cube. When $A=0$, there is root isotropy, no specific orientation for root growth. When $A=1$, the roots grow only in a preferred direction.

In total, 72 cubes were sampled with 2 cube orientations \times 2 soil depths \times 3 locations \times 2 pit soil profiles \times 3 pits. After determining the root impact density on the 3 faces of the soil cubes, the roots inside the soil cubes were carefully sorted, washed with water on a 0.5 mm sieve and stored at 4°C prior to analyses.

While conducting the root mapping, few medium roots (diameters between 2 and 10 mm) were observed and identified as being from the UVS plants. Because they were so rare (less than 4 roots considering all pits), they were not considered in this study, which focused on fine roots (smaller than 2 mm in diameter). Indeed, fine roots include (i) 100% of the crop roots (which are all entering the soil

compartment at harvest) and (ii) the roots of the herbaceous plants that are present due to root turnover and thus play a role in soil C inputs.

2.3.3. Root functional traits

Roots extracted from the cube sampling were spread out in a transparent bin with deionized water and scanned at 300 dpi with a scanner (Epson Expression © 10000 XL). The resulting images were processed with image analysis software (WinRHIZO v. 2005b Regent, Canada©) for each cube content, allowing us to determine the total root length (cm) and the mean root diameter (mm). Knowing the volume of the cubes, the root length density (cm dm⁻³) was calculated. After the scans, roots from the cube sampling were air-dried at 50°C for 72 hours and weighed. The specific root length (m g⁻¹) was calculated as the ratio of fresh root length to root dry mass in each cube. Because the root traits strongly depend on the soil depth and plant species (Van noordwijk and Brouwer 1991), these functional root traits were measured in a pool of roots from different communities (UVS, Crop-1m and Crop-4m), as average root traits using the method reported by Legay et al. (2014).

Furthermore, the root biomass density obtained in the cubes at 0-20 and 20-50 cm was compared with the root biomass density obtained from the backhoe sampling as described above. A significant difference was not observed between the two methods (p value = 0.12, data not shown). Only the results from the backhoe method were used for root biomass quantification.

2.3.4. Root chemical composition

Dry roots from backhoe sampling were used for the biochemical analyses because of the larger root biomass retrieved. C fractions (soluble compounds, cellulose, hemicellulose and lignin) were determined in a 500 mg root litter subsample with a fiber analyzer (Fibretherm®, Gerhardt) using the protocol described by Van Soest (Goering and Van Soest 1970). Root C and N contents were determined from 3 mg subsamples of root litter with an automatic elemental analyzer (Flash 2000, ThermoFischer Scientific). For the analysis of the total root P content, 50 mg of litter powder were mixed with 65% HNO₃ and mineralized for 15 min at 200°C in a Milestones Ethos Easy microwave with a standard and blank. The total P content was then quantified colorimetrically with the yellow vanadomolybdate assay (NF U42-246). The C stocks in living roots (kg of C m⁻³ soil) were calculated by multiplying the root C content (%) by the root biomass density (kg m⁻³). Several root quality indexes were calculated: the lignin:N ratio (Melillo et al. 1982), the soluble compounds:cell wall ratio (McClaugherty et al. 1985) and the ligno-cellulosic index (LCI, Melillo et al. 1989), which was calculated using the following equation:

$$LCI = \frac{lignin}{lignin + cellulose + hemicellulose}$$

where lignin, cellulose and hemicellulose are the corresponding root C fractions (%).

2.3.5. Root anatomy

Just after digging the pits, living wheat roots were sampled from the pit's wall at each soil depth and at 2 locations (Crop-1 m and Crop-4 m) and immersed in a mixture of formaldehyde, acetic acid and ethanol (Kladnik 2013) kept at 4°C pending further preparation for anatomical observation. The roots were then fixed in a 25% glutaraldehyde and 10% paraformaldehyde solution in a phosphate buffer (0.2 Na, pH 7) with 1% caffeine and stored in a 70% ethanol solution at 4°C (Salma 2015). Alcohol baths with increasing concentrations of absolute alcohol allowed gradual dehydration. Embedding of samples in resin was performed with a Technovit® 7100 kit. Samples were then cut into 4.5 µm sections with a manual Leica RM2255 microtome and mounted on a glass slide. Sections were then successively stained in periodic acid-Schiff's reagent (to reveal insoluble carbohydrates) and in naphthol blue black to reveal proteins (Buffard-Morel et al. 1992). Screening of the glass slides was performed automatically with a Hamamatsu NDP slide scanner (Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT, MRI). Several measurements and counts were performed on 1 section × 4 pseudoreplicated roots (for each location, soil depth and plot) with ImageJ Software (version 1.53e): total root area, stele area, number of metaxylem vessels, area of each metaxylem vessel and endoderm width. For each measurement, we calculated the mean value of the pseudoreplicated roots to analyze the root anatomy for each soil depth and each location (n=3).

2.4. Soil characterization

During the excavation of the pits, more than 5 kg of soil was sampled at each location and soil depth (n=3). The soil was immediately passed through a 2 mm sieve. Subsamples were stored at 4°C to retain their field moisture prior to analyses, other subsamples were frozen, and others were dried at 65°C for 72 hours. The soil moisture content of all samples was determined using a gravimetric method after drying for 48 hours at 105°C.

Dry soils (dried at 65°C for 72 hours) were analyzed for total C and N contents using dry combustion (Matejovic 1997). Other dry soil subsamples were analyzed by the Laboratoire d'Analyse des sols (INRAE, Arras) to determine the following parameters: soil CaCO₃ content (Allison 1960), cation exchange capacity using cobalt hexamine (Ciesielski and Sterckeman 1997), soil pH in a 1:5 soil-water suspension, total P content (Ciesielski et al. 1997; Ivanov et al. 2010), available P content (Olsen 1954), organic P content and soil texture of five fractions, namely, clay, silt (fine and coarse) and sand (fine and coarse). The organic C content was calculated as the difference between the total C content and inorganic C content as measured in CaCO₃.

Mineral N was extracted from wet soils with a 1:4 soil-1 M KCl solution. NO₃⁻ and NH₄⁺ contents were determined using continuous flow colorimetry (Continuous Flow Analyzer, Skalar), and the sum of NO₃⁻ and NH₄⁺ contents represented the mineral soil N content. Dissolved organic C was extracted with a 1:5 soil-distilled water solution, and the dissolved organic C content was measured with a TOC/TN analyzer (TOC-Vsch-TNM SHIMADZU). The soil MBC (microbial biomass C) and MBN (microbial biomass

N) were quantified with the chloroform fumigation-extraction technique (Vance et al. 1987). A correction factor of 0.45 was included.

In frozen soils, the abundance of the 16S and 18S rRNA genes was estimated by performing real-time quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) of ribosomal DNA (Smith and Osborn 2009) using a thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, California). The potential activities of 5 extracellular enzymes involved in the C, N and P cycles were measured using the protocol reported by Bell et al. (2013): β -1,4-glucosidase (BG), cellulobiohydrolase (CBH), N-acetyl-glucosaminidase (NAG), leucine aminopeptidase (LAP) and alkaline phosphatase (AP). The enzymatic activities were obtained in $\text{nmol g}^{-1}_{\text{soil}} \text{min}^{-1}$ with a fluorometric microplate reader (Victor 3, Perkin Elmer, 365 nm excitation wavelength and 450 nm emission wavelength).

The soil bulk density was measured in the topsoil (0-20 cm) using a water method as it is suitable for stony soils (Jolivet et al. 2018). An excavation was made from 0 to 20 cm. The soil was passed through a 2 mm sieve, dried at 105°C for 48 hours and weighed. The volume was determined by placing a plastic bag in the excavation hole and measuring the volume of water that could fill the bag. At deeper soil depths (20-50 and 50-100 cm), an imaging-sensor-based measurement method was used as a convenient method for stony soils (Coulouma et al. 2021). An excavation was made in the wall of the pit at depths of 20-50 and 50-100 cm. The soil was passed through a 2 mm sieve, dried at 105°C for 48 hours and weighed. The volume of the excavation was determined by three-dimensional imaging. For all the samples from depths of 0-20, 20-50 and 50-100 cm, the gross fraction (> 2 mm) was washed with water, dried and weighed to obtain the mass of stones. The stone volume was measured on several stones immersed in a burette, and the stone density was calculated as the ratio of the mass of stones to the stone volume (2.13 g cm^{-3}).

2.5. Data analyses

In the cube sampling, the 2 cubes with opposite orientations taken next to each other were spatially correlated for each soil depth and location. Furthermore, all cubes from the same soil profile, location and depth were considered as pseudoreplicates. Consequently, we considered them all as one sample and used the mean value (n=3).

Using the linear regression coefficient of the relationship between the root length density and the root impact density (the average over 3 dimensions) obtained in each cube, we converted the root impact density map into a root length density map using the method described by Maurice et al. (2010).

The C stocks in the living roots were calculated by multiplying the root biomass density by the root C content for each location and depth (n=3). For the crop (at the Crop-1 m and Crop-4 m locations), all roots entered the soil after harvest, and 100% of the C stocks in living roots were thus considered as annual root-derived C inputs to the soil. In contrast, for the perennial herbaceous species in the UVS,

the annual root-derived C inputs to soil were considered 53% of the C stocks in living roots based on an annual root turnover rate of 53% in the grasslands (Gill and Jackson 2000). This estimation method is conservative, as it did not take into account the release of C through rhizodeposition, which might still represent an important part of additional annual C inputs, as C in the rhizodeposits represents approx. 3% of the plant gross primary production (Pausch and Kuzyakov 2018).

The C-enzymatic activity was calculated as the sum of BG and CBH. The N-enzymatic activity was calculated as the sum of NAG and LAP. The P-enzymatic activity was that of AP. The C-, N- and P-enzymatic activities were integrated over time (180 min) to obtain cumulative enzymatic activities ($\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{soil}}$) or divided by the MBC to obtain biomass-specific enzymatic activities ($\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{MBC min}^{-1}}$). An eco-enzymatic stoichiometry analysis was conducted as described by Fanin et al. (2016). Briefly, the relative proportion of C- versus P- acquiring enzymatic activities ($C/[C + P]$) and the relative proportion of C- versus N-acquiring activities ($C/[C + N]$) were calculated (x and y respectively). Then, the length of the vector quantifying relative C versus nutrient acquisition was calculated as the square root of the sum of squared values of x and y [Length = $\text{Sqrt}(x^2 + y^2)$]. The angle of the vector quantifying the relative P versus N acquisition was calculated as the arctangent of the point (x, y) [Angle (degrees) = $\text{Degrees}(\text{Atan}^2(x, y))$].

The soil bulk density was calculated as follows:

$$BD_{\text{soil}} = \frac{M_{\text{soil}}}{V_{\text{excavation}}}$$

where BD_{soil} is the soil bulk density (g cm^{-3}), M_{soil} is the total dry mass of the sample (g) and $V_{\text{excavation}}$ is the volume of the excavation (cm^3).

The fine soil bulk density was calculated as:

$$BD_{\text{fine soil}} = \frac{M_{\text{fine soil}}}{(V_{\text{excavation}} - \frac{M_{\text{stones}}}{D_{\text{stones}}})}$$

where $BD_{\text{fine soil}}$ is the fine soil bulk density (g cm^{-3}), $M_{\text{fine soil}}$ is the dry mass of the fine fraction < 2 mm (g), $V_{\text{excavation}}$ is the volume of the excavation (cm^3), M_{stones} is the mass of stones in the sample (g) and D_{stones} is the stone density (g cm^{-3}).

The soil organic C stocks were calculated at each plot, location and soil depth using the ‘M4’ method described by Poeplau et al. (2017) as recommended for stony soils:

$$C_{\text{stock}_i} = C_{\text{org}} \times BD_{\text{fine soil}} \times (1 - \text{Stones})$$

where C_{stock_i} is the soil organic C stock at point i (specific location \times depth \times plot) ($\text{kg}_C \text{ m}_{soil}^{-3}$), C_{org} is the organic C content in the fine soil measured in i ($\text{mg}_C \text{ g}_{soil}^{-1}$), $BD_{fine\ soil}$ is the bulk density of the fine soil in i (g cm^{-3}) and $Stones$ is the volumetric fraction of stones (%).

To analyze the effect of location as a fixed factor and the three replicated profiles as random factors on aerial and total root biomass and on the mass of spread N fertilizer, linear mixed models were fitted for each variable. For variables analyzed at different depths, the effects of soil depth, location and their interactions as fixed factors and the three replicated profiles as random factors were tested using linear mixed models: soil physical, chemical and microbiological properties, root biomass density, root properties (functional traits, chemical composition, quality index and anatomy), soil C stocks and living root C stocks. Post hoc Tukey tests were used to assess differences between soil depths and locations.

In addition to the ANOVA-like mixed effect model, a complementary set of covariance analyses (ANCOVA) mixed effect models were used to test our hypotheses. To investigate the correlation between soil physicochemical properties and root variables along the vertical gradient and if these correlations changed according to the 3 locations in the agroforestry system (Hypothesis 1), we used a model comparison approach. Only the most informative root variables associated with root quantity (biomass density), root quality (lignin content) and root anatomy (stele diameter) were investigated. The selection of the soil physicochemical properties used as covariates in these analyses was based on the principal component analysis (PCA) (Fig. III-13b) and represented the main axes of variations: soil bulk density, mineral N and Olsen P contents (axis 1, Fig. III-13b) and the stone volumetric content (axis 2, Fig. III-13b). First, to test the interaction (if the effect of the soil physicochemical covariate on root variables varies according to the location), we compared a model including the soil physicochemical covariate, the location and their interaction (lm1) with the same model but excluding the interaction (lm2) using the `anova()` function in R. Second, we compared the model with both the soil physicochemical properties and the location (lm2) with a model with the location only (lm3) to test if the soil physicochemical covariate explained a part of the root variable that was not explained by the location (the vertical variation of root variables).

We used a second set of model comparisons to investigate the correlation of root properties with microbial activity and soil C stocks along the horizontal gradient of the agroforestry system and whether these correlations changed according to the 3 depths investigated (Hypothesis 2). We selected the most informative root variables as covariates in these analyses to reveal the potential contributions of roots to soil C stocks: the living root C stocks, the root quality (informing the root decomposability), including the lignin:N and C:N ratios and the ligno-cellulosic index. First, we tested if the effect of root covariate on microbial activity or soil C stock variables changed according to depth by comparing a model including the root covariate, the depth and their interaction (lm1) with the same model but excluding the interaction (lm2) using the `anova()` function in R. Second, we tested whether the root covariate explained

a part of the soil variable that was not explained by the depth (the horizontal variation of soil variables). We compared the model with both the root covariate and the depth (lm2) with a model with the depth only (lm3).

For all the linear mixed models and analyses of variance, the *lme4* and *car* packages were used. The normality of the residues was always verified with a Shapiro–Wilk test, and the homogeneity of the variances was verified with a Bartlett test. When necessary (p values $< 5\%$), logarithmic, square root, Box–Cox or Yeo Johnson transformations were applied. Simple ordinations of the root variables and the soil physicochemical and microbiological properties were conducted using PCAs with the *vegan* and *factoextra* packages.

All statistical analyses were performed with R software (version 4.0.5). For each measurement, data are presented as the mean values \pm standard deviations of three independent replicates.

3. Results

3.1. Aerial and root biomass density

The aerial biomass and the root:shoot ratio were relatively homogenous among the 3 locations investigated in the agroforestry system (Table III-3).

Table III-3 Total aerial and root:shoot ratios according to location (UVS, Crop-1 m, Crop-4 m). Data are mean values \pm standard deviations ($n=3$).

	UVS	Crop-1m	Crop-4m	p-value
Aerial biomass (g m^{-2})	991 ± 327	1045 ± 150	1107 ± 120	0.82
Root:Shoot	0.065 ± 0.025	0.032 ± 0.021	0.045 ± 0.016	0.28

Below ground, the UVS and the crop developed their rooting system from the 0 to 100 cm depth. Horizontally, no UVS roots were found in the crop zone. No tree fine roots were found in any of the pits. The root biomass density was significantly affected by the interaction between soil depth and location (p value = 3.48×10^{-2} , Supplementary Table III-8). In the 20-50 and 50-100 cm soil layers, all locations had similar root biomass densities, whereas in the topsoil (0-20 cm), root biomass density was significantly reduced in Crop-1 m compared to UVS and Crop-4 m (Fig. III-8). In the UVS and Crop-4 m locations, the root biomass density decreased significantly between the 0-20 cm and lower soil layers ($59.2 \pm 8.2\%$ and $50.0 \pm 18\%$ of the total root biomass, respectively, p value = 3.82×10^{-2} , Fig. III-8). In contrast, Crop-1 m presented no significant differences between the soil depths, and the root system was mainly concentrated between 20 and 100 cm of depth ($75 \pm 9\%$ of the total root biomass Fig. III-8).

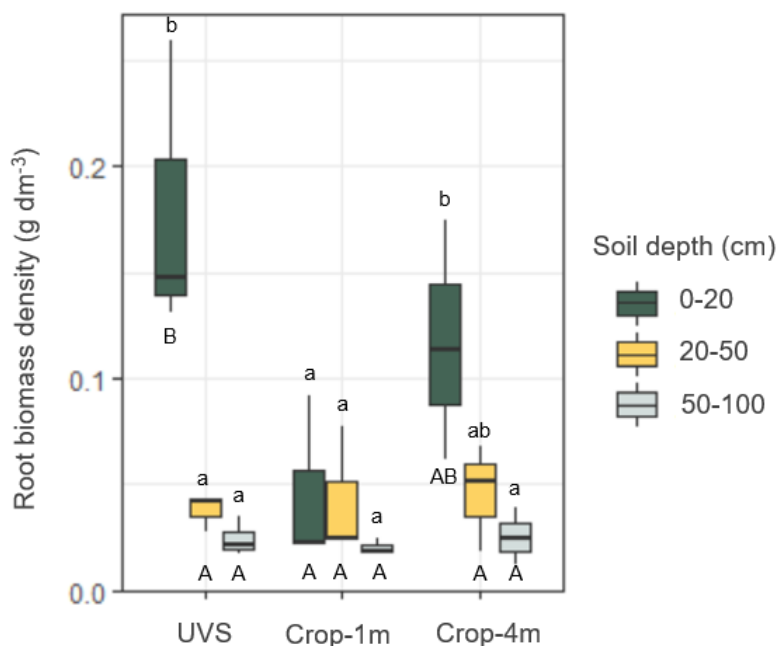


Fig. III-8 Root biomass density (g dm^{-3}) according to soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and location (UVS, Crop-1 m, Crop-4 m). Data are mean values, and error bars represent the standard deviations ($n=3$). The uppercase letters indicate significant differences between the locations within each soil depth, and the lowercase letters indicate significant differences between the soil depths within each location ($p\text{-value} < 0.05$).

The roots were isotropic at all locations and soil depths, as the average coefficient A was not significantly altered by any studied factors (Supplementary Table III-8) and was low (0.16 ± 0.09 , data not shown), indicating that no direction of root growth was predominant. We also confirmed that the root impact density was not significantly different ($p\text{ value} = 0.08$) according to the H, L or T cube face (Supplementary Fig. III-5)

For each location, the linear relationships between the root length density and the root impact density exhibited high R^2 values ($> 79\%$, Supplementary Table III-9). The UVS had a higher coefficient (4.24) than Crop-1 m and Crop-4 m (2.80 and 2.63, respectively), indicating a higher root tortuosity or branching rate in the UVS location than in the others.

3.2. Root functional traits, chemical composition and anatomy

The root elemental composition, particularly the P content, was affected by soil depth (Supplementary Table III-8). The root C content tended to increase with depth ($p\text{ value} = 0.06$, Fig. III-9a) and the root P content decreased significantly from the 0-20 to 50-100 cm soil layers ($p\text{ value} = 1.53 \times 10^{-2}$, Fig. III-9c), consequently resulting in lower root C:P and N:P ratios in the topsoil than in deeper layers at all locations (data not shown). In parallel, the specific root length was not significantly altered by the soil depth or the location (Supplementary Table III-8), but it tended to increase from the 0-20 to 20-50 cm soil layers (Fig. III-9h).

Conversely, the average root diameter showed a significant response to the location (p value = 6.13×10^{-3}), with lower values in the UVS than in the crop locations, and SRL tended to be higher in Crop-1 m than in Crop-4 m and UVS at all depths (Fig. III-9g and h). Even if the effects of the location and soil depth on the root quality indexes (lignin:N ratio, ligno-cellulosic index, soluble compounds:cell wall ratios, Supplementary Table III-8) were not significant according to the mixed effect models, the mean root lignin content at 0-20 cm was more than twice as high in Crop-1 m ($13.3 \pm 1.1\%$) and in the UVS ($9.4 \pm 0.9\%$) than in Crop-4 m ($5.5 \pm 0.8\%$, Fig. III-10). The lignocellulosic index presented the same tendency as the root lignin content (Fig. III-9d), and it was also particularly high at depth for UVS roots.

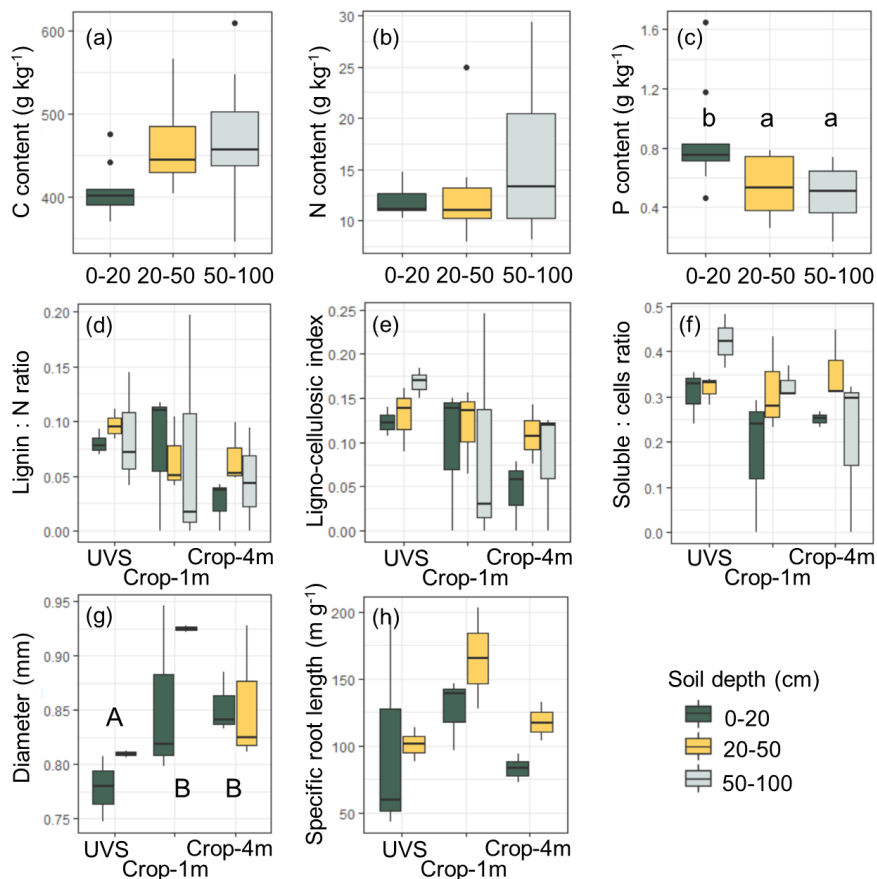


Fig. III-9 Root elemental composition (C content (a), N content (b) P content (c)) according to soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm and merged for all locations (n=6), quality index (lignin:N (d), lignin-cellulosic index (e) soluble compounds:cells (f)) and functional traits (diameter (g) and specific root length (h)) according to soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and location (UVS, Crop-1 m, Crop-4 m, n=3). The uppercase letters indicate significant differences between the locations, and the lowercase letters indicate significant differences between the soil depths (p -value < 0.05).

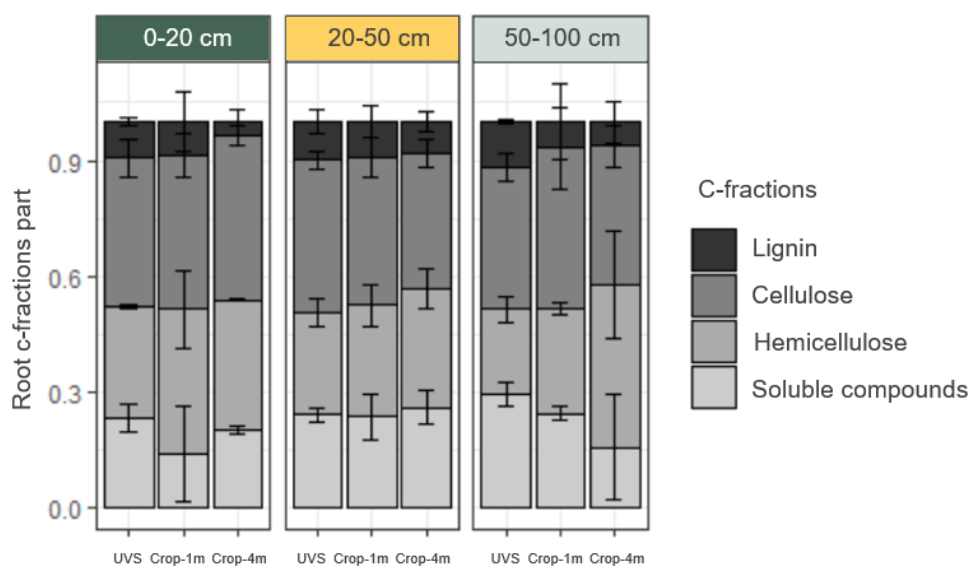


Fig. III-10 Root C fractions (lignin, cellulose, hemicellulose and soluble compound contents, n=3) according to soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and location (UVS, Crop-1 m, Crop-4 m).

The root anatomical analysis (Supplementary Fig. III-6) in Crop-1 m and Crop-4 m did not show any significant results (Supplementary Table III-10), except for the endoderm width, which tended to decrease with increasing soil depth (Supplementary Fig. III-7a), and the stele area, which was significantly higher in the topsoil than at other soil depths in all locations (Supplementary Fig. III-7b).

3.3. Soil properties

Most of the soil properties changed with depth (Supplementary Table III-11). For all locations, soil organic C, total N, mineral N, total P and Olsen P significantly decreased with depth, while the bulk density and the clay content increased with increasing depth (Table III-4). In contrast, the soil moisture content was not affected by the soil depth (p value = 0.95) or the location (p value = 0.58, Supplementary Table III-11). The location significantly affected only the soil mineral N content (Supplementary Table III-11). Crop-4m had a significantly higher soil mineral N content than the UVS, and that of the Crop-1 m location was in between those of the other locations (p -value = 1.18×10^{-2} , Fig. III-11), in agreement with the lower quantity of spread fertilizer (p -value = 2.65×10^{-3}) in Crop-1 m ($2.42 \pm 1.52 \text{ g m}^{-2}$) than in Crop-4 m ($5.11 \pm 2.66 \text{ g m}^{-2}$, data not shown).

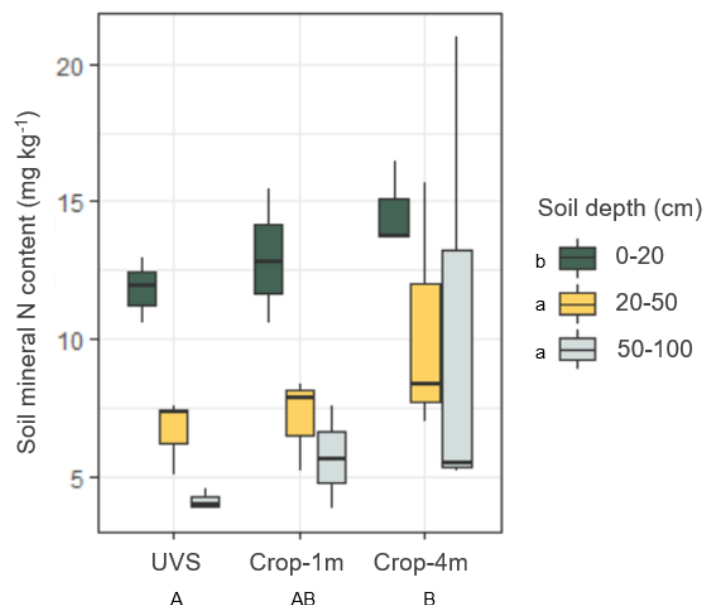


Fig. III-11 Soil mineral N content according to depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and location (UVS, Crop-1 m, Crop-4 m). The uppercase letters indicate significant differences between the locations, and the lowercase letters indicate significant differences between the soil depths (p -value < 0.05, $n=3$).

Regarding the microbial properties, the MBC, 16S and 18S copy numbers and enzymatic activities decreased with soil depth, indicating lower microbial biomass and activity at deeper soil depths. In parallel, the 16S:18S ratio increased from 1.1 ± 0.3 at 0-20 cm to 3.7 ± 1.8 at 50-100 cm and, although the difference was not significant, it tended to be higher in the UVS than in Crop-1 m and Crop-4 m, especially in the deeper soil layers (Supplementary Fig. III-9). The C-enzyme (BG + CBH) specific activities (per unit of MBC) decreased with depth (Table III-4, p value = 3.21×10^{-7} , Supplementary Table III-11) but not the specific activity for N (NAG + LAP, p value = 0.59) or P (p value = 0.72). Confirming a decrease in C acquisition with depth, the eco-enzymatic stoichiometry analysis showed a lower relative microbial investment in C compared with nutrient acquisition (vector length) in the subsoil than in the 0-20 cm layer (Supplementary Fig. III-10, p value = 1.31×10^{-6} , Table III-4). The P vs. N root acquisition (vector angle) was not significantly affected by location or depth (Supplementary Table III-11).

Table III-4 Soil physical, chemical and microbiological properties according to depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm). Data are mean values (Mean) and standard deviations (Sd) and were merged for all locations (n=6). The lowercase letters indicate significant differences between the soil depths (p-value < 0.05).

		0-20 cm			20-50 cm			50-100 cm		
		Mean	Sd		Mean	Sd		Mean	Sd	
Physical properties										
Bulk density	g cm ⁻³	1.17	0.05	a	1.69	0.01	b	1.87	0.10	c
Bulk density on fine particles	g cm ⁻³	1.01	0.15	a	1.56	0.10	b	1.63	0.08	b
Stones volumetric proportion	%	14	9	a	20	14	a	47	19	b
Clay content	g kg ⁻¹	192.00	18.59	a	271.33	75.22	a	468.78	71.19	b
Silt content	g kg ⁻¹	327.78	12.32	b	322.56	23.09	b	263.78	56.68	a
Sand content	g kg ⁻¹	480.22	18.67	c	406.11	91.14	b	267.44	24.91	a
Moisture	%	37	6	a	38	4	a	37	6	a
Chemical properties										
Organic C content	g kg ⁻¹	8.76	1.91	c	5.07	1.79	b	3.53	0.93	a
Organic C stocks	kgC m ⁻³	7.41	1.21	c	5.88	0.88	b	3.00	1.22	a
Total N content	g kg ⁻¹	0.90	0.20	b	0.68	0.10	a	0.63	0.10	a
Total P content	g kg ⁻¹	0.55	0.13	c	0.45	0.13	b	0.35	0.05	a
Soil C:N		9.74	0.71	c	7.25	1.68	b	5.59	1.00	a
Soil N:P		1.67	0.33	a	1.59	0.25	a	1.78	0.22	a
Soil C:P		16.19	2.74	b	11.22	1.93	a	10.04	2.37	a

Dissolved organic C content	mg kg ⁻¹	64.24	14.11	b	40.96	14.80	a	42.94	11.31	a
Olsen P content	mg kg ⁻¹	40.19	13.69	c	24.67	20.68	b	8.08	4.31	a
CEC	cmol+ kg ⁻¹	8.35	1.93	a	10.38	0.87	a	17.97	3.62	b
pH		6.82	0.64	a	7.14	0.32	ab	7.33	0.12	b
Microbiological properties										
MBC	mg kg ⁻¹	103.40	43.30	b	60.21	20.91	a	43.31	20.97	a
MBN	mg kg ⁻¹	7.14	3.70	a	4.04	2.97	a	3.39	3.58	a
MBC:N		18.05	10.94	a	29.62	33.51	a	19.93	12.11	a
16S	copy numbers g ⁻¹	1.99×10^9	8.76×10^8	c	1.01×10^9	4.57×10^8	b	2.50×10^8	1.34×10^8	a
18S	copy numbers g ⁻¹	1.79×10^9	7.05×10^8	c	7.56×10^8	1.16×10^9	b	8.78×10^7	7.23×10^7	a
16S :18S		1.12	0.29	a	2.79	1.77	b	3.69	1.81	b
C-enzymatic activity	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{soil}}$	0.34	0.09	b	0.09	0.07	a	0.03	0.02	a
N-enzymatic activity	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{soil}}$	0.31	0.14	b	0.23	0.12	ab	0.16	0.14	a
P-enzymatic activity	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{soil}}$	0.83	0.17	b	0.45	0.13	a	0.35	0.11	a
C-enzymatic specific activity	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{MBC min}^{-1}}$	19.39	4.31	b	7.98	3.52	a	3.65	1.57	a
N-enzymatic specific activity	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{MBC min}^{-1}}$	16.63	5.45	a	20.62	9.56	a	21.34	16.90	a
P-enzymatic specific activity	$\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{MBC min}^{-1}}$	54.28	28.96	a	45.76	20.41	a	52.35	22.24	a
Vector length		0.62	0.08	b	0.33	0.08	a	0.20	0.14	a
Vector angle	radians	1.07	0.17	a	1.05	0.23	a	1.16	0.19	a

3.4. Annual root-derived C inputs and soil organic C stocks

The soil organic C stock changed significantly between the 0 and 100 cm depth (Supplementary Table III-11), and 58.6% of the organic C was located below 20 cm (Fig. III-12). The estimated annual root-derived C inputs followed the root length density map, decreasing with soil depth, especially in UVS and Crop-4 m (lowercase letters in Fig. III-12). In Crop-4 m, where all crop roots decayed into the soil after harvest, the annual root-derived C inputs were equivalent to 0.59%, 0.34% and 0.25% of the soil organic C stock at 0-20 cm, 20-50 cm and 50-100 cm, respectively. The inputs in Crop-1 m represented 0.28%, 0.35% and 0.21%, respectively. In the UVS, based on an annual root turnover rate of 53% (Gill and Jackson 2000), the annual root-derived C inputs would be 0.49%, 0.14% and 0.12%, respectively.

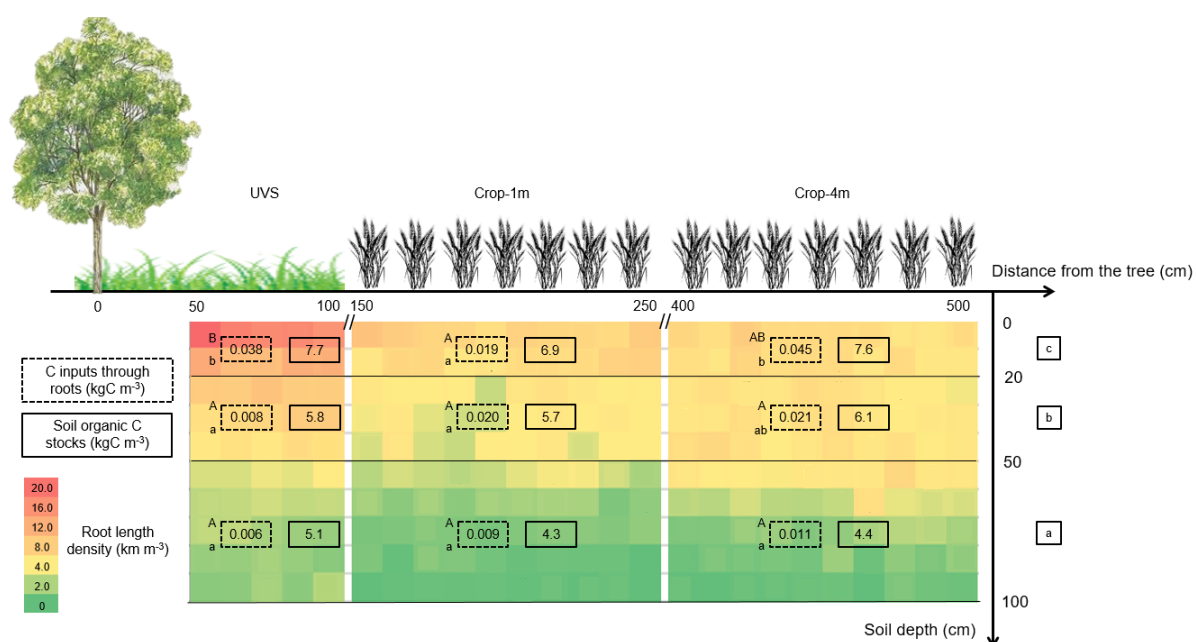


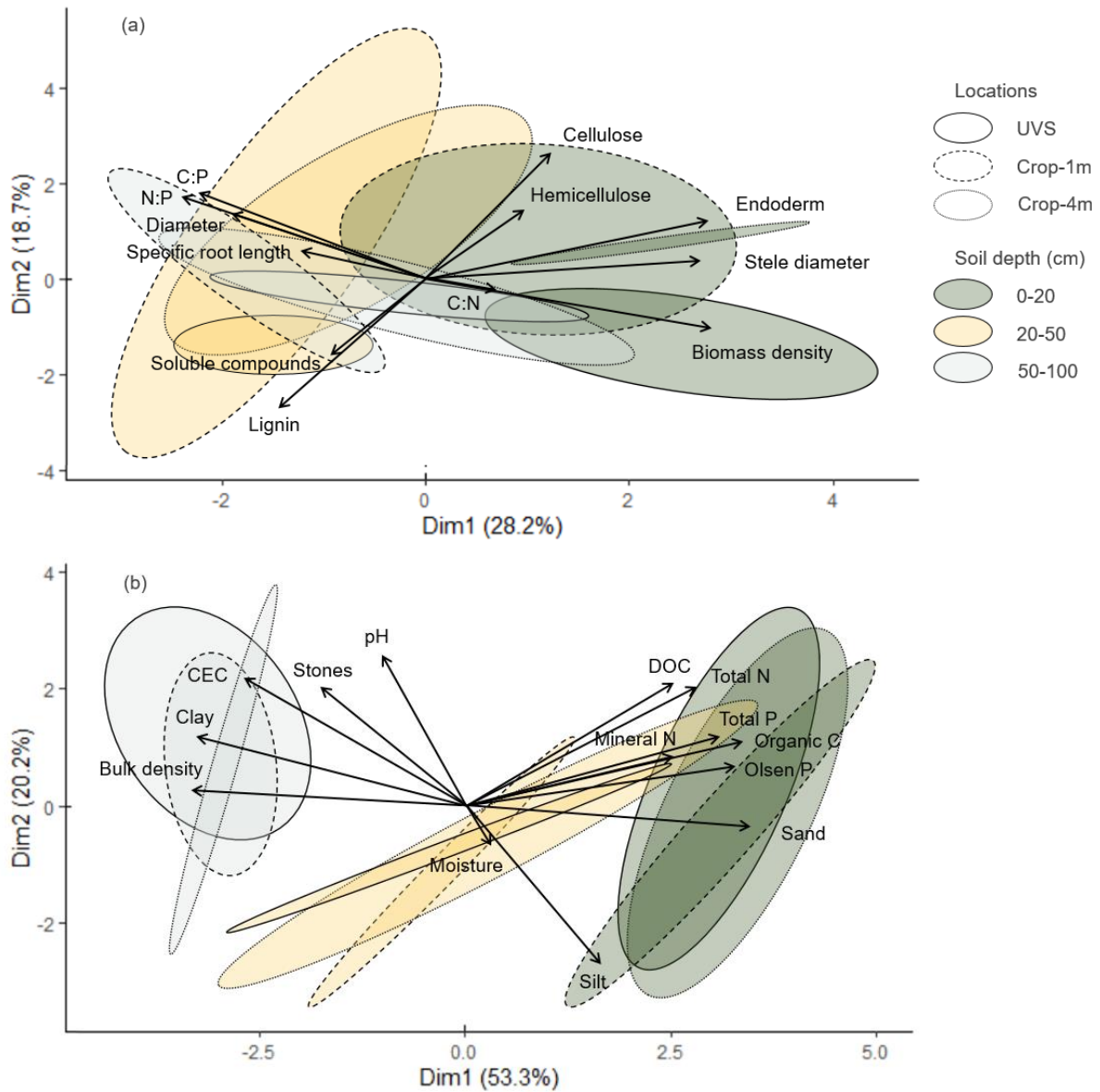
Fig. III-12 Soil organic C stocks and annual root C inputs in the studied agroforestry system. Data are mean values ($n=3$). Colors in the background represent root length density from 0 to 100 cm of depth and from 50 to 500 cm from the tree line. The uppercase letters indicate significant differences in annual root C inputs between the locations within each soil depth, and the lowercase letters indicate significant differences in annual root C inputs between the soil depths within each location. The framed lowercase letters indicate significant differences in soil organic C stocks between the soil depths for all locations (p -value < 0.05).

3.5. Covariations in root, soil and microbial properties across soil depth and location

The first axes of the PCA of the root variables (Fig. III-13a) captured 28.2% of the variations and showed a gradient of root biomass tightly linked to an increase in root P contents and anatomical changes with increasing diameter (bigger stele and endoderm) mainly present through the ellipse representing the root system at 0-20 cm of depth in the UVS. The second axis (18.7% of the total variations) grouped the lignin-rich roots in the UVS and in Crop-1 m differently than the roots with higher concentrations of cellulose and hemicellulose in Crop-4 m.

The soil physicochemical properties (Fig. III-13b) were better separated along the horizontal axis (53.3% of the variations) according to the soil depths, with higher C, N and P contents at 0-20 cm and higher CEC, clay content and bulk density at depth.

The first axes (40.5% of the variations) of the PCA of the soil microbiological properties (Fig. III-13c) separated the topsoils from the two deeper soil layers with higher microbial biomass and enzymatic activities, and differences between the locations were not noteworthy.



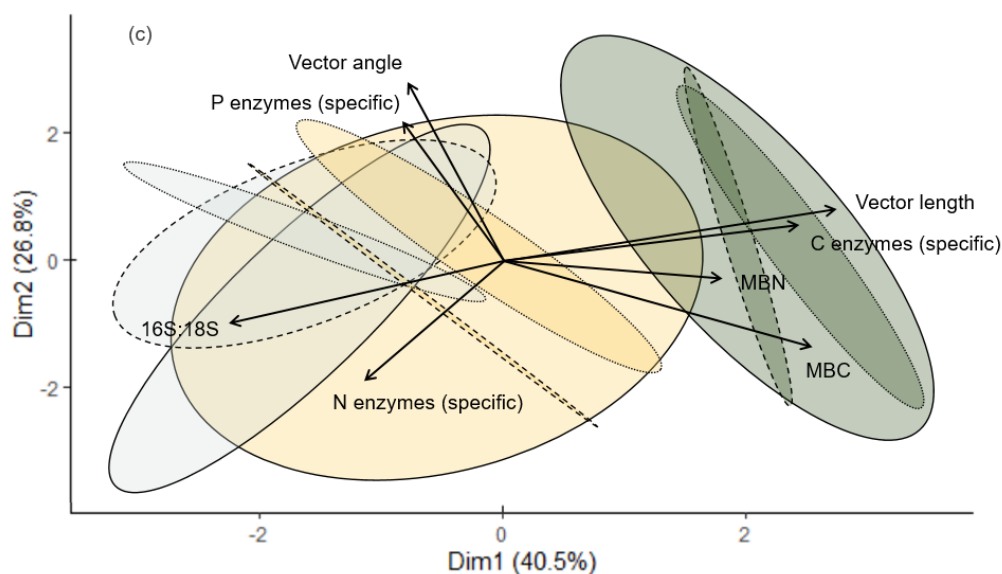


Fig. III-13 Principal component analysis of the root (a), soil physicochemical (b) and soil microbiological (c) variables according to location (UVS, Crop-1 m and Crop-4 m) and soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm).

The comparison of ANCOVA-like mixed effect models showed that root properties were correlated with soil properties along the vertical gradient. At all locations, the root stele diameter decreased in parallel with the bulk density ($p\text{-value} = 6.53 \times 10^{-7}$, Supplementary Table III-12, Fig. III-14d) and with the stone volumetric content (Supplementary Fig. III-11a). For other root properties, the correlations with soil physicochemical properties were different between locations in the agroforestry system. The root biomass density decreased with increasing soil bulk density (Fig. III-14a) and increased with increasing soil mineral N content (Fig. III-14b) with a steeper slope in the UVS than in Crop-1 m and Crop-4 m ($p\text{-value} = 2.38 \times 10^{-3}$ and 1.87×10^{-2} , respectively, Supplementary Table III-12). The effect of the stone volumetric content on the root lignin content tended to be different according to the location ($p\text{-value} = 7.58 \times 10^{-2}$, Supplementary Table III-12), as it was negative in Crop-1 m and missing at the other locations (Fig. III-14c).

The comparison of ANCOVA-like mixed effect models also showed that microbial activity and soil C stocks were correlated with root properties along the horizontal gradient of the agroforestry system. Some properties associated with microbial activity and C stocks were correlated with root properties with no interaction with depth (Supplementary Table III-13). The soil C stocks tended to increase with the root lignin:N ratio ($p\text{-value} = 0.09$, Supplementary Fig. III-11c) and with the root C:N ratio ($p\text{-value} = 0.06$, Fig. III-14f). The MBC strongly increased with increasing root C stocks (Fig. III-14g), but it was not related to any tested root quality variable ($p\text{-value} = 0.23, 0.30, 0.38$ for the root lignin:N, C:N and ligno-cellulosic index, respectively). Conversely, some correlations of root properties with microbial activity and soil C stocks differed between soil depths (Supplementary Table III-13). The soil organic C stocks were positively related to the root C stocks between 0 and 50 cm of depth, whereas this correlation was reversed at 50-100 cm (Fig. III-14e). The specific N-enzymatic activity presented

different responses to an increasing lignin:N ratio according to the soil depths (p -value = 1.80×10^{-2} , Supplementary Table III-13): it decreased at a depth of 0-20 cm and increased between 20 and 100 cm (Supplementary Fig. III-11f). The response of the specific N enzymatic activity to the root C:N ratio also differed according to the soil depths (p -value = 3.21×10^{-2} , Supplementary Table III-13): it increased more substantially at a depth of 50-100 cm than at the other soil depths (Fig. III-14h).

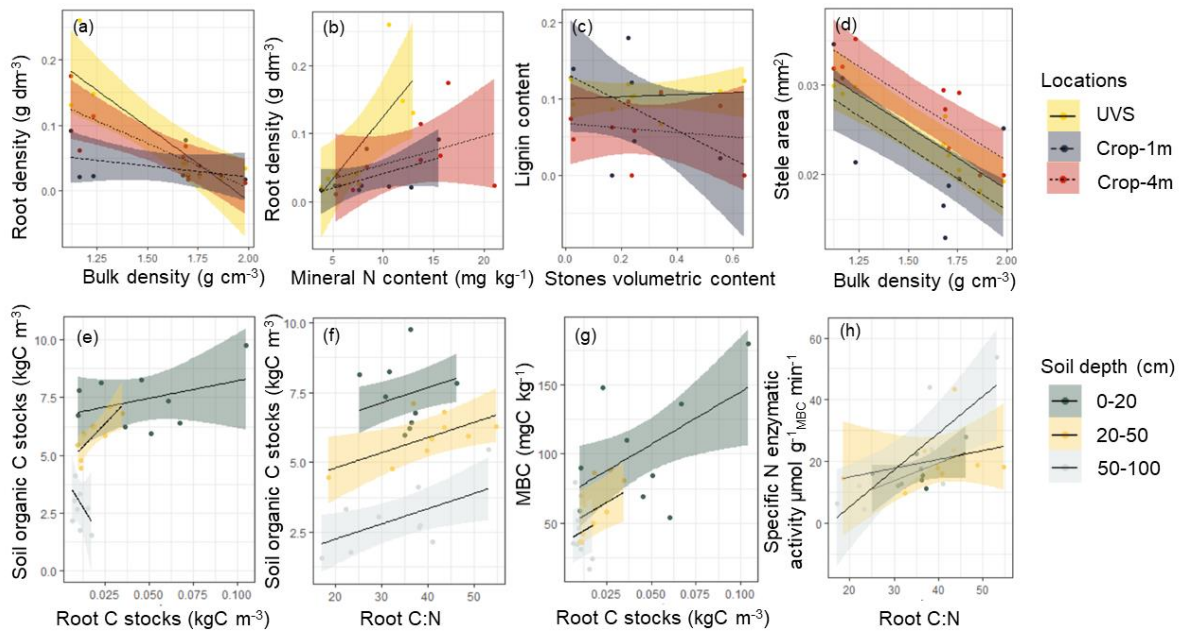


Fig. III-14 Correlations between roots and soil variables at different locations (UVS, Crop-1 m and Crop-4 m) to test the H1 hypothesis (a, b, c and d) and at different soil depths (0-20, 20-50 and 50-100 cm) to test the H2 hypothesis (e, f, g and h).

4. Discussion

4.1. Quantitative and qualitative assessments of the root systems and the soil properties

The root properties varied according to the soil depth. Some of these variations were common for all locations. For example, the anatomical structures of roots showed higher stele area in the topsoils than at depth. This difference was expected as uptakes from the entire soil profile needed to pass through this zone to reach the plant aerial parts; however, opposite patterns were reported by Wang et al. (2016).

In addition, the root properties differed between the 3 studied locations despite the absence of major differences in the soil properties in the horizontal gradient considered in this young Mediterranean agroforestry system, and compared to mature systems (Guillot 2018; D’Hervilly 2021). On the one hand, differences occurred between UVS and the crop. The UVS roots showed a higher tortuosity or branching rate and a lower specific root length, suggesting lower root respiration rates, absorption and elongation efficiency, which were indicators of a conservative strategy compared to the acquisitive strategy of the annual crop (Roumet et al. 2006; Freschet et al. 2010; Caplan et al. 2019). Moreover, UVS roots tended

to have higher lignin contents than crop roots, suggesting a longer residence time due to the microbial and enzymatic cost needed for lignin degradation (Moorhead et al. 2013). On the other hand, several differences between the Crop-1 m and Crop- 4m root systems were noticed in the topsoil, despite equivalent R:S ratios, confirming our hypothesis that horizontal heterogeneity of root systems might also occur even in the same component of the agroforestry system (i.e., the crop). In Crop-1 m, we observed a 3-fold reduction in root biomass density and a longer specific root length, which suggested an exploratory strategy (de Britto Costa et al. 2021) and a faster return of investment (Freschet et al. 2017). Furthermore, higher lignin contents suggested that the Crop-1 m roots were more differentiated than the Crop-4 m roots. Because they were more differentiated, these roots would be more likely to show a loss of their cortical parenchyma (Gardner and Sarrantonio 2012), consistent with the decreasing lignin content with increasing soil stone content in Crop-1 m, in contrast to the absence of such a relationship in the other locations. The lower soil mineral N content observed near the UVS, likely due to lower N fertilizer inputs, might explain these differences between Crop-1 m and Crop-4 m roots (a lower biomass density, longer specific root length and more differentiation) by limiting root growth (Fageria and Moreira 2011). One alternative explanation may be competition for nutrients induced by the UVS at Crop-1 m but (i) the absence of UVS root colonization under Crop-1 m, in contrast to the reported findings (Battie-Laclau et al. 2020) for older agroforestry sites (5 and 11 years) tilled to 10 cm only (vs. up to 30 cm in our experimental site) and (ii) the root isotropy found at all depths and all locations supported the absence of a preferential vertical direction of the crop roots and thus the absence of any root competition (Bolte and Villanueva 2006; Cardinael et al. 2015). Indeed, the global fine root isotropy identified in our study reveals a rather stable root foraging strategy to explore soil in all directions, regardless of the soil depth and distance to UVS. These features seem to be quite common in other plantations, such as maize (Chopart and Siband 1999), sugarcane (Chopart et al. 2008) and eucalyptus (Maurice et al. 2010). Another potential explanation for differences between Crop-1 m and Crop-4 m is the competition for light induced by the tree shade, but the absence of shade from the young trees on the sunny side of the tree line, i.e., where the pits were dug, refute this hypothesis. In conclusion, the functional root properties and biomass differed between the agroforestry compartments due to the presence of different plant communities and the heterogeneity of the soil mineral N levels. This result highlighted the importance of also considering heterogeneity in fertilization practices that lead to changes in N availability to explain the usually observed decrease in crop growth along the tree lines in agroforestry systems (Singh et al. 1989; Lawson and Kang 1990; Miller and Pallardy 2001).

Because of the N-fixing trees, in the next years, N contents might increase near the UVS due to greater litter aerial and belowground N inputs (Danso et al. 1995; Uselman et al. 2000; Von Holle et al. 2013) and different microclimatic conditions near the tree (Guillot et al. 2021; D'Hervilly et al. 2022). This changes might eliminate part of the heterogeneity related to the fertilization distribution across the

agroforestry system and limit the observed differences in the crop root systems according to the distance to the tree.

The effects of the soil properties on the root systems along the vertical gradient (soil depth) differed between the locations. This result was confirmed for the root biomass, as it was mostly concentrated at 0-20 cm of depth in the UVS and Crop-4 m (59.2 and 50.0%, respectively) but not for the crop near the UVS (Crop-1 m: 25% only). The correlation between roots and soil properties along the soil profile showed that the UVS roots rapidly increased their biomass with increasing soil mineral N contents, while Crop-1 m and Crop-4 m root biomasses increased less rapidly. These results suggested that UVS plants, as globally plurennial species, increased their root systems in the nutrient-rich soil patches (Hodge 2009) or that the soil N-shortage conditions limited their growth (Cuevas and Medina 1988), whereas crop roots were less linked to this vertical nutrient heterogeneity, as they were sown only few month before sampling. Consequently, the root biomass density of the UVS was not as high as that reported in other studies at depth (Battie-Laclau et al. 2020). This pattern was associated with herbaceous plants of the 3-year-old UVS, as no tree roots were found in any of the 3 pits, even at 1 m from the nearest tree. Taken altogether, our observations showed that the agroforestry system components presented similar responses of root properties to depth (in the UVS, Crop-1 m and Crop-4 m) but different root biomass responses to soil chemical property gradients along the soil profile because they belonged to different plant communities (UVS vs. crops).

4.2. Relationships between root-derived carbon inputs and soil carbon stocks

At all locations, our estimation of annual root-derived C inputs represented a small part of the soil organic C stocks (less than 0.6%), even in the topsoil, where the root biomass was the highest but the aerial biomass also contributes C inputs from the crop residues in Crop-1 m and Crop-4 m and from the aboveground mortality in the UVS (Fig. III-12). However, annual root-derived C inputs are renewed each year, and this quantification did not consider the release of C through rhizodeposition, which might also represent an important part of additional annual C inputs (Pausch and Kuzyakov 2018). The same turnover rate was used for each soil layers to estimate the root-derived C inputs in soil from the UVS because of a lack of reference quantifying herbaceous plant root turnover at depth under similar pedo-climatic conditions. However, root turnover was observed to decrease with soil depth (Gill et al. 2002; Houde et al. 2020) and our estimations of root-derived C inputs might be over-estimated for the UVS at depths of 20-50 and 50-100 cm. The UVS presented equivalent root-derived C inputs to Crop-4 m, but it did not receive any fertilization. Integrating perennial vegetation in the crop system might allow equivalent C inputs from the roots, with less nutrients inputs. Furthermore, we observed that the soil C stocks increased significantly with increasing C stocks in living roots at depths of 0-20 cm and 20-50 cm (Fig. III-14e). Although a regression analysis does not imply causal effects, this observation is potentially consistent with the hypothesis that a higher root biomass contributes to SOM accumulation

(Balesdent and Balabane 1996; Rasse et al. 2005; Kätterer et al. 2011). Conversely, at depths of 50-100 cm, a similar negative relationship was observed, suggesting that the deep soil C stocks resulted from older C, i.e., a longer time of accumulation than surface soil C (Balesdent et al. 2018; Abbas et al. 2020). At depth, increased root-derived C inputs might stimulate more C-release processes such as the priming effect, than C stabilization processes (Fontaine et al. 2007; de Graaff et al. 2014; Karhu et al. 2016; Cardinael et al. 2018). Indeed, subsoil C is more sensitive to the priming effect than topsoil (Fontaine et al. 2007). However, studies specifically designed to investigate these processes (e.g., isotopic labeling) in our system will be necessary to validate this hypothesis. These results stress that roots might exert different effects on the soil C budget in shallow and deep soil layers and suggest the need for more investigations of these differences to fully appreciate the potential of deep roots to increase C sequestration in agricultural soils (Bertrand et al. 2019).

Both the root quantity and the root quality seemed to affect soil C storage as a major factor controlling root decomposition (Bonanomi et al. 2021). In this young agroforestry system, the roots in Crop-1 m and in the UVS were richer in lignin than those in Crop-4 m. Furthermore, we observed that the soil C stocks increased with an increasing root lignin:N ratio, suggesting that root chemical recalcitrance increases soil C storage because of the slower root litter decomposition rate (Moorhead et al. 2014; Bonanomi et al. 2021) in UVS than in Crop-4 m (Abbasi Surki et al. 2021).

4.3. Relationships between the root properties and the soil microbial properties

Soil C stock evolution in response to root-derived C input depends on soil microbial activities (Zechmeister-Boltenstern et al. 2015; Tate 2020), which are known to respond more rapidly to vegetation and management changes than the total soil C stock. This study was performed at a single sampling date to establish the relationships between the roots and the microbial properties at the community scale of the agroforestry ecosystem. Therefore, it does not take into account the intra-annual effects due to seasons and physiological development of the biomass. Nevertheless, according to several studies, spatial differences in microbial activities (and root properties) are maintained across the seasons (Picon-Cochard et al. 2012; Baldrian et al. 2013; Ali et al. 2015). Despite the spatial heterogeneity of the root systems described above and the lower mineral N content in and near the UVS compared to far from it, the measured soil microbial properties did not differ between the three studied locations. The MBC and the soil C stocks were more strongly affected by the root C stocks than the root quality variables. In contrast, the N enzymatic activities were strongly related to the root stoichiometry (C:N ratio), the lignin:N ratios and the ligno-cellulosic index, which are all usually negatively related to decomposition (Bonanomi et al. 2021). The specific N enzymatic activity increased with increasing root C:N ratios, consistent with the study by Zechmeister-Boltenstern et al. (2015) suggesting that soil microorganisms adapt their investment in enzymes to target limiting resources from the root litter.

Furthermore, the relationships between the specific N enzymatic activity and the root stoichiometry (C:N and lignin:N ratios) were stronger below than above a depth of 20 cm. Indeed, at depth, the eco-enzymatic stoichiometric analysis suggested nutrient shortage conditions (Sinsabaugh et al. 2009; Cui et al. 2018) compared to those in topsoil, where additional amendments occurred through tree aerial litter inputs in the UVS that were enriched in N due to N fixation, and with N chemical fertilization in the intercropped area (Sun et al. 2020). Our observations in the deeper soil layers suggested other mechanisms by which specific stoichiometric constraints of subsoil might alter the effect of roots on soil C contents (Bertrand et al. 2019): increasing root biomass density at depth would increase the input of litter with a high C:N ratio, which might accentuate the microbial N limitation (Zechmeister-Boltenstern et al. 2015) and reduce the potential entombing effect on C sequestration (Cotrufo et al. 2013; Liang et al. 2017). This mechanism might have contributed to the negative relationship observed between living root C stocks and soil organic C stocks in the subsoil. These hypotheses suggest that the mechanisms for soil C sequestration in the subsequent years of the agroforestry systems would be differentiated in the 3 communities: higher availability of N in the UVS due to increasing UVS and N-fixing tree root litter inputs, lower availability of N in the crop zone near the UVS due to lower fertilization and crop far from the tree line hypothesized as without any effect of the tree, behaving as pure crop regarding soil C sequestration mechanisms. Our findings stress the importance of studying plant-microorganisms stoichiometric relationships to elucidate the potential of deep rooting to increase C sequestration in agricultural soils (Bertrand et al. 2019) and the strong sensitivity of subsoils to C inputs compared to topsoils (Loeppmann et al. 2019).

5. Conclusions

After 3 years of agroforestry, this study assesses the quantitative and qualitative properties of annual and perennial root systems. Under the tree line, roots from the UVS played a major role in determining for C inputs (still shallow at this stage but more recalcitrant), as no tree roots were present. The root biomass under the crop near the UVS was reduced by 3-fold in the topsoils compared to the crop far from the UVS. The contributions of root biomass at flowering stage to soil organic C stocks were estimated along the rooted profile (a depth of 100 cm) for each community (UVS, Crop-1 m and Crop-4 m) and showed horizontal and vertical heterogeneity. These different plant communities have not yet imprinted the soil C stock of this young system and soil depth was still the most important factor explaining the soil organic C stock. However, the heterogeneity of the quantity and quality of the root-derived C inputs and their relationships with microbial activity across the agroforestry system should be monitored through multiple-time samples to evaluate the dynamics of distance differentiation of the soil properties to tree, depending on soil depth. The relationships between root and microbial properties suggested that an increase in litter inputs with high C:N ratios, such as roots, might accentuate microbial N limitations and limit soil C storage at depth. Further investigations of the microbial response to fresh

organic matter input below the plow layer are needed to evaluate the benefit that increasing root biomass could provide for soil C storage.

References

- Abbas F, Hammad HM, Ishaq W, Farooque AA, Bakhat HF, Zia Z, Fahad S, Farhad W, Cerdà A (2020) A review of soil carbon dynamics resulting from agricultural practices. *J Environ Manage* 268:110319. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110319>
- Abbasi Surki A, Nazari M, Fallah S, Iranipour R (2021) Improvement of the soil properties, nutrients, and carbon stocks in different cereal–legume agroforestry systems. *Int J Environ Sci Technol* 18:123–130. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02823-9>
- Aerts R (1999) Interspecific competition in natural plant communities: mechanisms, trade-offs and plant-soil feedbacks. *J Exp Bot* 50:29–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.330.29>
- Ali RS, Ingwersen J, Demyan MS, Funkuin YN, Wizemann H-D, Kandeler E, Poll C (2015) Modelling in situ activities of enzymes as a tool to explain seasonal variation of soil respiration from agroecosystems. *Soil Biol Biochem* 81:291–303. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.001>
- Allison LE (1960) Wet-Combustion Apparatus and Procedure for Organic and Inorganic Carbon in Soil. *Soil Sci Soc Am J* 24:36–40. <https://doi.org/10.2136/sssaj1960.03615995002400010018x>
- Baldrian P, Šnajdr J, Merhautová V, Dobiášová P, Cajthaml T, Valášková V (2013) Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. *Soil Biol Biochem* 56:60–68. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.020>
- Balesdent J, Balabane M (1996) Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biol Biochem* 28:1261–1263. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(96\)00112-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00112-5)
- Balesdent J, Basile-Doelsch I, Chadoeuf J, Cornu S, Derrien D, Fekiacova Z, Hatté C (2018) Atmosphere–soil carbon transfer as a function of soil depth. *Nature* 559:599–602. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0328-3>
- Batish DR, Kohli RK, Jose S, Singh HP (eds) (2007) *Tree–Crop Interactions: Lessons from Temperate Alley-Cropping Systems*. In: *Ecological Basis of Agroforestry*. CRC Press
- Battie-Laclau P, Taschen E, Plassard C, Dezette D, Abadie J, Arnal D, Benezech P, Duthoit M, Pablo A-L, Jourdan C, Laclau J-P, Bertrand I, Taudière A, Hinsinger P (2020) Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant Soil* 453:153–171. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04181-z>
- Bayala J, Prieto I (2020) Water acquisition, sharing and redistribution by roots: applications to agroforestry systems. *Plant Soil* 453:17–28. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04173-z>
- Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahon SK, Wallenstein MD (2013) High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities. *JoVE J Vis Exp* e50961. <https://doi.org/10.3791/50961>
- Beniston JW, DuPont ST, Glover JD, Lal R, Dungait JAJ (2014) Soil organic carbon dynamics 75 years after land-use change in perennial grassland and annual wheat agricultural systems. *Biogeochemistry* 120:37–49. <https://doi.org/10.1007/s10533-014-9980-3>

- Bertrand I, Viaud V, Daufresne T, Pellerin S, Recous S (2019) Stoichiometry constraints challenge the potential of agroecological practices for the soil C storage. A review. *Agron Sustain Dev* 39:54. <https://doi.org/10.1007/s13593-019-0599-6>
- Boinot S, Poulmarc'h J, Mézière D, Lauri P-É, Sarthou J-P (2019) Distribution of overwintering invertebrates in temperate agroforestry systems: Implications for biodiversity conservation and biological control of crop pests. *Agric Ecosyst Environ* 285:106630. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106630>
- Bolinder MA, Angers DA, Dubuc JP (1997) Estimating shoot to root ratios and annual carbon inputs in soils for cereal crops. *Agric Ecosyst Environ* 63:61–66. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(96\)01121-8](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(96)01121-8)
- Bolte A, Villanueva I (2006) Interspecific competition impacts on the morphology and distribution of fine roots in European beech (*Fagus sylvatica* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Eur J For Res* 125:15–26. <https://doi.org/10.1007/s10342-005-0075-5>
- Bonanomi G, Idbella M, Zotti M, Santorufo L, Motti R, Maisto G, De Marco A (2021) Decomposition and temperature sensitivity of fine root and leaf litter of 43 mediterranean species. *Plant Soil* 464:453–465. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04974-1>
- Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C (1992) Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires: étude histologique. *Can J Bot* 70:735–741. <https://doi.org/10.1139/b92-094>
- Caplan JS, Meiners SJ, Flores-Moreno H, McCormack ML (2019) Fine-root traits are linked to species dynamics in a successional plant community. *Ecology* 100:e02588. <https://doi.org/10.1002/ecy.2588>
- Cardinael R (2015) Stockage de carbone et dynamique des matières organiques des sols en agroforesterie sous climat méditerranéen et tempéré. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE)
- Cardinael R, Chevallier T, Cambou A, Béral C, Barthès BG, Dupraz C, Durand C, Kouakoua E, Chenu C (2017) Increased soil organic carbon stocks under agroforestry: A survey of six different sites in France. *Agric Ecosyst Environ* 236:243–255. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.011>
- Cardinael R, Guenet B, Chevallier T, Dupraz C, Cozzi T, Chenu C (2018) High organic inputs explain shallow and deep SOC storage in a long-term agroforestry system – combining experimental and modeling approaches. *Biogeosciences* 15:297–317. <https://doi.org/10.5194/bg-15-297-2018>
- Cardinael R, Mao Z, Prieto I, Stokes A, Dupraz C, Kim JH, Jourdan C (2015) Competition with winter crops induces deeper rooting of walnut trees in a Mediterranean alley cropping agroforestry system. *Plant Soil* 391:219–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2422-8>
- Carvalho JLN, Otto R, Franco HCJ, Trivelin PCO (2013) Input of sugarcane post-harvest residues into the soil. *Sci Agric* 70:336–344. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000500008>
- Castle WS, Krezdorn AH (1979) Anatomy and Morphology of Fieldsampled Citrus Fibrous Roots as Influenced by Sampling Depth and Rootstock! *HortScience* 14 (5):603–605
- Chen X, Chen HYH (2021) Plant mixture balances terrestrial ecosystem C:N:P stoichiometry. *Nat Commun* 12:4562. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24889-w>

- Chopart J-L, Rodrigues SR, Carvalho de Azevedo M, de Conti Medina C (2008) Estimating sugarcane root length density through root mapping and orientation modelling. *Plant Soil* 313:101. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9683-4>
- Chopart JL, Siband P (1999) Development and validation of a model to describe root length density of maize from root counts on soil profiles. *Plant Soil* 214:61–74. <https://doi.org/10.1023/A:1004658918388>
- Ciesielski H, Proix N, Sterckeman T (1997) Détermination des incertitudes liées à une méthode de mise en solution des sols et sédiments par étude interlaboratoire. *Déterm Incert Liées À Une Méthode Mise En Solut Sols Sédiments Par Étude Interlaboratoire* 25:188–192
- Ciesielski H, Sterckeman T (1997) A comparison between three methods for the determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils. *Agronomie* 17:9
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Glob Change Biol* 19:988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Coulouma G, Feurer D, Vinatier F, Huttel O (2021) Assessing new sensor-based volume measurement methods for high-throughput bulk density estimation in the field under various soil conditions. *Eur J Soil Sci* ejs.13115. <https://doi.org/10.1111/ejss.13115>
- Cuevas E, Medina E (1988) Nutrient dynamics within amazonian forests. *Oecologia* 76:222–235. <https://doi.org/10.1007/BF00379956>
- Cui Y, Fang L, Guo X, Wang X, Zhang Y, Li P, Zhang X (2018) Ecoenzymatic stoichiometry and microbial nutrient limitation in rhizosphere soil in the arid area of the northern Loess Plateau, China. *Soil Biol Biochem* 116:11–21. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.025>
- Danso SKA, Zapata F, Awonaike KO (1995) Measurement of biological N₂ fixation in field-grown *Robinia pseudoacacia* L. *Soil Biol Biochem* 27:415–419. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)98612-R](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)98612-R)
- de Britto Costa P, Staudinger C, Veneklaas EJ, Oliveira RS, Lambers H (2021) Root positioning and trait shifts in *Hibbertia racemosa* as dependent on its neighbour's nutrient-acquisition strategy. *Plant Cell Environ* 44:1257–1267. <https://doi.org/10.1111/pce.13991>
- de Graaff M-A, Jastrow JD, Gillette S, Johns A, Wulfschleger SD (2014) Differential priming of soil carbon driven by soil depth and root impacts on carbon availability. *Soil Biol Biochem* 69:147–156. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.047>
- de Parseval H, Barot S, Gignoux J, Lata J-C, Raynaud X (2017) Modelling facilitation or competition within a root system: importance of the overlap of root depletion and accumulation zones. *Plant Soil* 419:97–111. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3321-y>
- Deyn GBD, Cornelissen JHC, Bardgett RD (2008) Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecol Lett* 11:516–531. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01164.x>
- D'Hervilly C (2021) Impact du linéaire sous arboré sur les organismes et la fertilité du sol en système agroforestier tempéré. Montpellier, SupAgro
- D'Hervilly C, Bertrand I, Capowiez Y, Béral C, Delapré-Cosset L, Marsden C (2022) Seasonal variations in macrofauna distribution according to the distance from a herbaceous strip in a

- Mediterranean alley cropping plot. *Appl Soil Ecol* 170:104309. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104309>
- Duan ZP, Gan YW, Wang BJ, Hao XD, Xu WL, Zhang W, Li LH (2019) Interspecific interaction alters root morphology in young walnut/wheat agroforestry systems in northwest China. *Agrofor Syst* 93:419–434. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0133-2>
- Duchene O, Celette F, Barreiro A, Dimitrova Mårtensson L-M, Freschet GT, David C (2020) Introducing Perennial Grain in Grain Crops Rotation: The Role of Rooting Pattern in Soil Quality Management. *Agronomy* 10:1254. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091254>
- Dufour L, Gosme M, Le Bec J, Dupraz C (2020) Does pollarding trees improve the crop yield in a mature alley-cropping agroforestry system? *J Agron Crop Sci* 206:640–649. <https://doi.org/10.1111/jac.12403>
- Dufour L, Metay A, Talbot G, Dupraz C (2013) Assessing Light Competition for Cereal Production in Temperate Agroforestry Systems using Experimentation and Crop Modelling. *J Agron Crop Sci* 199:217–227. <https://doi.org/10.1111/jac.12008>
- Eastham J, Rose CW (1990) Tree pasture interactions at a range of tree densities in an agroforestry experiment. I. Rooting patterns. *Aust J Agric Res* 41:683–695. <https://doi.org/10.1071/ar9900683>
- Eissenstat DM, Wells CE, Yanai RD, Whitbeck JL (2000) Building roots in a changing environment: implications for root longevity. *New Phytol* 147:33–42. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00686.x>
- Fageria NK, Moreira A (2011) Chapter Four - The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 251–331
- Fanin N, Moorhead D, Bertrand I (2016) Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry* 129:21–36. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0217-5>
- Ferchaud F, Vitte G, Bornet F, Strullu L, Mary B (2015) Soil water uptake and root distribution of different perennial and annual bioenergy crops. *Plant Soil* 388:307–322. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2335-y>
- Fontaine S, Barot S, Barré P, Bdioui N, Mary B, Rumpel C (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450:277–280. <https://doi.org/10.1038/nature06275>
- Freschet GT, Cornelissen JHC, van Logtestijn RSP, Aerts R (2010) Substantial nutrient resorption from leaves, stems and roots in a subarctic flora: what is the link with other resource economics traits? *New Phytol* 186:879–889. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03228.x>
- Freschet GT, Roumet C, Comas LH, Weemstra M, Bengough AG, Rewald B, Bardgett RD, De Deyn GB, Johnson D, Klimešová J, Lukac M, McCormack ML, Meier IC, Pagès L, Poorter H, Prieto I, Wurzbarger N, Zadworny M, Bagniewska-Zadworna A, Blancaflor EB, Brunner I, Gessler A, Hobbie SE, Iversen CM, Mommer L, Picon-Cochard C, Postma JA, Rose L, Ryser P, Scherer-Lorenzen M, Soudzilovskaia NA, Sun T, Valverde-Barrantes OJ, Weigelt A, York LM, Stokes A (2021) Root traits as drivers of plant and ecosystem functioning: current understanding, pitfalls and future research needs. *New Phytol* 232:1123–1158. <https://doi.org/10.1111/nph.17072>

- Freschet GT, Valverde-Barrantes OJ, Tucker CM, Craine JM, McCormack ML, Violle C, Fort F, Blackwood CB, Urban-Mead KR, Iversen CM, Bonis A, Comas LH, Cornelissen JHC, Dong M, Guo D, Hobbie SE, Holdaway RJ, Kembel SW, Makita N, Onipchenko VG, Picon-Cochard C, Reich PB, de la Riva EG, Smith SW, Soudzilovskaia NA, Tjoelker MG, Wardle DA, Roumet C (2017) Climate, soil and plant functional types as drivers of global fine-root trait variation. *J Ecol* 105:1182–1196. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12769>
- Gardner M, Sarrantonio M (2012) Cover Crop Root Composition and Density in a Long-Term Vegetable Cropping System Trial. *J Sustain Agric* 36:719–737. <https://doi.org/10.1080/10440046.2012.672548>
- Garrett HE “Gene,” Wolz KJ, Walter WD “Dusty,” Godsey LD, McGraw RL (2021) Alley Cropping Practices. In: North American Agroforestry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 163–204
- Germon A, Laclau J-P, Robin A, Jourdan C (2020) Tamm Review: Deep fine roots in forest ecosystems: Why dig deeper? *For Ecol Manag* 466:118135. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118135>
- Gill RA, Burke IC, Lauenroth WK, Milchunas DG (2002) Longevity and turnover of roots in the shortgrass steppe: influence of diameter and depth. *Plant Ecol* 159:241–251. <https://doi.org/10.1023/A:1015529507670>
- Gill RA, Jackson RB (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytol* 147:13–31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00681.x>
- Goering HK, Van Soest PJ (1970) Forage Fiber Analyses: Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications
- Guillot E (2018) Gradient spatial de fonctionnement et de stabilité écologique d’un sol en système agroforestier Méditerranéen
- Guillot E, Bertrand I, Rumpel C, Gomez C, Arnal D, Abadie J, Hinsinger P (2021) Spatial heterogeneity of soil quality within a Mediterranean alley cropping agroforestry system: Comparison with a monocropping system. *Eur J Soil Biol* 105:103330. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103330>
- Hartemink AE, Zhang Y, Bockheim JG, Curi N, Silva SHG, Grauer-Gray J, Lowe DJ, Krasilnikov P (2020) Chapter Three - Soil horizon variation: A review. In: Sparks DL (ed) *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp 125–185
- Hirte J, Leifeld J, Abiven S, Oberholzer H-R, Mayer J (2018) Below ground carbon inputs to soil via root biomass and rhizodeposition of field-grown maize and wheat at harvest are independent of net primary productivity. *Agric Ecosyst Environ* 265:556–566. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.010>
- Hodge A (2009) Root decisions. *Plant Cell Environ* 32:628–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01891.x>
- Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M (2009) Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 321:153–187. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9929-9>
- Houde S, Thivierge M-N, Fort F, Bélanger G, Chantigny MH, Angers DA, Vanasse A (2020) Root growth and turnover in perennial forages as affected by management systems and soil depth. *Plant Soil* 451:371–387. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04532-1>

- Hummel I, Vile D, Violle C, Devaux J, Ricci B, Blanchard A, Garnier É, Roumet C (2007) Relating root structure and anatomy to whole-plant functioning in 14 herbaceous Mediterranean species. *New Phytol* 173:313–321. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01912.x>
- IUSS Working group WRB (2014) World reference base for soil resources 2014: international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome
- Ivanov K, Zapryanova P, Angelova V, Bekjarov G, Dospatliev L (2010) ICP determination of phosphorous in soils and plants. 19th World Congr Soil Sci Soil Solut Chang World Brisb Australia 71–74
- Jolivet C, Falcon J-LA, Berche P, Boulonne L, Fontaine M, Gouny L, Lehmann S, Maitre B, Ratié C, Schellenberger E, Soler-Dominguez N (2018) Manuel du Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS)
- Karhu K, Hilasvuori E, Fritze H, Biasi C, Nykänen H, Liski J, Vanhala P, Heinonsalo J, Pumpanen J (2016) Priming effect increases with depth in a boreal forest soil. *Soil Biol Biochem* 99:104–107. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.001>
- Kätterer T, Bolinder MA, Andrén O, Kirchmann H, Menichetti L (2011) Roots contribute more to refractory soil organic matter than above-ground crop residues, as revealed by a long-term field experiment. *Agric Ecosyst Environ* 141:184–192. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.02.029>
- Kaur B, Gupta SR, Singh G (2000) Soil carbon, microbial activity and nitrogen availability in agroforestry systems on moderately alkaline soils in northern India. *Appl Soil Ecol* 15:283–294. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00079-2)
- Kladnik A (2013) Maize Kernels - Fixation in FAA, Embedding, Sectioning and Feulgen Staining. *BIO-Protoc* 3. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.835>
- Konopka B, Pagès L, Doussan C (2009) Soil compaction modifies morphological characteristics of seminal maize roots. *Plant Soil Environ* 55:1
- Lavorel S, Garnier E (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Funct Ecol* 16:545–556. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2002.00664.x>
- Lawson TL, Kang BT (1990) Yield of maize and cowpea in an alley cropping system in relation to available light. *Agric For Meteorol* 52:347–357. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(90\)90091-J](https://doi.org/10.1016/0168-1923(90)90091-J)
- Legay N, Baxendale C, Grigulis K, Krainer U, Kastl E, Schloter M, Bardgett RD, Arnoldi C, Bahn M, Dumont M, Poly F, Pommier T, Clément JC, Lavorel S (2014) Contribution of above- and below-ground plant traits to the structure and function of grassland soil microbial communities. *Ann Bot* 114:1011–1021. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu169>
- Liang C, Schimel JP, Jastrow JD (2017) The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. *Nat Microbiol* 2:1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.105>
- Lin D, Dou P, Yang G, Qian S, Wang H, Zhao L, Yang Y, Mi X, Ma K, Fanin N (2020) Home-field advantage of litter decomposition differs between leaves and fine roots. *New Phytol* nph.16517. <https://doi.org/10.1111/nph.16517>
- Livesley SJ, Gregory PJ, Buresh RJ (2004) Competition in tree row agroforestry systems. 3. Soil water distribution and dynamics. *Plant Soil* 264:129–139. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000047750.80654.d5>

- Loeppmann S, Forbush K, Cheng W, Pausch J (2019) Subsoil biogeochemical properties induce shifts in carbon allocation pattern and soil C dynamics in wheat. *Plant Soil* 442:369–383. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04204-9>
- Makita N, Hirano Y, Mizoguchi T, Kominami Y, Dannoura M, Ishii H, Finér L, Kanazawa Y (2011) Very fine roots respond to soil depth: biomass allocation, morphology, and physiology in a broad-leaved temperate forest. *Ecol Res* 26:95–104. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0764-5>
- Matejovic I (1997) Determination of carbon and nitrogen in samples of various soils by the dry combustion. *Commun Soil Sci Plant Anal* 28:1499–1511. <https://doi.org/10.1080/00103629709369892>
- Maurice J, Laclau J-P, Scorzoni Re D, Gonçalves JL de M, Nouvellon Y, Bouillet J-P, Stape JL, Ranger J, Behling M, Chopart J-L (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. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0380-8>
- McClagherty CA, Pastor J, Aber JD, Melillo JM (1985) Forest Litter Decomposition in Relation to Soil Nitrogen Dynamics and Litter Quality. *Ecology* 66:266–275. <https://doi.org/10.2307/1941327>
- Melillo JM, Aber JD, Linkins AE, Ricca A, Fry B, Nadelhoffer KJ (1989) Carbon and nitrogen dynamics along the decay continuum: Plant litter to soil organic matter. *Plant Soil* 115:189–198. <https://doi.org/10.1007/BF02202587>
- Melillo JM, Aber JD, Muratore JF (1982) Nitrogen and Lignin Control of Hardwood Leaf Litter Decomposition Dynamics. *Ecology* 63:621–626. <https://doi.org/10.2307/1936780>
- Milchunas DG, Lauenroth WK (1989) Three-Dimensional Distribution of Plant Biomass in Relation to Grazing and Topography in the Shortgrass Steppe. *Oikos* 55:82–86. <https://doi.org/10.2307/3565876>
- Miller AW, Pallardy SG (2001) Resource competition across the crop-tree interface in a maize-silver maple temperate alley cropping stand in Missouri. *Agrofor Syst* 53:247–259. <https://doi.org/10.1023/A:1013327510748>
- Moorhead D, Lashermes G, Recous S, Bertrand I (2014) Interacting Microbe and Litter Quality Controls on Litter Decomposition: A Modeling Analysis. *PLOS ONE* 9:e108769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108769>
- Moorhead DL, Lashermes G, Sinsabaugh RL, Weintraub MN (2013) Calculating co-metabolic costs of lignin decay and their impacts on carbon use efficiency. *Soil Biol Biochem* 66:17–19. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.06.016>
- Nyberg G, Högborg P (1995) Effects of young agroforestry trees on soils in on-farm situations in western Kenya. *Agrofor Syst* 32:45–52. <https://doi.org/10.1007/BF00713847>
- Olsen SR (1954) Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. U.S. Department of Agriculture
- Pausch J, Kuzyakov Y (2018) Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Glob Change Biol* 24:1–12. <https://doi.org/10.1111/gcb.13850>

- Picon-Cochard C, Pilon R, Tarrowx E, Pagès L, Robertson J, Dawson L (2012) Effect of species, root branching order and season on the root traits of 13 perennial grass species. *Plant Soil* 353:47–57. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1007-4>
- Poeplau C, Vos C, Don A (2017) Soil organic carbon stocks are systematically overestimated by misuse of the parameters bulk density and rock fragment content. *SOIL* 3:61–66. <https://doi.org/10.5194/soil-3-61-2017>
- Poirier V, Roumet C, Munson AD (2018) The root of the matter: Linking root traits and soil organic matter stabilization processes. *Soil Biol Biochem* 120:246–259. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.02.016>
- Pradier C (2016) Rôles fonctionnels des racines fines profondes en plantation d'eucalyptus au Brésil sur sols pauvres en nutriments. Réponse à une situation hydrique limitante. Thesis, Montpellier SupAgro
- Prieto I, Roumet C, Cardinael R, Dupraz C, Jourdan C, Kim JH, Maeght JL, Mao Z, Pierret A, Portillo N, Rroupsard O, Thammahacksa C, Stokes A (2015) Root functional parameters along a land-use gradient: evidence of a community-level economics spectrum. *J Ecol* 103:361–373. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12351>
- Querné A, Battie-laclau P, Dufour L, Wery J, Dupraz C (2017) Effects of walnut trees on biological nitrogen fixation and yield of intercropped alfalfa in a Mediterranean agroforestry system. *Eur J Agron* 84:35–46. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.12.001>
- Rasse DP, Rumpel C, Dignac M-F (2005) Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil* 269:341–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0907-y>
- Roumet C, Urcelay C, Díaz S (2006) Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytol* 170:357–368. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01667.x>
- Salma M (2015) Utilisation de la cryoconservation pour la conservation et la production de cultures in vitro de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Impact d'un protocole de cryoconservation sur la physiologie des cals embryogènes de palmier dattier. Phdthesis, Université Montpellier
- Sharrow SH, Ismail S (2004) Carbon and nitrogen storage in agroforests, tree plantations, and pastures in western Oregon, USA. *Agrofor Syst* 60:123–130. <https://doi.org/10.1023/B:AGFO.0000013267.87896.41>
- Singh RP, Saharan N, Ong CK (1989) Above and below ground interactions in alley-cropping in semi-arid India. *Agrofor Syst* 9:259–274. <https://doi.org/10.1007/BF00141088>
- Sinsabaugh RL, Hill BH, Follstad Shah JJ (2009) Ecoenzymatic stoichiometry of microbial organic nutrient acquisition in soil and sediment. *Nature* 462:795–798. <https://doi.org/10.1038/nature08632>
- Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 67:6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Smith SW, Woodin SJ, Pakeman RJ, Johnson D, Wal R van der (2014) Root traits predict decomposition across a landscape-scale grazing experiment. *New Phytol* 203:851–862. <https://doi.org/10.1111/nph.12845>

- Sun Y, Wang C, Chen HYH, Ruan H (2020) Responses of C:N stoichiometry in plants, soil, and microorganisms to nitrogen addition. *Plant Soil* 456:277–287. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04717-8>
- Tate RL (2020) *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons
- Tautges NE, Chiartas JL, Gaudin ACM, O’Geen AT, Herrera I, Scow KM (2019) Deep soil inventories reveal that impacts of cover crops and compost on soil carbon sequestration differ in surface and subsurface soils. *Glob Change Biol* 25:3753–3766. <https://doi.org/10.1111/gcb.14762>
- Torquebiau EF (2000) A renewed perspective on agroforestry concepts and classification. *Comptes Rendus Académie Sci - Ser III - Sci Vie* 323:1009–1017. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(00\)01239-7](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(00)01239-7)
- Tückmantel T, Leuschner C, Preusser S, Kandeler E, Angst G, Mueller CW, Meier IC (2017) Root exudation patterns in a beech forest: Dependence on soil depth, root morphology, and environment. *Soil Biol Biochem* 107:188–197. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.01.006>
- Udawatta RP, Kremer RJ, Nelson KA, Jose S, Bardhan S (2014) Soil Quality of a Mature Alley Cropping Agroforestry System in Temperate North America. *Commun Soil Sci Plant Anal* 45:2539–2551. <https://doi.org/10.1080/00103624.2014.932376>
- Uselman SM, Qualls RG, Thomas RB (2000) Effects of increased atmospheric CO₂, temperature, and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Soil* 222:191–202. <https://doi.org/10.1023/A:1004705416108>
- Van noordwijk M, Brouwer G (1991) Review of Quantitative Root Length Data in Agriculture. In: McMICHAEL BL, Persson H (eds) *Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology*. Elsevier, pp 515–525
- Van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 829–835
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19:703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Villarino SH, Pinto P, Jackson RB, Piñeiro G (2021) Plant rhizodeposition: A key factor for soil organic matter formation in stable fractions. *Sci Adv* 7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3176>
- Von Holle B, Neill C, Largay EF, Budreski KA, Ozimec B, Clark SA, Lee K (2013) Ecosystem legacy of the introduced N₂-fixing tree *Robinia pseudoacacia* in a coastal forest. *Oecologia* 172:915–924. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2543-1>
- Wang H, Huang Y, Huang H, Wang KM, Zhou SY (2005) Soil properties under young Chinese fir-based agroforestry system in mid-subtropical China. *Agrofor Syst* 64:131–141. <https://doi.org/10.1007/s10457-004-0718-4>
- Wang Y, Dong X, Wang H, Wang Z, Gu J (2016) Root tip morphology, anatomy, chemistry and potential hydraulic conductivity vary with soil depth in three temperate hardwood species. *Tree Physiol* 36:99–108. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv094>
- Weemstra M, Mommer L, Visser EJW, van Ruijven J, Kuyper TW, Mohren GMJ, Sterck FJ (2016) Towards a multidimensional root trait framework: a tree root review. *New Phytol* 211:1159–1169. <https://doi.org/10.1111/nph.14003>

Zechmeister-Boltenstern S, Keiblinger KM, Mooshammer M, Peñuelas J, Richter A, Sardans J, Wanek W (2015) The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecol Monogr* 85:133–155. <https://doi.org/10.1890/14-0777.1>

Zhang W, Wang BJ, Gan YW, Duan ZP, Hao XD, Xu WL, Li LH (2019) Different tree age affects light competition and yield in wheat grown as a companion crop in jujube-wheat agroforestry. *Agrofor Syst* 93:653–664. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0160-z>

Supplementary Data**Supplementary Table III-8** Effect of soil depth, location and their interaction on the root biomass, functional traits, elemental composition, C-fractions and some quality indexes. Data are F- and p-values (n=3).

	Soil depth		Location		Interaction	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Biomass						
Root biomass density	19.64	4.92×10^{-5}	3.95	4.02×10^{-2}	3.38	3.48×10^{-2}
C stocks in living roots	17.14	1.05×10^{-4}	3.40	5.89×10^{-2}	3.40	3.40×10^{-2}
Functional traits						
Diameter	2.01	0.19	10.26	6.13×10^{-3}	0.87	0.45
Specific root length	1.04	0.34	1.56	0.26	0.23	0.80
Coefficient A	1.03	0.32	0.29	0.75	0.91	0.42
Elemental composition						
C content	3.46	0.06	1.05	0.37	0.44	0.78
N content	2.02	0.17	0.11	0.90	0.54	0.71
P content	5.49	1.53×10^{-2}	1.55	0.24	0.88	0.50
C:N	1.17	0.34	0.15	0.86	0.47	0.76
C:P	4.16	3.51×10^{-2}	0.82	0.46	0.62	0.66
N:P	4.01	3.87×10^{-2}	0.78	0.48	0.19	0.94
C-fractions						
Lignin content	0.29	0.75	1.71	0.21	0.33	0.85
Cellulose content	0.63	0.54	0.38	0.69	0.73	0.58
Hemicellulose content	3.52	5.40×10^{-2}	10.56	1.19×10^{-3}	3.19	4.19×10^{-2}
Soluble compounds content	3.45	0.06	3.08	0.07	1.64	0.21
Quality index						
Lignin:N	0.20	0.82	1.45	0.26	0.18	0.95
Ligno-cellulosic index	0.59	0.57	2.12	0.15	0.35	0.84
Soluble:cell walls	2.13	0.15	2.03	0.16	1.80	0.18

Supplementary Table III-9 Linear regressions between the root length density and the mean root impact density for each location.

	R ²	Regression coefficient
UVS	87.2 %	4.24
Crop-1m	79.2 %	2.80
Crop-4m	79.3 %	2.63

Supplementary Table III-10 Effect of soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and location (Crop-1 m and Crop-4 m) on root anatomy (n=3). Data are p-values.

	Soil depth	Location	Interaction
Root total area	0.55	0.62	0.87
Stele area	3.46×10^{-2}	0.34	0.55
Stele area :total root area ratio	0.66	0.81	0.74
Endoderm width	0.18	0.94	0.92
Average area of the metaxylem vessels	0.91	0.89	0.99
Number of metaxylem vessels	0.41	0.51	0.77
Ratio number of metaxylem vessels :stele area	0.77	0.86	0.78
Total area occupied by metaxylem vessels	0.11	0.20	0.14
Total area occupied by metaxylem vessels :stele area ratio	0.21	1.03×10^{-2}	1.18×10^{-2}

Supplementary Table III-11 Effect of soil depth, location and their interaction on the soil physical, chemical and microbiological properties. Data are F- and p-values (n=3).

	Soil depth		Location		Interaction	
	F-value	p-value	F-value	p-value	F-value	p-value
Physical properties						
Bulk density	455.60	7.88×10^{-15}	0.00	1.00	0.00	1.00
Bulk density on fine particles	217.22	2.53×10^{-12}	0.00	1.00	0.00	1.00
Stones volumetric proportion	7.31	5.57×10^{-3}	0.00	1.00	0.00	1.00
Clay content	38.15	8.16×10^{-7}	0.19	0.83	0.03	1.00
Silt content	13.59	3.55×10^{-4}	0.58	0.57	0.28	0.89
Sand content	35.67	1.27×10^{-6}	0.08	0.93	0.02	1.00
Moisture	0.05	0.95	0.57	0.58	0.59	0.67
Chemical properties						
Organic C content	52.79	8.99×10^{-8}	0.36	0.71	0.13	0.97
Organic C stocks	41.54	4.63×10^{-7}	0.40	0.67	0.25	0.91
Total N content	23.62	1.68×10^{-5}	0.61	0.55	0.25	0.91
Total P content	18.76	6.39×10^{-5}	0.22	0.80	0.40	0.81
Soil C:N	31.99	2.57×10^{-6}	0.79	0.47	0.02	1.00

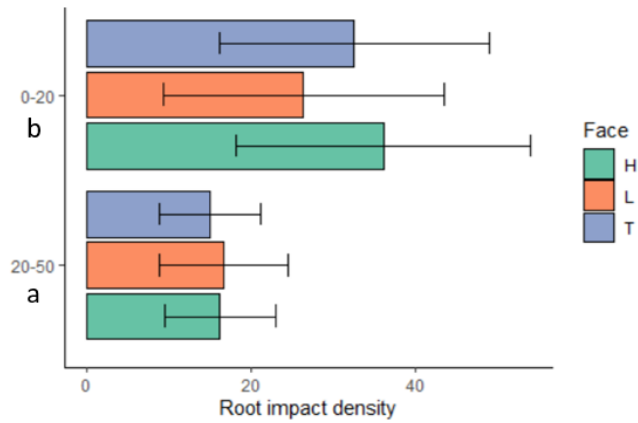
Soil N:P	1.09	0.36	0.72	0.50	0.27	0.89
Soil C:P	13.83	3.25×10^{-4}	0.15	0.86	0.29	0.88
Dissolved organic C content	13.30	3.95×10^{-4}	1.33	0.29	0.49	0.75
Mineral N content	19.88	4.59×10^{-5}	5.93	1.18×10^{-2}	0.67	0.62
Olsen P content	23.66	1.66×10^{-5}	0.11	0.90	0.70	0.60
CEC	42.97	3.68×10^{-7}	0.42	0.66	0.03	1.00
pH	5.23	1.79×10^{-2}	0.53	0.60	0.15	0.96
Biological properties						
MBC	12.99	4.46×10^{-4}	0.52	0.60	0.40	0.81
MBN	3.60	5.10×10^{-2}	0.55	0.59	1.40	0.28
MBC:N	0.37	0.70	0.76	0.49	1.28	0.32
16S	26.63	8.10×10^{-6}	0.65	0.53	0.15	0.96
18S	45.45	2.52×10^{-7}	2.96	0.08	1.16	0.36
16S:18S	9.38	2.02×10^{-3}	3.27	0.06	0.98	0.45
C-enzymatic activity	65.79	1.91×10^{-8}	0.76	0.48	0.45	0.77
N-enzymatic activity	6.54	8.40×10^{-3}	0.65	0.53	0.58	0.68
P-enzymatic activity	26.57	8.22×10^{-6}	0.15	0.87	0.61	0.66
C-enzymatic specific activity	43.85	3.21×10^{-7}	0.08	0.92	0.38	0.82
N-enzymatic specific activity	0.55	0.59	0.55	0.59	0.19	0.94
P-enzymatic specific activity	0.33	0.72	0.05	0.95	0.16	0.96
Length	35.50	1.31×10^{-6}	0.01	0.99	0.63	0.65
Angle	2.24	0.14	0.68	0.52	0.20	0.94

Supplementary Table III-12 Results of the first ANCOVA: effects of some soil variables (explicative variable), location and their interaction on some root characteristics (response variable) to test H1. Data are p-values (n=9). Column ANOVA (lm1, lm2) answers the hypothesis: “the effect of soil on roots varies according to the location”. Column anova (lm2, lm3) answers the hypothesis: “soil explains a part of roots that is not explained by the location”.

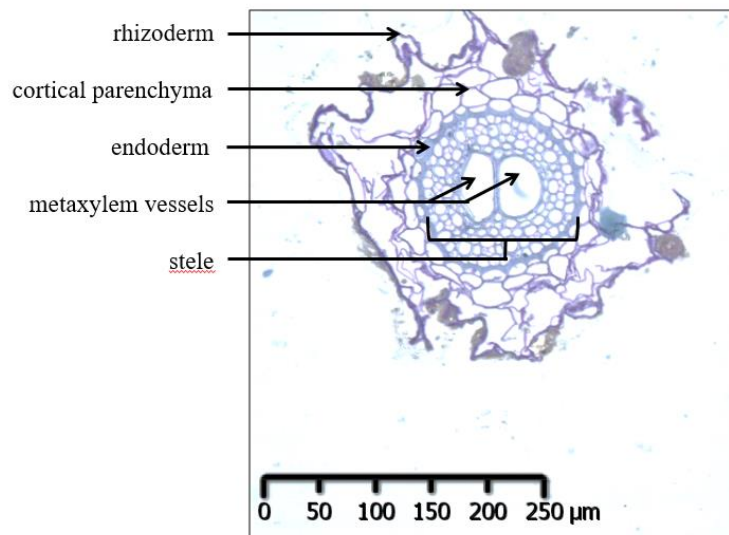
Response variable (Root)	Explicative variable (Soil)	anova (lm1, lm2)	anova (lm2, lm3)
Biomass density	Bulk density	2.38×10^{-3}	1.21×10^{-5}
	Mineral N content	1.87×10^{-2}	2.63×10^{-3}
	Stones	0.45	0.09
Lignin content	Bulk density	0.47	0.77
	Mineral N content	0.79	0.91
	Stones	0.07	0.09
Stele diameter	Bulk density	0.98	6.53×10^{-7}
	Mineral N content	3.44×10^{-2}	9.39×10^{-3}
	Stones	0.38	2.84×10^{-2}

Supplementary Table III-13 Results of the second ANCOVA: effects of some root variables (explicative variable), soil depth and their interaction on some soil properties (response variable) to test H2. Data p-values (n=9). Column ANOVA (lm1, lm2) answers the hypothesis: “the effect of roots on soil varies according to the soil depth”. Column anova (lm2, lm3) answers the hypothesis: “roots explain a part of soil that is not explained by the soil depth”. When ANOVA (lm1, lm2) is significant (p-value < 0.05), ANOVA (lm2, lm3) should not be considered.

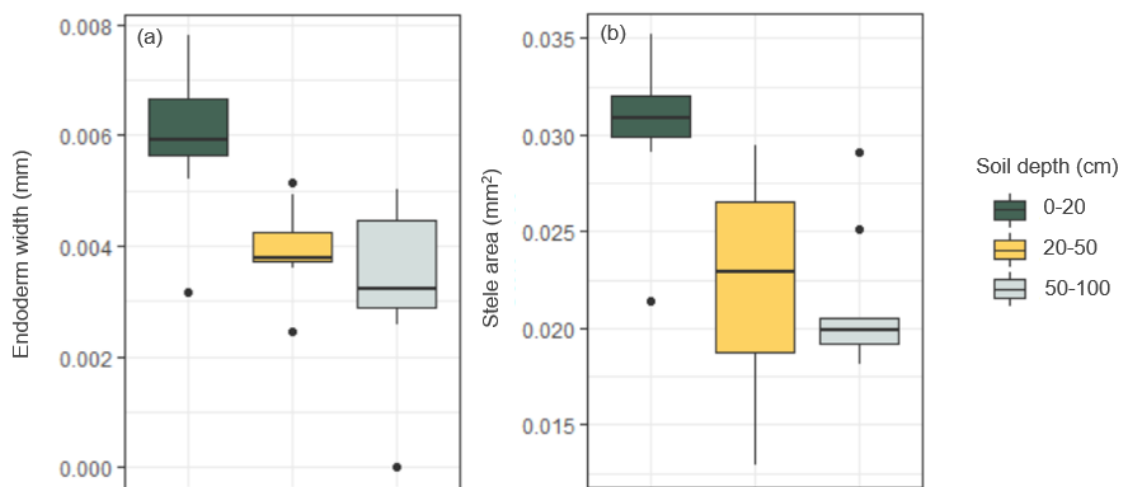
Response variable (Soil)	Explicative variable (Root)	anova (lm1, lm2)	anova (lm2, lm3)
Soil organic C stocks	Lignin:N	0.15	0.09
	C:N	0.30	0.08
	Ligno-cellulosic index	0.64	0.42
	Root C stocks	2.83×10^{-2}	0.11
MBC	Lignin:N	0.76	0.23
	C:N	0.61	0.30
	Ligno-cellulosic index	0.84	0.38
	Root C stocks	0.36	1.50×10^{-2}
Specific N enzymatic activity	Lignin:N	1.80×10^{-2}	8.02×10^{-4}
	C:N	3.21×10^{-2}	5.51×10^{-3}
	Ligno-cellulosic index	0.35	4.37×10^{-2}
	Root C stocks	0.39	0.40
Specific C enzymatic activity	Lignin:N	0.29	0.65
	C:N	0.53	0.06
	Ligno-cellulosic index	0.64	0.76
	Root C stocks	0.60	0.85



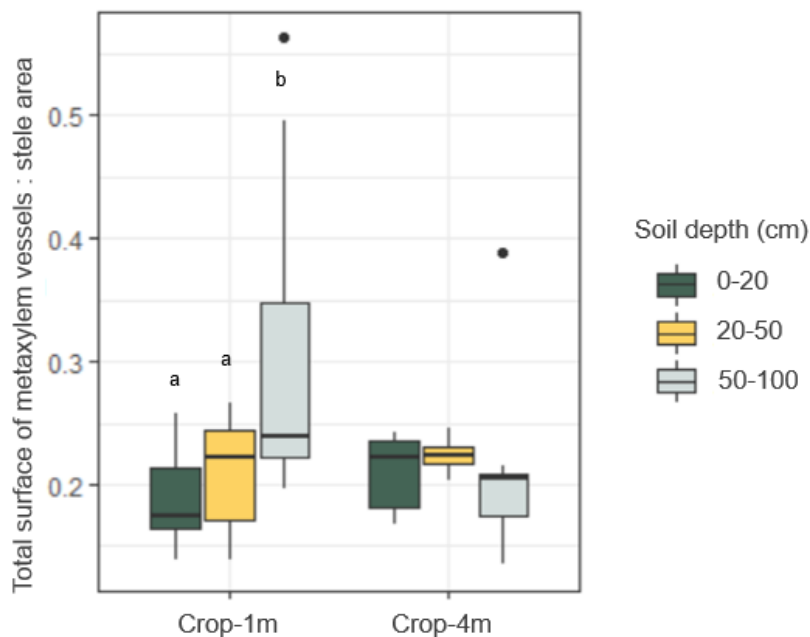
Supplementary Fig. III-5 The root impact density on each cube face for each soil layer (0-20 and 20-50 cm).



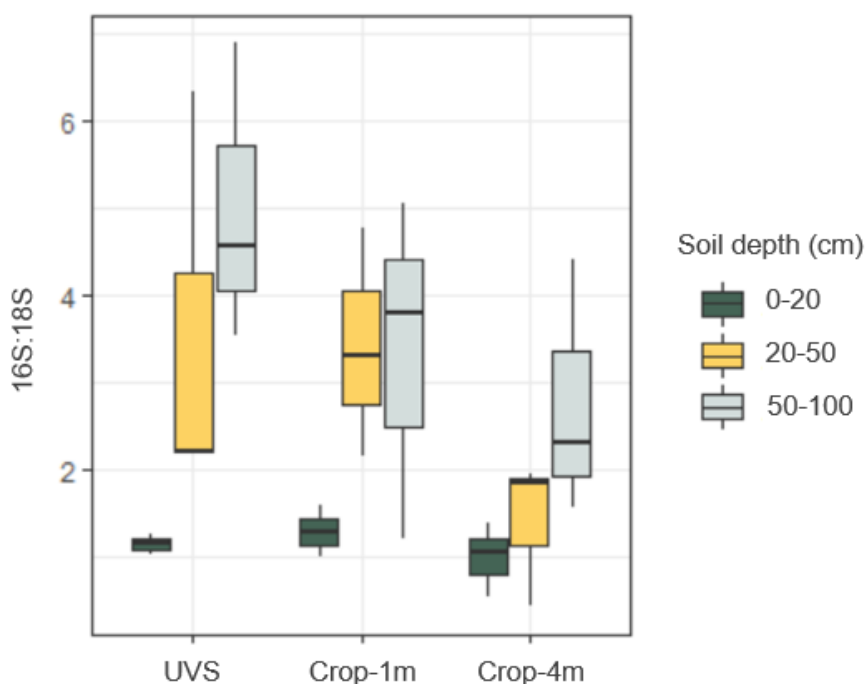
Supplementary Fig. III-6 Transverse section of a wheat root and definition of the anatomical traits.



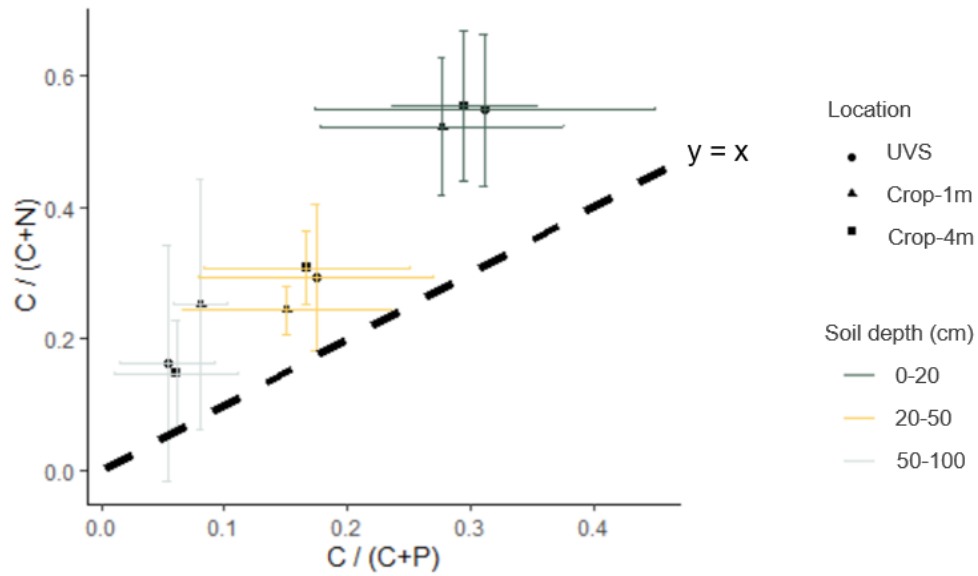
Supplementary Fig. III-7 Anatomical traits of wheat roots (endoderm width (a) and stele area (b) according to soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm). Data are mean values, and error bars represent the standard deviations (n=6). Lowercase letters indicate significant differences between the modalities when they were significant (p-value < 0.05).



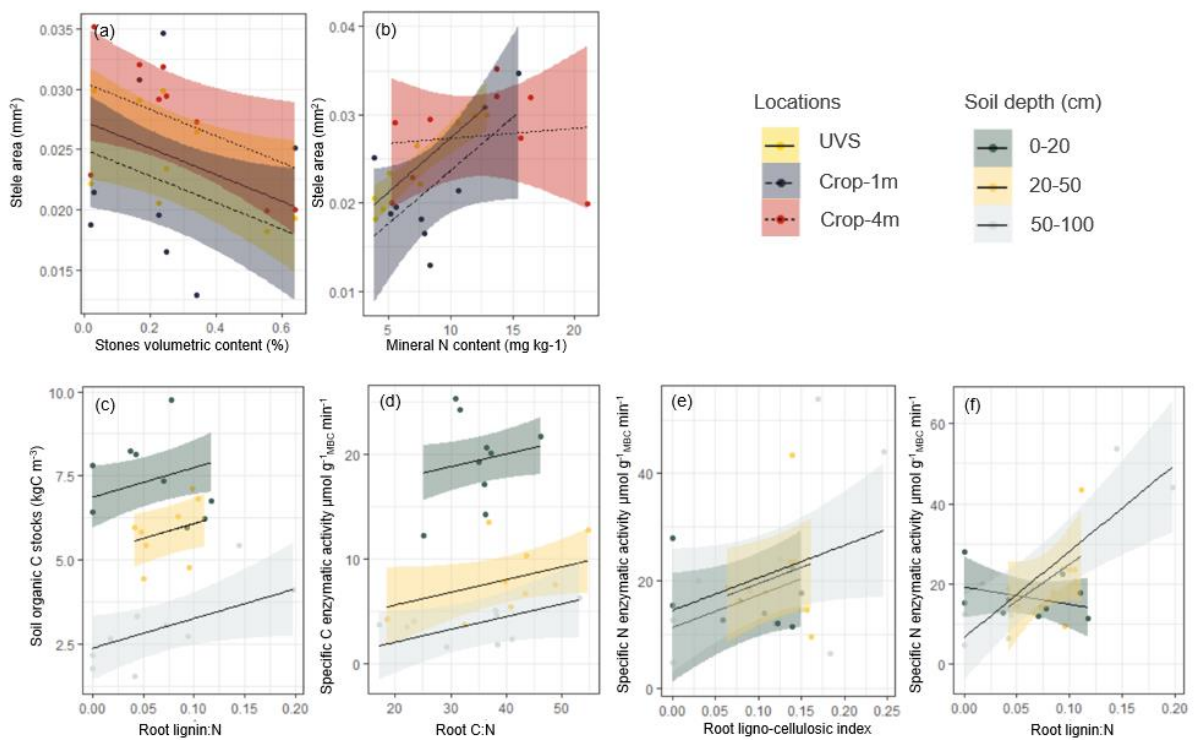
Supplementary Fig. III-8 Ratio of the total area of metaxylem vessels: stele area of durum wheat roots according to soil depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and to location (Crop-1 m and Crop-4 m). Data are mean values, and error bars represent the standard deviation (n=3). For each location, lowercase letters indicate significant differences between the modalities when they were significant (p-value < 0.05).



Supplementary Fig. III-9 Soil 16S:18S ratio (n=3) according to depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and location (UVS, Crop-1 m, Crop-4 m).



Supplementary Fig. III-10 Ecoenzyme stoichiometry of the relative C to N acquisition versus C to P acquisition according to depth and location. Data are mean values, and error bars represent the standard deviations (n=3).



Supplementary Fig. III-11 Correlations between some root and soil variables at different locations (UVS, Crop-1 m and Crop-4 m) to test H1 (a and b) and between some soil and root variables at different soil depths (0-20, 20-50 and 50-100 cm) to test H2 (c, d, e and f).

Conclusions et perspectives

Ce premier chapitre a permis d'établir le bilan quantitatif et qualitatif des systèmes racinaires des espèces associées sur les parcelles agroforestières des 2 sites d'études, ainsi que d'évaluer leurs potentielles contributions au stockage de carbone dans les sols par les entrées de litières racinaires.

Les hypothèses émises concernaient l'impact des variations des propriétés physico-chimiques selon un axe vertical (profondeur) et l'impact de l'association de plusieurs espèces sur le gradient horizontal (distance à l'arbre, H-1.1.). Les résultats sont complexes et ont montré que les distributions, biomasses et traits racinaires dépendent du type de système agroforestier. Dans le site en arrangement linéaire de DIAMS, trois communautés se distinguaient selon la distance à l'arbre et sans empiéter les zones colonisées par les autres : (i) les espèces de la bande enherbée (sans racines d'arbre observées dans nos fosses et à ce stade de maturité du système agroforestier) avec une tortuosité et/ou taux de ramification sur le premier horizon (0-20 cm) et une teneur en lignine plus importante que les racines de la culture, (ii) le blé à 1.5 m de la bande enherbée dont la biomasse à 0-20 cm était 3 fois plus faible que (iii) le blé à 4 m de la bande enherbée, dont la biomasse racinaire valait 100 à 150 g m⁻³. L'hétérogénéité des systèmes racinaires et des propriétés du sol est résumée dans la Fig. III-15. Le travail réalisé sur le parc agroforestier à dispersion naturelle des arbres de *Faidherbia-Flux* a montré une organisation très différente avec des systèmes racinaires à distributions complémentaires dans le profil (Fig. III-16). En effet, les 10 premiers centimètres sont occupés exclusivement par les racines des cultures annuelles (arachide et mil). Leurs densités de biomasses racinaires, entre 200 et 300 g m⁻³, sont équivalentes dans les 2 positions étudiées (loin et sous l'arbre) mais le diamètre racinaire moyen est significativement plus petit sous l'arbre que loin de lui. A l'inverse, les racines de *F. albida* occupent des horizons plus profonds de sol (jusqu'à la nappe, présente à 5-6 m de profondeur sur le site) avec une densité de biomasse racinaire beaucoup plus faible que celle des cultures (maximum 15 g m⁻³), entre 0 et 150 cm de profondeur.

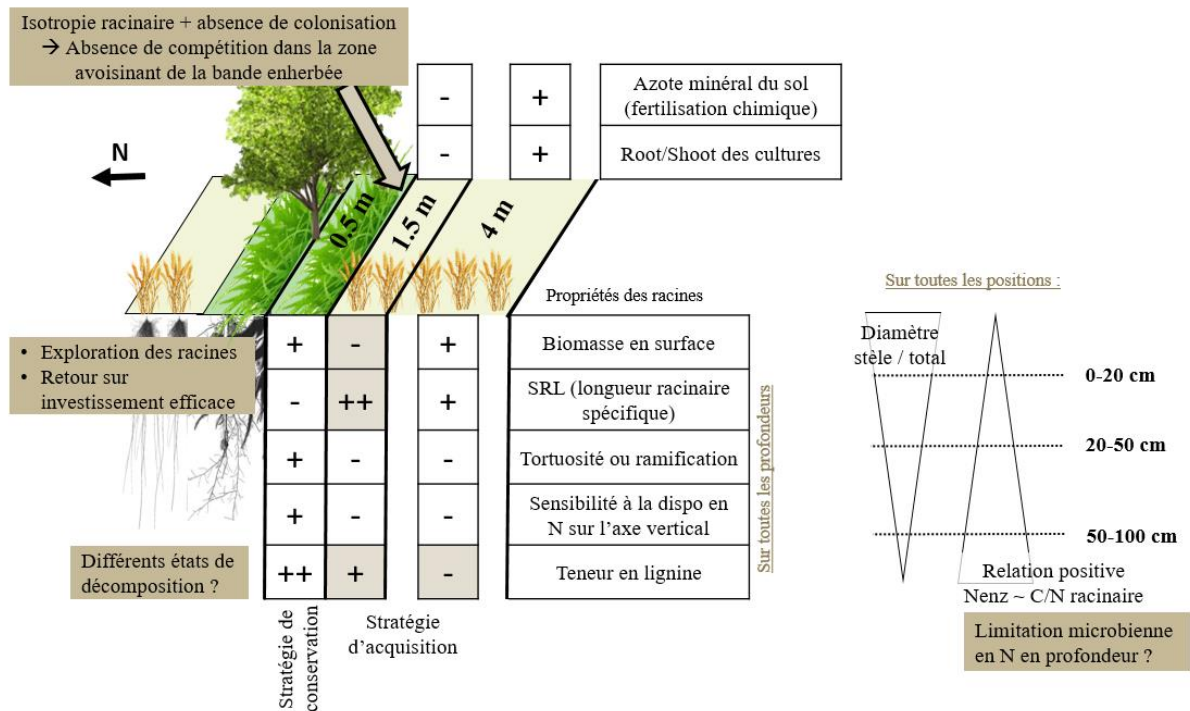


Fig. III-15. Schéma bilan d'une partie de la discussion de l'Article 2 sur le terrain DIAMS.

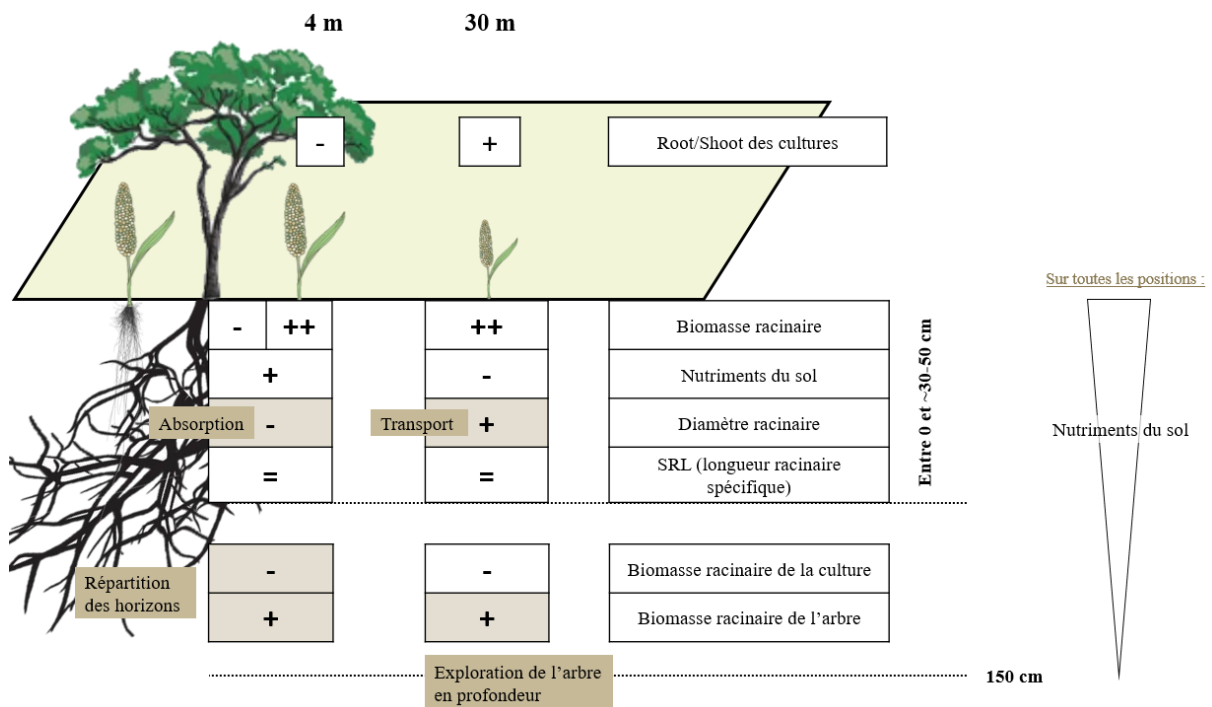


Fig. III-16. Schéma bilan d'une partie de la discussion de l'Article 1 sur le terrain Faidherbia-Flux.

La contribution des litières racinaires aux stocks de carbone du sol a été évaluée (H-1.2.). Les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des cultures représentent au maximum (sur le premier

horizon) 3.7 et 0.6%¹ du stock de carbone organique du sol sur Faidherbia-Flux (3.46 g dm⁻³ entre 0 et 10 cm de profondeur) et DIAMS (7.7 g dm⁻³ entre 0 et 20 cm) respectivement. La contribution des litières racinaires aux stocks de carbone dans le sol sont donc assez faibles, mais répétées tous les ans. De plus, ce calcul ne prend pas en compte les entrées de carbone par la rhizodéposition. Du fait de la faible densité de biomasse des racines fines de *F. albida* par rapport à celle des cultures annuelles, les litières racinaires de l'arbre représentent 6.1 et 7.1%¹ des entrées de carbone racinaire (sous et loin de l'arbre respectivement) entre 0 et 150 cm de profondeur. Cependant, la contribution des racines de *F. albida* s'étend jusque 5-6 m de profondeur, puisque des racines d'arbre ont été identifiées en grande quantité au niveau du front de la nappe. Concernant le site français, la contribution des litières racinaires aux stocks de carbone pourrait s'intensifier dans les années à venir avec le développement du système racinaire de la bande enherbée et surtout du robinier.

En conclusion, l'hétérogénéité spatiale des systèmes racinaires sur les parcelles agroforestières varie fortement selon le type d'agroforesterie et concerne à la fois : les distributions dans le profil de sol, biomasses et propriétés des racines. Cette hétérogénéité des systèmes racinaires, ainsi que des conditions pédoclimatiques, selon les axes verticaux et horizontaux des systèmes agroforestiers laissent croire que la décomposition des litières racinaires est également hétérogène selon l'espèce, la position et la profondeur. Le chapitre suivant vise à étudier l'importance de ces trois facteurs sur la décomposition racinaire (Articles 3 et 4 dans le Chapitre IV). De plus, la relation négative entre les stocks de carbone du sol et les entrées de carbone racinaire dans les sols profonds de DIAMS (résultat de l'Article 2) suggère la possibilité d'un mécanisme de *priming effect* en profondeur. Cette hypothèse est appuyée par l'analyse enzymatique éco-stœchiométrique qui montre des besoins importants en nutriments (relativement au carbone) en profondeur par rapport à la surface. Ainsi, l'Article 5 dans le chapitre suivant a pour objectif d'analyser la réponse microbienne à l'apport de carbone et/ou nutriments sur des sols issus de différents horizons.

¹ Ces chiffres seront évalués à nouveau dans la discussion, en fonction des résultats de l'Article 4.

CHAPITRE IV

CINÉTIQUES DE DÉCOMPOSITION RACINAIRE ET IMPACT SUR
L'ACTIVITÉ MICROBIENNE ET LE CARBONE DU SOL

Rappel des objectifs

Dans le chapitre précédent, des entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires ont été quantifiées sur chacun des sites agroforestiers étudiés. Ces entrées représentent la totalité de la litière racinaire en tant que matière organique fraîche entrante dans le sol. La décomposition de ces litières par les organismes du sol est le processus d'entrée dans le compartiment sol. La cinétique de décomposition des litières racinaires est un indicateur de l'activité des décomposeurs, de la voie et de la vitesse de stabilisation du carbone (*cf.* Chapitre I – Synthèse bibliographique). Ce chapitre a pour objectifs de mesurer des cinétiques de décomposition racinaire *in situ* en fonction de la profondeur en système agroforestier et d'étudier leurs effets sur l'activité microbienne et sur le carbone de la matière organique du sol. Pour y répondre, une étude par hypothèse a été réalisée.

H-2.1. En plus de varier avec la profondeur dû à la pédologie, les conditions bio-physico-chimiques des sols des systèmes agroforestiers ont la spécificité de varier avec la distance à l'arbre. Par conséquent, la décomposition des litières racinaires serait plus lente en profondeur qu'en surface, et plus lente loin de l'arbre que sous l'arbre.

Sur le site *Faidherbia-Flux*, des *litterbags* de litières racinaires d'arbre et de 2 espèces cultivées ont été enfouis à 4 profondeurs (20, 40, 90 et 180 cm) et 2 distances à l'arbre (sous le houppier et à +30m du tronc de l'arbre) ($n = 3$, Fig. IV-1). Plusieurs dates d'échantillonnage ont permis de suivre la perte de masse au cours du temps à chaque profondeur et chaque position, et de relier ces résultats à l'humidité du sol et à la qualité initiale des litières racinaires.

Le travail expérimental de cette étude a été pensé et réalisé avant mon arrivée en thèse par Isabelle Bertrand, Maxime Duthoit et Christophe Jourdan dans le cadre du projet DSCATT. Dès le début de ma thèse, j'ai pris connaissance du jeu de données et j'ai profité du confinement pour l'analyser et rédiger l'Article 3 publié dans *Journal of Arid Environments* le 12/12/2021.

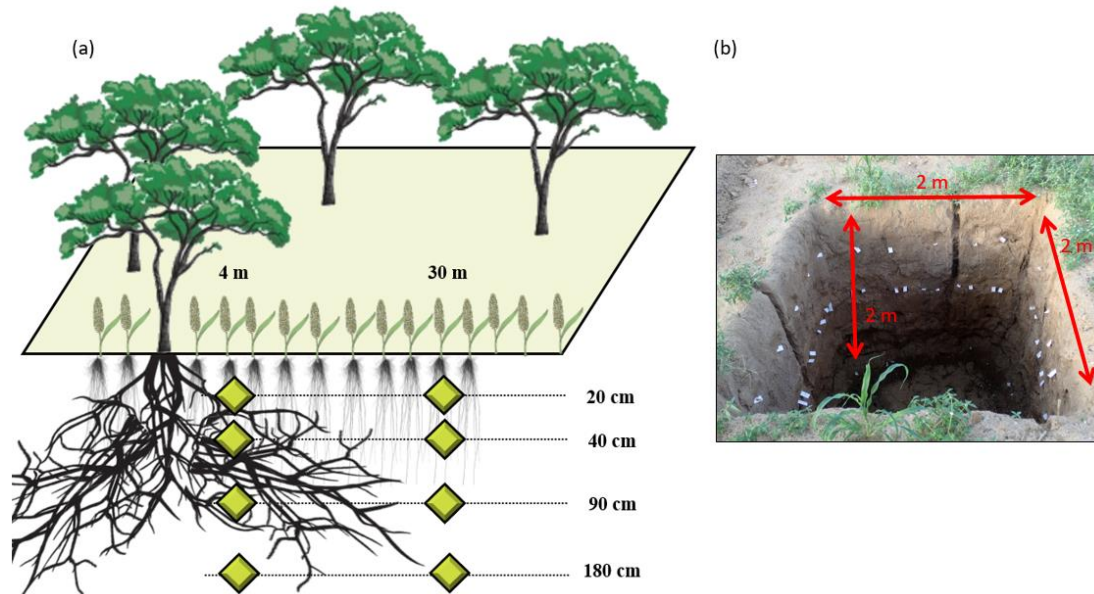


Fig. IV-1 Schéma récapitulatif du dispositif expérimental mis en place sur le site Faidherbia-Flux (a) et photographie d'une fosse contenant les *litterbags* (b) pour répondre à la question 2 traitée dans le chapitre IV. Les losanges représentent les points d'échantillonnages ou de mesures.

Pour étudier la décomposition des racines, la méthode la plus commune est celle des *litterbags*. Dans cette thèse, une méthode innovante du suivi de la décomposition racinaire *in situ* a été testée par observation d'images acquises par des scanners enfouis dans le sol, avec l'hypothèse ci-dessous :

H-2.2. Le suivi de la décomposition racinaire reste un challenge avec la méthode des *litterbags*. Un système d'imagerie enterré permettrait d'appréhender la décomposition *in situ* soit dans la rhizosphère sans remaniement du sol, en présence des microorganismes et de la faune autochtone et sans manipulation des racines (lavage, tri, mise en sachet etc...).

Sur le site DIAMS, le précédent chapitre a mis en lumière le manque de différenciation des propriétés physico-chimiques et pédoclimatiques du sol dans un axe horizontal perpendiculaire à la ligne d'arbre, contrairement à ce qui est observé dans les systèmes agroforestiers plus anciens d'après le Chapitre 2 – Synthèse bibliographique. Le suivi de la décomposition des racines a donc été réalisé uniquement dans la position loin de l'arbre, pour se concentrer sur l'effet de la profondeur (Fig. IV-2a). Les scanners ont été enfouis à 3 profondeurs (20, 50 et 90 cm) en début d'année 2021 (Fig. IV-2b). Des images ont été acquises régulièrement (environ une fois toutes les 2 semaines) depuis le semis de l'orge jusque plus d'1 an après la récolte. Des mesures de diamètres et de longueurs racinaires ont permis de suivre la perte du volume racinaire à travers la décomposition par les microorganismes et par la micro-, méso- et macrofaune. En parallèle, une méthode classique des *litterbags* a été réalisée en surface pour comparer les deux méthodes (Fig. IV-2c).

L'Article 4 correspond à cette étude. Il est encore en révisions avant soumission.

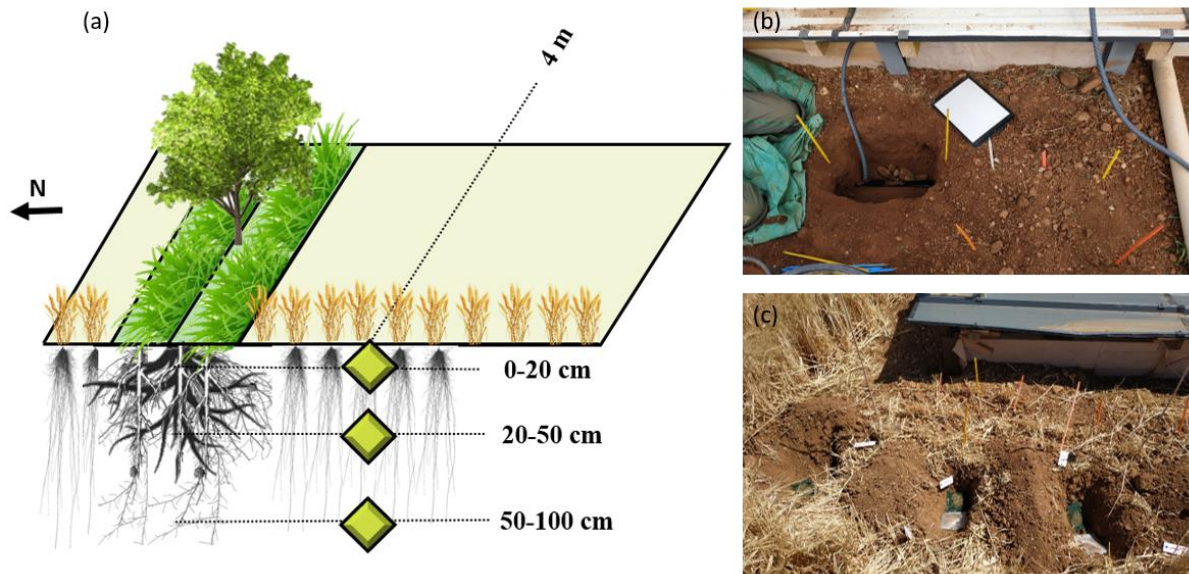


Fig. IV-2 Schéma récapitulatif du dispositif expérimental mis en place sur le site DIAMS (a) et photographies d'installations de scanner (b) et de *litterbags* pour répondre à la question 2 traitée dans le chapitre IV. Les losanges représentent les points d'échantillonnages ou de mesures.

Enfin, en réponse aux interrogations soulevées dans le chapitre précédent, une autre étude a été réalisée sur le site DIAMS pour tester l'effet de la profondeur sur la réponse microbienne à l'apport de carbone en fonction de la disponibilité en nutriments.

H-2.3. La stœchiométrie des éléments carbone, azote et phosphore contrôle la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche dans le sol. Dans les horizons profonds d'enracinement, la limitation en nutriments serait responsable d'un *priming effect* plus important qu'en surface. Nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'intensité du *priming effect* est réduite si la limitation en nutriments est levée dans les horizons de sol profonds.

Pour cela, des sols issus de 3 profondeurs (0-20, 20-50 et 50-100 cm), sur le même plan expérimental que la Fig. IV-2a, ont été échantillonnés sur DIAMS et incubés en laboratoire sous conditions contrôlées (Fig. IV-3). Du glucose marqué ^{13}C a été apporté à J0, avec ou sans nutriments additionnels (azote et phosphore). Au cours des 28 jours suivant l'apport de carbone et de nutriments, plusieurs variables ont été mesurées (biomasse microbienne, activité enzymatique, émission de CO_2 , teneur en nutriments dans le sol etc...) permettant de calculer des indicateurs tels que la *carbon use efficiency* et le *priming effect*.

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis à *Geoderma*. Il est référencé comme l'Article 5 dans ce document.



Fig. IV-3 Photographie de l'ensemble des sols incubés en conditions contrôlées pour répondre à la question 2 traitée dans le chapitre IV.

Article 3

Root litter decomposition in a sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *Faidherbia albida*

Siegwart Lorène¹, Bertrand Isabelle¹, Roupsard Olivier^{1,2,3}, Duthoit Maxime^{1,2}, Jourdan Christophe^{1,2}

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, InstitutAgro Montpellier, Montpellier, France

² CIRAD, UMR Eco&Sols, F-34398 Montpellier, France

³ LMI IESOL, 18524 Dakar, Senegal



Abstract

In agroforestry systems, fine roots grow at several depths due to the mixture of trees and annual crops. The decomposition of fine roots contributes to soil organic carbon stocks and may impact soil fertility, particularly in poor soils, such as those encountered in sub-Saharan regions. The aim of our study was to measure the decomposition rate of root litter from annual and perennial species according to soil depth and location under or far from trees in a sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *Faidherbia albida*.

Soil characteristics under and far from the trees were analysed from topsoil to 200 cm depth. *Faidherbia* tree, pearl millet and cowpea root litter samples were buried in litterbags for 15 months at 20, 40, 90 and 180 cm depths and soil moisture was monitored across the soil profiles.

Root litter decomposition was mainly impacted by soil moisture and thus soil depth, with the main differences among plant species and depths observed during the first 1.5 months of decomposition. Due to their chemical recalcitrance (high lignin and low soluble contents), *Faidherbia* decomposed more slowly ($36 \pm 12\%$ remaining mass in the litterbags after 15 months of decomposition) than cowpea and pearl millet roots ($23 \pm 7\%$ and $29 \pm 11\%$ respectively), while both annual plants exhibiting significantly (p -value < 0.05) lower rates of decomposition at depth than in the surface soil layer. The decomposition rate of *Faidherbia* fine root litter was not significantly different between the topsoil (20 cm) and the deep soil horizon (180 cm). However, because its root C biomass was higher at depth, *Faidherbia* fine root litter increased the amount of root C inputs by 7-fold at 100 – 200 cm compared with that at 0 – 40 cm.

Pearl millet aboveground biomass, at harvesting time, was twice as high under (992 g m^{-2}) than far (433 g m^{-2}) from the tree, and belowground biomass (0 - 200 cm of depth) was 30.9 g m^{-2} and 19.6 g m^{-2} under and far from the tree, respectively. Both *Faidherbia* fine roots and millet aerial biomass contributed slightly (p -value < 0.1) to higher stocks of C under the tree ($7761 \pm 346 \text{ g m}^{-2}$) than far from it ($5425 \pm 558 \text{ g m}^{-2}$) and from 0 cm down to 200 cm depth. Due to their slow root decomposition rates at depth and the increase in crop production in their vicinity, *Faidherbia* trees play a crucial role in increasing belowground carbon storage in semiarid Sahelian parklands.

1. Introduction

In the current context of global warming, soil carbon (C) sequestration can contribute to mitigating the greenhouse effect (Nair et al. 2009a; Nair et al. 2009b; Chenu et al. 2019). In the tropics, C sequestration can more specifically contribute to the improvement of food security and to climate change adaptation (Paustian et al. 2016). Tropical soils are characterized by lower nutrient contents (Feller and Beare 1997) and more rapid C turnover than those in temperate systems (Six et al. 2002). A recent synthesis based on 48 studies performed on tropical soils from 13 countries demonstrated that the main determinants of soil organic carbon (SOC) accumulation were C inputs, duration of the experiments and management practices (Fujisaki et al. 2018). However, this synthesis did not consider agroforestry practices due to the lack of references, although agroforestry is assumed to enhance C storage in soils (Smith et al. 2014). Increasing soil C sequestration is a current challenge in highly weathered tropical soils with low C contents, and agroforestry practices may contribute to overcoming this challenge.

In agroforestry systems, the diversity of the plant species and new ecological niches for biodiversity (Leakey 1996) lead to an enrichment of aerial, root and microbial biomasses (Nair et al. 2009b; Lagerlöf et al. 2014) with a trade-off between soil fertility improvement and competition for growth resources (Rao et al. 1997). C inputs in agroforestry systems are mostly related to the decomposition of aboveground biomass (tree litterfall and crop residues) and belowground biomass originating from tree and crop root turnover and/or mortality and rhizodeposition (Kuzyakov and Domanski 2000). Cardinael (2015) estimated that tree and crop fine roots each contribute 30% to organic matter input in agroforestry systems. Fine roots are generally more recalcitrant than aerial aboveground biomass to soil microbial decomposition (Rasse et al. 2005; Bertrand et al. 2006; Freschet et al. 2013), and they have the potential to increase soil C stocks. While several studies have demonstrated the chemical characteristics responsible for slow root decomposition rates (Machinet et al. 2009; Cotrufo et al. 2013; Prieto et al. 2016), the impact of soil depth has been less studied, although roots occur at different depths in the soil profile. This is particularly true for agroforestry systems where tree, herbaceous and crop roots colonize different soil layers, especially at depth (Cardinael et al. 2015; Germon et al. 2016; Battie-Laclau et al. 2020).

Root litter decomposition depends not only on litter quality but also on pedoclimatic conditions (Makkonen et al. 2012) and soil microbial communities and activity (Herman et al. 2012). These biotic and abiotic soil characteristics are strongly impacted by the introduction of trees in arable lands. The introduction of trees causes spatial heterogeneity in soil temperature and humidity (Monteith et al. 1991; Rao et al. 1997; Lin 2007) as well as soil microbial biomass abundance and composition (Chander et al. 1998; Liu et al. 2019, Guillot et al. 2021) and soil C stocks (Cardinael 2015). In a recent study performed in the same area as our study site, Rouspard et al. (2020) demonstrated that the whole pearl millet plant dry mass was 2.2 times higher under the *Faidherbia* tree crown than far from the tree. As a consequence,

biomass inputs may be more important near trees, which could induce a modification of the soil chemical and physical properties. While the impact of trees on crop yield, climatic conditions and soil C stocks at a local scale was previously investigated in shallow soil horizons (Oelbermann et al. 2004; Oelbermann and Voroney 2007; Lin 2007; Roupsard et al. 2020), to our knowledge, no studies have investigated the impact of trees on deep soil characteristics or on tree and crop root decomposition.

Soil properties may vary with soil depth given that the total organic C content and microbial biomass decrease with depth (Hicks Pries et al. 2018). Soil temperature and moisture tend to be less subject to variations in deeper soil layers than in topsoil. Hicks Pries et al. (2018) showed that slower root decomposition could be responsible for higher stable C stocks at soil depth. A recent meta-analysis by Balesdent et al. (2018) performed on 112 grassland, forest and cropland sites demonstrated that the subsoil (30-100 cm depth) stored 47% of the C in the first metre of the soil profile. This deep C storage despite a lower litter input is related to root mortality and rhizodeposition and to the reduced decomposition rates at depth (Guenet et al. 2013). Data are lacking on root litter dynamics and C stocks in deep soil horizons, especially for tropical areas.

The aim of our study was thus to measure soil characteristics, including soil C stocks and the root decomposition rate, according to soil depth in a sub-Saharan agroforestry park dominated by *Faidherbia albida* trees and to account for the tree effect.

We hypothesized that (i) soil fertility, indicated by the C and nutrient contents, would be higher in the topsoil than in deeper soil layers and under trees than far from the trees due to the presence of leguminous tree species; (ii) the root litter decomposition rate would mainly depend on the plant species (i.e., root tissue quality), roots would decompose faster under trees and (iii) root litter would decompose more slowly in deep soil layers than in topsoil because of the stable pedoclimatic conditions.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The “Faidherbia-Flux” collaborative observatory for greenhouse gas balance and ecosystem services (<https://lped.info/wikiObsSN/?Faidherbia-Flux>) is located in the natural agro-silvo-pastoral parkland of Sob (14°29'45N, 16°27'13W), 135 km East of Dakar, on the Bambey-Fatick transect, West Senegal, (Roupsard et al. 2020). The climate is sub-Saharan, with an average annual rainfall of 500 mm (Lalou et al. 2019) and an average temperature of 29.6°C (Ndiaye et al. 2001). The soil temperature (°C) was measured with thermocouples buried at 0, 2, 5, 15, 30, 60, 100, 150 and 200 cm. The soil volumetric water content ($\text{m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^3_{\text{soil}}$) was measured with TDR (time domain reflectometry) moisture sensors buried at 15, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175 and 200 cm in an open area of the plot (far from the trees and close to the weather station). The rainfall was measured on site with an automatic tipping bucket (Texas Electronics, model TE525 mm). Data were recorded every 30 minutes over the entire study

period. The average daily temperature and soil moisture and sum of rainfall were calculated (Fig. IV-4). The soil is a sandy tropical ferralitic soil (Maignien 1965); it is classified as an Arenosol (IUSS Working group WRB 2014). The water table is located at approximately 5-6 m depending on the season.

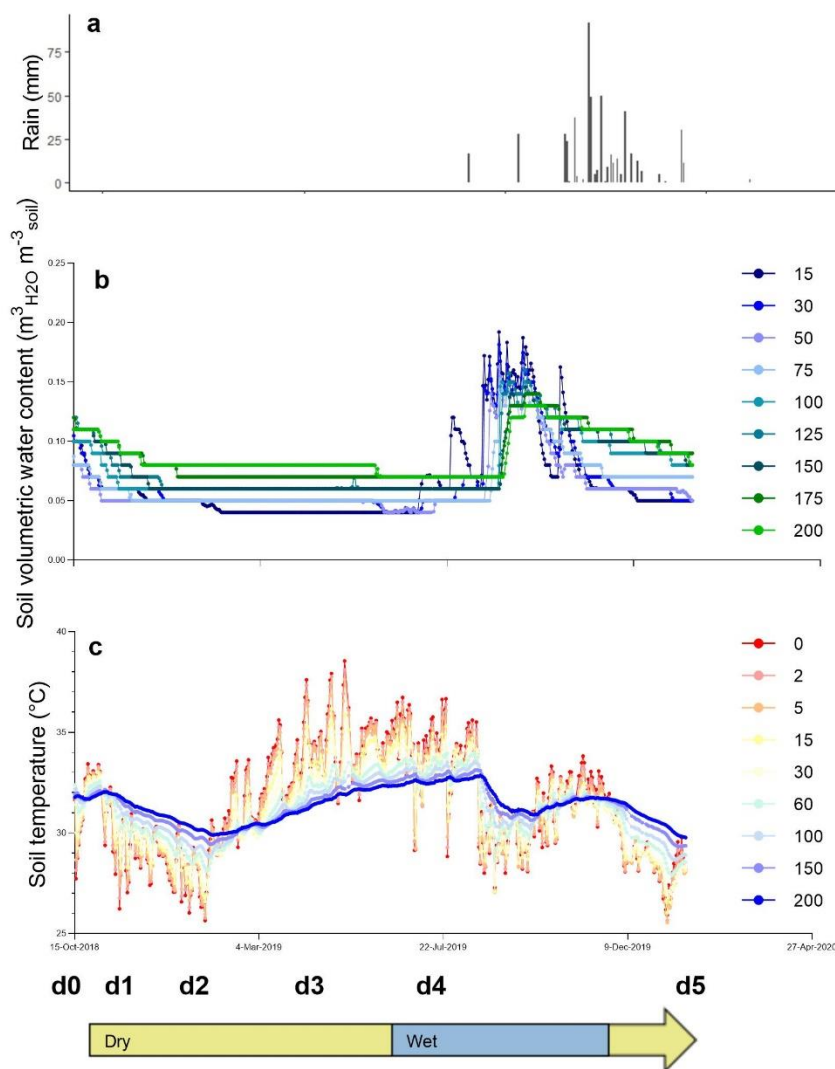


Fig. IV-4 Dynamics of rainfall (a), volumetric soil water content (b) and soil temperature (c) over time according to soil depth (from the topsoil to 200 cm deep) from the beginning (d0:– 10/15/18) to the end of the experiment (d5: 01/22/20). On the x-axis, d0 to d5 correspond to the sampling dates after 1.5 (d1), 3 (d2), 6 (d3), 9 (d4) and 15 (d5) months of decomposition. Data are presented as daily averages. The wet season is represented in blue, and the dry season is represented in yellow.

The studied agroforestry system was composed mainly of *Faidherbia albida* trees (85% occurrence), with a density of 6.8 trees/ha, which represents an average canopy cover of 5.14% measured over an area of 15 ha (Roupsard et al. 2020; Rahimi et al. 2021). *Faidherbia* trees were associated with groundnut (*Arachis hypogaea*) or pearl millet (*Pennisetum glaucum*) according to annual rotations. In June 2018, pearl millet was manually sown in the studied plot at a distance of 80 cm between each sowing pocket. Cowpea (*Vigna unguiculata*) was sown at the same time in a neighbouring plot with the same soil type and climatic conditions. There was no amendment applied to these plots, and harvesting was conducted in October 2018.

2.2. Above- and belowground biomass sampling

The biomass sampling campaign was conducted in October 2018, immediately before the pearl millet crop harvest. According to the large volume of soil to excavate and sieve (each pit was 8 m³), only 2 pits could be prepared, one under and one far from a tree. We sampled 3 walls in each pit, thereby assuming independence of the results. The pit under the tree was chosen under a *Faidherbia* individual representative of the tree population (Diatta 2021), with a height of 13.5 m and a circumference at breast height of 2.84 m.

The aboveground parts of pearl millet were collected in two subplots, each measuring 2 m × 2 m. One subplot was located under the selected *Faidherbia* tree crown (1.5 m from the trunk, crown radius of 5 m), whereas the second subplot was located far from any tree and at a minimum distance of 30 m from the first subplot. The subplots used for biomass quantification were at the same location as the pits. Each subplot included four pearl millet pockets. The vegetative biomass was split into ears, stems, leaves and stumps. All samples were oven-dried for 48 hours at 65°C before weighing.

After the aboveground biomass was sampled, two pits of 2 m × 2 m × 2 m were dug at the same locations. For each pit, roots were sorted by manually sieving the soil at 2 mm from a total soil volume of 8 m³ and split according to the plant species (pearl millet and *Faidherbia* tree) and the corresponding soil layer (0 – 40 cm, 40 – 100 cm, 100 – 150 cm and 150 – 200 cm). Given the small quantity of pearl millet roots found at great depth, the root biomasses of pearl millet in soil layers 100 – 150 and 150 – 200 cm were summed for each profile. Then, *Faidherbia* roots were sorted manually, and their diameter (*D*) was measured with a digital calliper to separate fine roots (*D* < 2 mm) from medium roots (10 mm > *D* ≥ 2 mm). All samples were washed on a 0.5 mm sieve and oven-dried for 48 hours at 65°C before weighing. The belowground biomass was assessed for 2 subplots × 2 plant species × 4 soil layers (× 2 root diameter categories for *Faidherbia*) after correction for the ash content. To this end, a subsample of 1 g of the washed root sample was burned at 500°C for 4 hours to remove organic matter, and the remaining mineral ash was weighed and deducted from the dry root mass.

Supplementary roots were collected between 0 and 40 cm depth in the neighbouring plot planted with cowpea and prepared as described above for millet and *Faidherbia* roots.

2.3. Litterbag experiment

We performed a 464-day root litter decomposition experiment with fine roots of *Faidherbia* tree, cowpea and pearl millet. A subsample of 1.5 g root litter was inserted in 10 × 20 cm nylon mesh screens of 1 mm (Diatex), hereafter referred to as root litterbags. The mesh size of 1 mm allowed all decomposer communities, including small invertebrates, to penetrate the nylon mesh and establish themselves on the decomposing roots (Handa et al. 2014). On October 15th, 2018, corresponding to the harvest period, three litterbag replicates per plant species (*Faidherbia* tree, pearl millet or cowpea) were buried at four

soil depths (20, 40, 90 and 180 cm) on 3 different walls (east, north and west walls) in each subplot (located under and far from the tree). The litterbags were buried at approximately 50 cm perpendicular to the pit walls to prevent desiccation or temperature fluctuations as much as possible. Each hole made to insert the litterbags perpendicular to the pit wall was filled with soil from the same hole. . Each litterbag was replicated five times to allow five sampling campaigns (d1 to d5), which were scheduled after 1.5, 3, 6, 9 and 15 months of root decomposition. The first months of decomposition corresponded to the dry season (d1 to d3), while the wet season started immediately before the fourth litterbag sampling (see Fig. IV-4). The last sampling occurred during the next dry season (d5).

In total, 3 plant species × 2 locations (subplots) × 4 soil depths × 3 pit walls × 5 sampling dates = 360 litterbags were buried. However, due to a shortage in the initial sampling of root biomass encountered in the pits, cowpea and Faidherbia litter samples were not buried at 40 and 90 cm and thus were not collected on all dates (see Fig. IV-5).

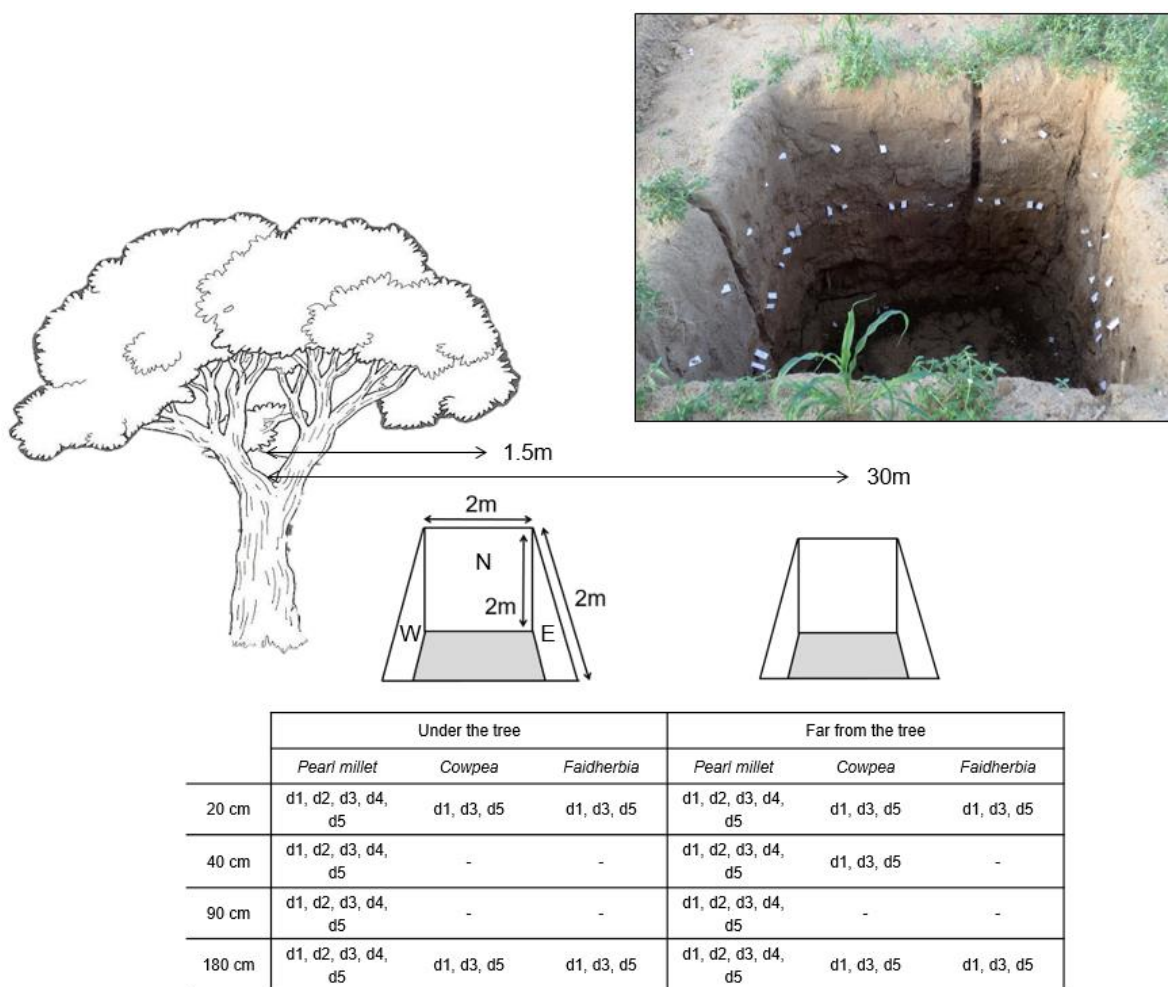


Fig. IV-5 Sampling strategy in the two pits (far from and under the tree), for each root litter type (pearl millet, cowpea and Faidherbia), at four depths (20, 40, 90 and 180 cm) and for five sampling dates (after 1.5 (d1), 3 (d2), 6 (d3), 9 (d4) and 15 (d5) months). Each litterbag was replicated on three pit walls (northern (N), eastern (E) and western (W) soil profiles). Missing treatments are due to root sample shortages.

After litterbag collection, the remaining root litter was carefully retrieved, and the soil adhering to the decomposed roots was carefully removed by shaking by hand before being oven-dried for 48 hours at 65°C. Ash corrections were made on a subsample to remove soil particle contamination as previously described. The relative humidity of the soil around the litterbags was measured from the oven-dried soil samples. The remaining dry mass in each litterbag was calculated as

$$RDM = \frac{M_f}{M_i} \times 100$$

where RDM is the remaining dry mass (%), M_i is the initial litter dry mass (g) and M_f is the final litter dry mass (g).

The remaining root dry mass according to a time axis for each species at each location and each soil depth gave the decomposition kinetics, where the Y intercept was named d_0 . The time axis was expressed on standardized days depending on the soil temperature at each soil depth. The time was normalized by temperature using the method published by Mary et al. (1999) at a reference temperature of 25°C, arbitrarily chosen as commonly used by Balesdent and Recous (1997):

$$D_{corr25} = \frac{D_{meas}}{e^{-K \times (T - T_{ref})}}$$

where D_{corr25} (days) is the time normalized at T_{ref} , T_{ref} (°C) is the reference temperature (25°C), D_{meas} is the measured time (days), T (°C) is the average soil temperature of each day, and K is the thermal coefficient ($K = 0.115$ for kinetics of SOC decomposition at 25°C (Balesdent and Recous 1997)). Then, for each root species at each location and each soil depth, the decomposition kinetics were determined by a regression between the remaining dry mass and standardized time. To better fit our data, two linear regressions were applied for individual decomposition kinetics: the first regression with a k_1 coefficient was based on the first sampling date (from d_0 to d_1), and the second regression had a k_2 coefficient (from d_1 to d_5). Two linear regressions \times 3 root species \times 2 locations \times 4 soil depths = 48 coefficients were obtained. Regressions with an R-squared value lower than 50% were removed from the dataset.

2.4. Initial litter quality

Initial root chemical qualities were determined for the three plant species (pearl millet, cowpea and *Faidherbia* tree). C fractions (soluble compounds, cellulose, hemicellulose and lignin) were assessed with a fibre analyser (Fibretherm®, Gerhardt) on a 500 mg root litter subsample following the Van Soest protocol (Goering and Van Soest 1970). Root C and N elemental composition was determined with an automatic elemental analyser (Flash 2000, ThermoFisher Scientific) on 3 mg subsamples of root litter. For the total root P content, 50 mg of litter powder was mixed with 65% HNO₃ and mineralized for 15 min at 200°C in a Milestone Ethos Easy microwave under standard and blank conditions. The total P

content was quantified colorimetrically with the yellow vanadomolybdate assay (Koenig and Johnson 1942).

The proportion of C originating from roots and remaining in the soil after 15 months of decomposition was calculated for 2 species (pearl millet and *Faidherbia* fine roots) at both locations (under and far from the tree) and at 3 depths (0 – 40, 40 – 100 and 100 – 200 cm, which matched the root biomass sampling and litterbag experimental setup) by multiplying the root carbon content (%) and the remaining mass at d5 (%). Decomposition data were missing at 90 cm depth for *Faidherbia*, and an average proportion of C at 20 and 180 cm was thus used. Then, this calculated proportion was multiplied by the living root carbon stocks (gC m^{-3}) to give the amount of remaining C originating from roots and remaining in the soil after 15 months of decomposition for each species and at each depth. For pearl millet as an annual crop, the totality of the root carbon entered the soil at each harvest and thus at each year. For *Faidherbia* as a perennial tree, we considered that 0.56% of the root carbon was entering the soil each year according to the acacia root turnover (Jha and Prasad Mohapatra 2010). This calculation was not performed for cowpea because the root biomass in the soil profile was only assessed for pearl millet and for *Faidherbia*.

2.5. Soil sampling and analyses

The soil sampling campaign was conducted in late October 2018 immediately after the pits were dug. In each pit (under and far from the tree), in three out of four faces (taken as replicates), soil samples were collected at different depths (0 – 10 cm, 10 – 20 cm, 20 – 40 cm, 40 – 70 cm, 70 – 100 cm, 100 – 130 cm, 130 – 160 cm, 160 – 200 cm). The soil sampling was more detailed than the experimental design of the litterbags to obtain a precise characterization of the soil profile. Soil was sampled where the litterbags were buried. Each sample was analysed by the LAMA laboratory (IRD-US Imago, Dakar, Senegal) for total soil C and N contents by dry combustion (Matejovic 1997). The mineral C content was assumed to be insignificant, and the measured total soil C was thus associated with soil organic C. Soil pH was measured in a 1:2.5 soil-water suspension. Available phosphorus was determined according to the Olsen method and was measured by the malachite green method (Ohno and Zibilske 1991). Soil mineral N was extracted with a 1:4 soil-1 M KCl solution, NO_3 and NH_4 were determined by continuous flow colorimetry (SKALARSA 3000 flow analyser), and the sum of NO_3 and NH_4 represented the mineral soil N content. Soil texture was determined based on five fractions (clay, silt (fine + coarse), sand (fine + coarse)).

The soil bulk density was assessed according to the cylinder method (Blake and Hartge 1986) in each pit (under and far from the tree) on two out of four faces (as replicates) at ten soil depths (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 and 180 cm).

SOC stocks were calculated at each location (under and far from the tree) and each soil depth following the 'M1' method described by Poeplau et al. (2017) as follows:

$$C_{stock_{i,j}} = BD_{mean} \times C_{tot} \times w$$

where $C_{stock_{i,j}}$ is the soil C stock at location j in soil layer i ($g\ m^{-2}$), w is the width of soil layer i (m), BD_{mean} is the mean bulk density of soil layer i ($g\ m^{-3}$) and C_{tot} is the amount of total soil C measured in soil layer i at location j ($g\ g^{-1}$ soil). To compare the surface soil layers with the deep layers while the compaction was different due to ploughing of the topsoil layers, we also calculated the C stock at an equivalent soil mass following the method presented by Ellert and Bettany (1995).

The total SOC stock in the whole soil profile was calculated for each location as the sum of the SOC stock in each layer.

2.6. Statistical analyses

For each measurement, data are presented as the mean values \pm standard deviation of 3 replicates. Whenever the location (far from and under the tree) had no significant effect according to the methods described below, the average value of 6 replicates was calculated instead. All statistical analyses were processed with R Software (version 4.0.2) (R Core Team 2020).

To analyse the effect of depth and location on soil characteristics, linear mixed models were applied to each soil variable, with soil depth and location as fixed factors and the 3 replicated profiles as random factors. Data from the same soil profile were considered dependent on each other. Post hoc Tukey tests allowed us to determine the significance of the differences between each category of soil depth and location. C stocks in both locations were compared for each soil layer with Wilcoxon rank sum tests, as required for comparisons between 2 populations with 3 individuals each.

The initial difference in the quality of the root litter from the three plant species was analysed with one-way analysis of variance for each variable (soluble fraction, hemicellulose, cellulose, lignin, total C, total N, and total P contents and C:N). To analyse the variations in the humidity of the soil in contact with the litterbags, a linear mixed model was applied to the relative humidity, with location, soil depth, plant root species and sampling date as fixed factors and the 3 replicated profiles as random factors. To analyse the effect of location, soil depth and plant species on root litter decomposition, linear mixed models were applied to the remaining litter dry mass on each sampling date and to the k_1 and k_2 decomposition rates, with soil depth, location and plant species as fixed factors and the 3 replicated profiles as random factors.

To analyse the carbon inputs from the roots, linear mixed models were applied to the soil C stocks, to the tree living fine root C stocks, to the pearl millet living root C stocks and to the remaining C in the soil after 15 months of decomposition (all data in $gC\ m^{-3}$), with location, soil depth and plant root species as fixed factors and the 3 replicated profiles as random factors. For all the linear mixed models and analyses of variance, *lme4* and *car* packages were used. The normality of the residues was always verified with a Shapiro-Wilk test, and the homogeneity of the variances was verified with a Bartlett test.

When necessary (p -values $< 5\%$), Box-Cox (*boxcox*) or Yeo Johnson (*jtrans*) transformations were applied.

A simple ordination of all the variables was conducted for a principal component analysis with the “*vegan*” and “*factoextra*” packages. Among the soil depths that were analysed for the initial soil characterization, only 4 depths were selected for this analysis (10 – 20, 20 – 40, 70 – 100 and 100 – 130 cm) to match the experimental design of the litterbags. Wilk’s tests allowed the identification of qualitative variables (location, depth and plant species) that significantly separated the individuals with the “*FactoInvestigate*” package.

3. Results

3.1. Effects of depth and location on soil characteristics

The soil texture was globally very sandy, with more than 70% sand in every sample (Fig. IV-6), but the texture was significantly impacted by soil depth (Supplementary Table IV-1), with soils richer in clay and lower in coarse sand in the deeper layers (Fig. IV-6a). Location impacted only fine sand, with a higher content far from the tree (p -value = 1.94×10^{-2}), while an interaction between soil depth and location was observed for the silt content (p -value = 7.63×10^{-5} combined with soil depth).

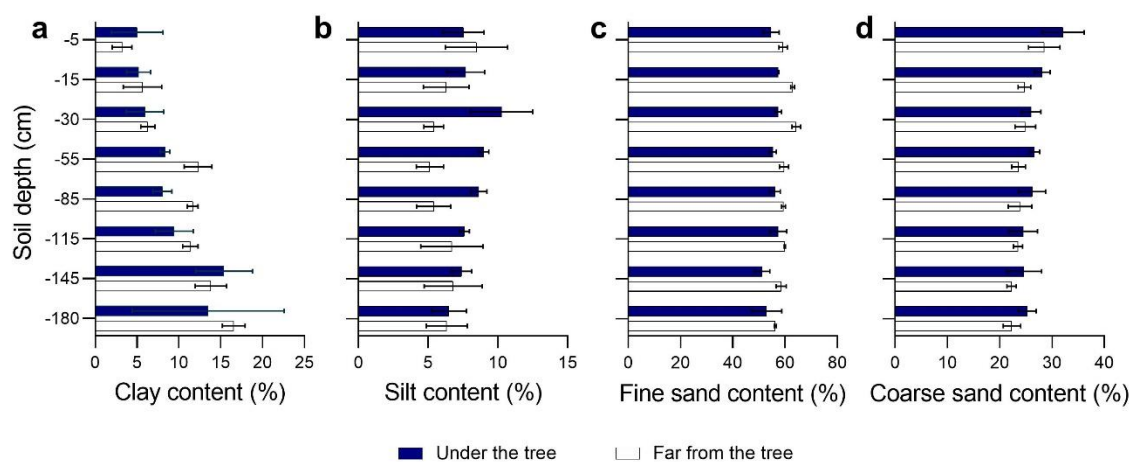


Fig. IV-6 Comparison of soil texture (%) variations in clay (a), silt (b), fine sand (c) and coarse sand (d) in the soil profile from topsoil to a depth of 180 cm in the pits under (dark) and far from the *Faidherbia* tree (white). Data are mean values from 3 pit walls, and error bars represent the standard deviation ($n = 3$).

The total C and N contents were not significantly impacted by location (Supplementary Table IV-1). However, the soil total C and total N contents tended to be higher under the tree than far from the tree (Fig. IV-7a and b). In this poor Arenosol, the total soil C did not exceed 0.45% in the surface layer. At both locations, soil depth strongly affected the total C ($F = 30.17$, p -value = 3.0×10^{-11}) and N contents ($F = 11.30$, p -value = 1.2×10^{-6}) with a strong decrease from a depth of 30 cm. The C:N ratio, soil pH, and soil available phosphorus and mineral N contents were impacted by the interaction of depth and

location, while only the mineral N and C:N ratios were significantly affected by soil depth (Supplementary Table IV-1). In the first 20 cm, the C:N ratios increased from 12.7 to 14.0 far from the tree and then decreased to 8.7 at 180 cm, while under the tree, the C:N ratios increased from 11.0 at the surface to 14.3 at a depth of 1 m (Fig. IV-7c). Soil pH presented values ranging between 6 and 7 in the topsoil. Below 40 cm, soil under the tree presented higher pH values (6.9 ± 0.6 between 40 and 180 cm) than those far from the tree (5.7 ± 0.3) (Fig. IV-7d). As often occurs in tropical soils, available phosphorus was very low (less than 3 mg kg^{-1}) and significantly higher under than that far from the tree ($F = 3.77$, $p\text{-value} = 5.6 \times 10^{-3}$, Supplementary Table IV-1). The available phosphorus decreased with depth to less than 1 mg kg^{-1} at 180 cm for both locations (Fig. IV-7f). Mineral N presented similar patterns, with average values of 5.5 ± 2.8 and $9.4 \pm 3.1 \text{ mg kg}^{-1}$ in the topsoil far from and under the tree and decreasing to 5.0 ± 3.6 and $3.3 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ at 180 cm, respectively (Fig. IV-7e).

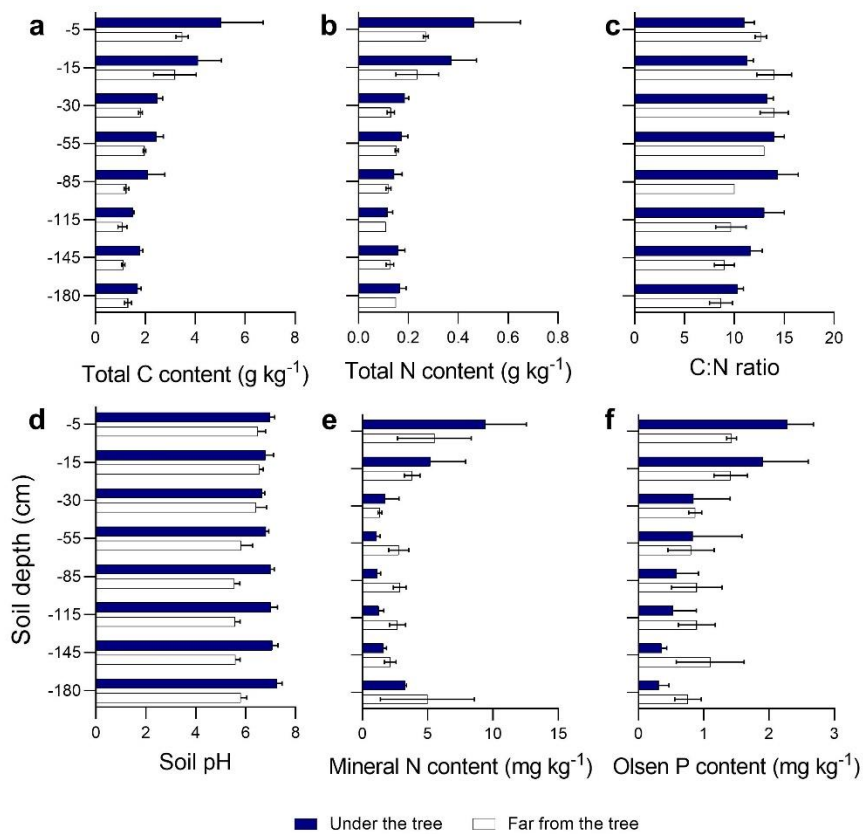


Fig. IV-7 Total C content (a), total N content (b), C:N ratio (c), soil pH (d), mineral N content (e) and available phosphorus content (f) in the soil profile from topsoil to a depth of 180 cm in the pits under (dark) and far from the tree (white). Data are mean values from 3 pit walls, and error bars represent the standard deviation ($n = 3$).

Despite important differences in total C stocks within the whole profile under the tree ($7761 \pm 346 \text{ g m}^{-2}$, $n = 3$) compared to far from the tree ($5425 \pm 558 \text{ g m}^{-2}$, $n = 3$), the samples at each soil depth did not differ significantly between locations under and far from the tree (Table IV-1).

Table IV-1 Total soil carbon stocks (g m^{-2}) of equivalent soil mass according to location (under or far from the tree) at different soil depths down to 200 cm. Data are mean values \pm standard deviation ($n = 3$). Significant differences between both locations for each soil layer were tested with Wilcoxon tests.

Soil depth	Carbon stocks on equivalent soil mass (g m^{-2})		Results of the tests of Wilcoxon	
	Under tree	Far from tree	W	p-value
0 – 10 cm	883 \pm 295	634 \pm 44	6	0.66
10 – 20 cm	712 \pm 164	543 \pm 145	8	0.2
20 – 40 cm	907 \pm 73	634 \pm 25	6	0.2
40 – 70 cm	1272 \pm 147	1064 \pm 30	9	0.1
70 – 100 cm	1083 \pm 353	684 \pm 52	9	0.1
100 – 130 cm	769 \pm 23	536 \pm 88	9	0.1
130 – 160 cm	920 \pm 57	623 \pm 34	9	0.1
160 – 200 cm	1214 \pm 101	919 \pm 97	9	0.1
Total stock	7761 \pm 346	5425 \pm 558	9	0.1

3.2. Above- and belowground biomass

Pearl millet biomass was higher under the tree than far from the tree (Fig. IV-8). The difference was mainly noteworthy for the aboveground parts, resulting in a lower R:S ratio (0.03 compared to 0.05 far from the tree). At both locations, millet roots were concentrated in the first 40 cm depth whereas under the tree, *Faidherbia* fine roots were concentrated below 40 cm depth. Far from the tree, tree roots were rare between 0 and 200 cm depth (Fig. IV-9).

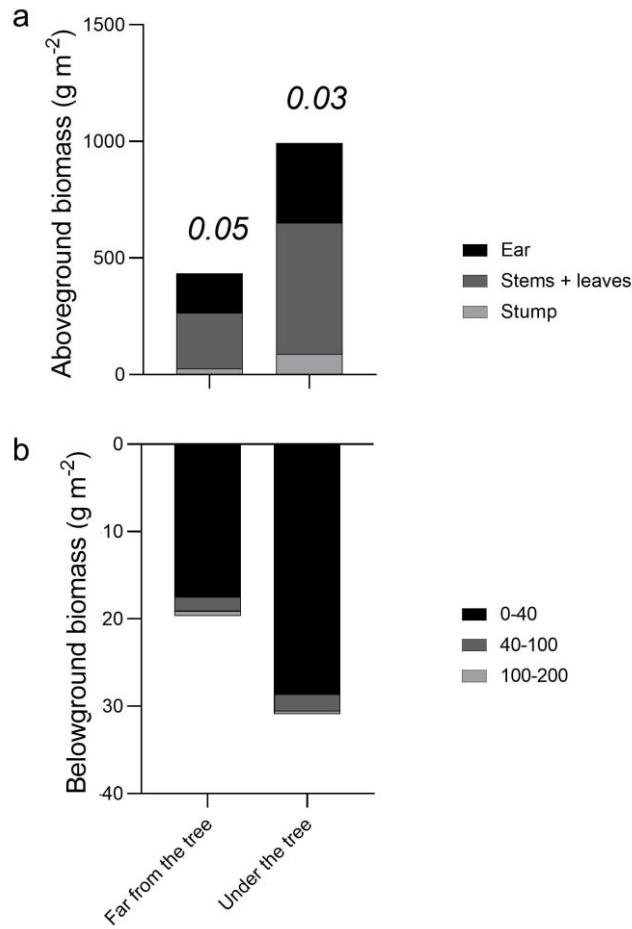


Fig. IV-8 Above- (a) and belowground (b) biomasses of pearl millet under (right) and far (left) from the *Faidherbia* tree according to organs (ears and grains, stems and leaves, stump) and soil depths (0 – 40, 40 – 100 and 100 – 200 cm). For each location, R:S ratios are indicated in italics.

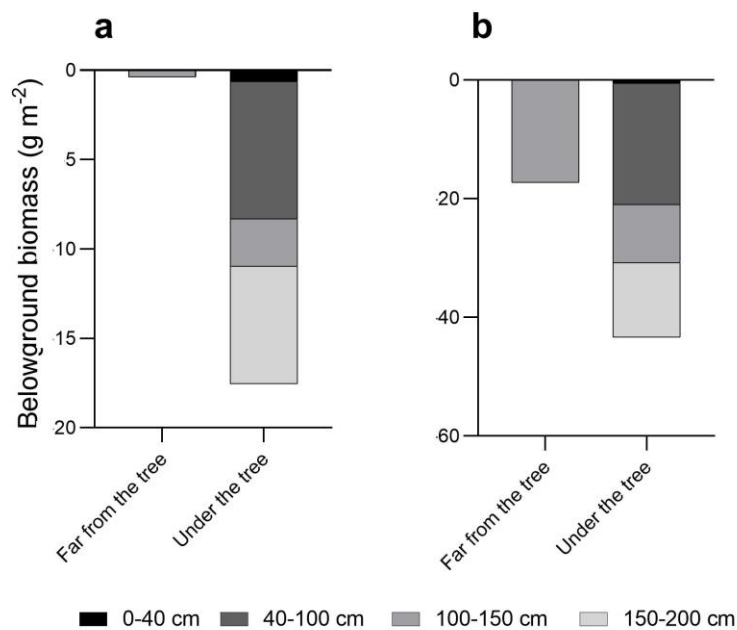


Fig. IV-9 Comparison of fine (a) and medium (b) root biomasses of *Faidherbia* under (right) and far (left) from the tree according to soil depth (0 – 40, 40 – 100, 100 – 150 and 150 – 200 cm).

3.3. Root litter quality, soil moisture and decomposition rates

Faidherbia litter was significantly enriched in lignin compared to cowpea and pearl millet litter (Table IV-2). Pearl millet roots presented a similar amount of lignin as in cowpea, while their soluble fraction was lower. However, the cellulose content was higher in pearl millet than in cowpea, while hemicellulose was not significantly different between the two crops. Large differences in the N content explained the important variations in C:N ratios, which varied from 13.0 for Faidherbia fine roots to 30.2 and 32.5 for cowpea and pearl millet roots, respectively.

Table IV-2 Initial values of biochemical qualities of the fine root litter added to the litterbags. Data are mean values \pm standard deviation ($n = 3$). Significant differences between root litter types were tested with one-way analyses of variance. ***, ** and * indicate the significance of the impact of the studied effects on litter quality with p-values < 0.001 , 0.01 , and 0.05 , respectively. Letters indicate differences between the 3 types of litter.

	Initial values			Statistics	
	Faidherbia	Pearl millet	Cowpea	F-value	p-value
Carbon fractions					
(% DM)					
Soluble fraction	14.5 \pm 2.7 ^a	13.9 \pm 2.2 ^a	27.1 \pm 2.2 ^b	29.3	8.1 $\times 10^{-4}$ ***
Cellulose	19.4 \pm 2.4 ^a	37.9 \pm 2.4 ^b	21.3 \pm 4.4 ^a	29.9	7.6 $\times 10^{-4}$ ***
Hemicellulose	14.2 \pm 1.9 ^a	27.4 \pm 2.2 ^{ab}	34.3 \pm 9.8 ^b	8.9	1.6 $\times 10^{-2}$ *
Lignine	51.9 \pm 4.1 ^b	20.8 \pm 2.1 ^a	17.3 \pm 4.4 ^a	82.6	4.3 $\times 10^{-5}$ ***
Elemental composition					
(% DM)					
C	45.4 \pm 0.1 ^c	40.9 \pm 0.7 ^a	42.9 \pm 0.8 ^b	37.9	4.0 $\times 10^{-4}$ ***
N	3.5 \pm 0.1 ^c	1.3 \pm 0.0 ^a	1.4 \pm 0.0 ^b	1779	4.8 $\times 10^{-9}$ ***
P	0.09 \pm 0.0 ^{ab}	0.07 \pm 0.01 ^a	0.11 \pm 0.01 ^b	12.0	8.0 $\times 10^{-3}$ **
C:N	13.0 \pm 0.3 ^a	32.5 \pm 0.9 ^c	30.2 \pm 0.3 ^b	981	2.8 $\times 10^{-8}$ ***

The relative humidity of the soil in contact with the litterbags significantly increased with soil depth ($F = 337.9$, p-value $< 2.2 \times 10^{-16}$, Table IV-3), and it was higher under the tree than far from the tree ($F = 24.9$, p-value = 7.3×10^{-3} , Table IV-3). The soil humidity was still high on d1 ($9.0 \pm 5.9 \text{ m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-3}_{\text{soil}}$) from the previous wet season and decreased significantly from d1 to d3 ($F = 100.5$, p-value = $< 2.2 \times 10^{-16}$, Table IV-3). The wet season that started immediately before d4 increased the humidity of the soil in contact with the litterbags on d4 and d5.

Table IV-3A Differences in the volumetric humidity ($\text{m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-3}_{\text{soil}}$) of the soil in contact with the litterbags among soil depths (20, 40, 90 and 180 cm), plant species (pearl millet, Faidherbia tree, cowpea), locations (far from and under the tree) and sampling dates (d1 to d5). Data are mean values \pm standard deviation. The different lowercase letters indicate significant differences between the modalities, and ns indicates the absence of a significant effect.

	Soil volumetric humidity ($\text{m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-3}_{\text{soil}}$)				Statistics	
	20	40	90	180	F-value	P-value
Soil depth (cm)						
	0.020 \pm 0.018 ^a	0.027 \pm 0.024 ^b	0.045 \pm 0.036 ^b	0.110 \pm 0.051 ^c	337.9	$< 2.2 \times 10^{-16}$
Root species	Faidherbia	Pearl millet	Cowpea			

	0.060 ± 0.054	0.049 ± 0.046	0.051 ± 0.057			ns
Location	Far	Under				
	0.039 ± 0.036 ^a	0.069 ± 0.061 ^b			103.5	4.4 × 10 ⁻⁴
Sampling date	d1	d2	d3	d4	d5	
	0.090 ± 0.059 ^d	0.058 ± 0.042 ^c	0.026 ± 0.028 ^a	0.042 ± 0.040 ^b	0.051 ± 0.053 ^{bc}	100.5 < 2.2 × 10 ⁻¹⁶

Table IV-3B Differences in the volumetric humidity ($\text{m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-3}_{\text{soil}}$) of the soil in contact with the litterbags between each location (far from and under the tree) on each sampling date (d1 to d5). Data are mean values ± standard deviation. The different lowercase letters indicate significant differences between the modalities, and ns indicates the absence of a significant effect.

d1		d2		d3		d4		d5	
Far	Under	Far	Under	Far	Under	Far	Under	Far	Under
0.069 ± 0.039 ^a	0.113 ± 0.069 ^b	0.043 ± 0.029 ^a	0.070 ± 0.048 ^b	0.018 ± 0.021 ^a	0.035 ± 0.032 ^b	0.030 ± 0.019 ^a	0.051 ± 0.049 ^b	0.032 ± 0.033	0.072 ± 0.063
F = 16.9		F = 12.6		F = 15.2		F = 14.6			
p-value = 1.41 × 10 ⁻²		p-value = 2.22 × 10 ⁻²		p-value = 1.72 × 10 ⁻²		p-value = 1.68 × 10 ⁻²		ns	

Regarding root litter decomposition, no significant effect of location was observed on any date (Supplementary Table IV-2); thus, data were compiled for both locations.

After 15 months of the experiment, neither the crop nor the tree fine roots reached an asymptote; therefore, we described decomposition with 2 slopes k_1 and k_2 (linear fitting) rather than with one extinction coefficient (exponential fitting). After 1.5 months of fine root decomposition, i.e., d1, the root litterbags had lost almost half of their initial dry mass; then, with the dry season, the remaining fine root mass decreased more slowly from d1 to d5 and reached approximately 25% of the initial mass at the end of the experiment (Fig. IV-10). The remaining fine root mass on d2 (pearl millet only) was significantly impacted by depth ($F = 3.8$, $p\text{-value} = 4.8 \times 10^{-2}$), with a lower fine root remaining mass at a depth of 20 cm than at 40 cm and a lower fine root remaining mass at a depth of 90 cm than at 180 cm (Fig. IV-11a). On d5, the remaining mass was significantly higher for *Faidherbia* than for cowpea fine roots ($F = 3.9$, $p\text{-value} = 3.5 \times 10^{-2}$, Fig. IV-11b).

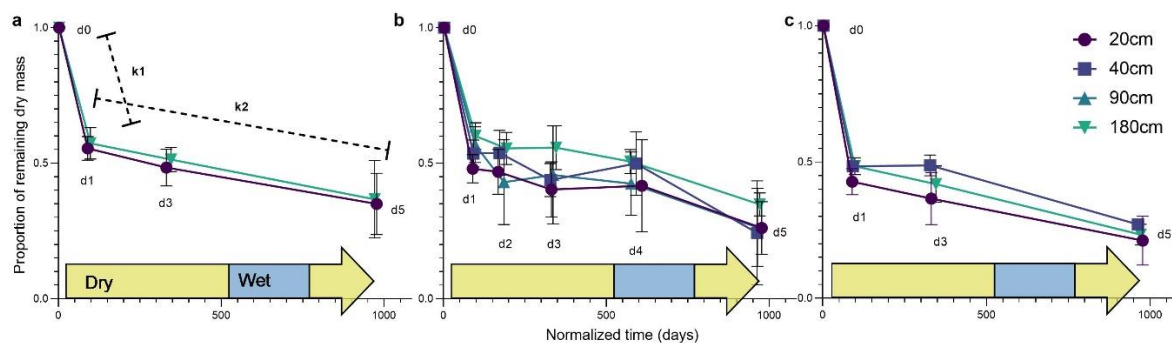


Fig. IV-10 Dynamics of root litter decomposition (after 1.5, 3, 6, 9 and 15 months) for the three plant species (Faidherbia tree (a), pearl millet (b) and cowpea (c)) at four soil depths (20, 40, 90, 180 cm). The wet season is represented in blue, and the dry season is represented in yellow. Data are mean values, and error bars are standard deviations (n = 6). Coefficients k1 and k2 are shown only on the left plot but were calculated for each regression.

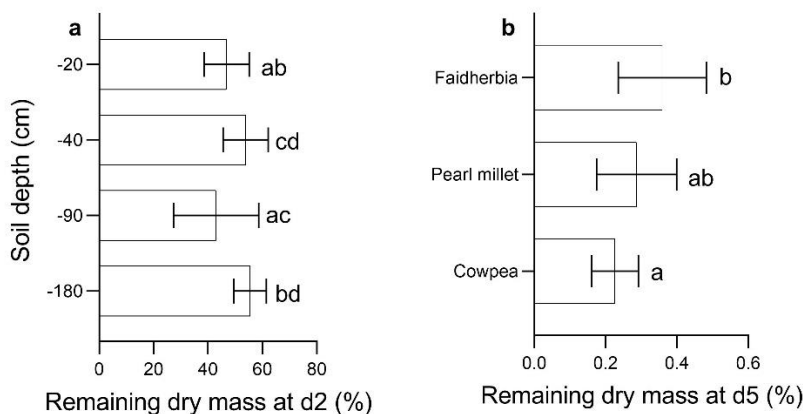


Fig. IV-11 Final root litter remaining mass (a) on d2 (01/17/2019) for pearl millet at four soil depths (20, 40, 90 and 180 cm) and (b) on d5 (01/22/2020) for three plant species (Faidherbia tree, pearl millet and cowpea) at all soil depths. Data are mean values, and error bars are standard deviations (n=3). The different letters indicate significant differences in remaining dry mass for each soil depth (A) or for each plant species (B).

The k1 coefficient of the first decomposition stage was significantly impacted by the plant species ($F = 3.9$, $p\text{-value} = 3.5 \times 10^{-2}$, data not shown), with higher coefficients for cowpea and lower coefficients for Faidherbia. The rate of fine root decomposition was also significantly impacted by soil depth in the case of pearl millet ($F = 7.4$, $p\text{-value} = 4.54 \times 10^{-3}$, Table IV-4), with lower values at 180 cm than at 20 cm depth. The cowpea fine root decomposition rate also decreased with soil depth but to a lesser extent than that of pearl millet ($F = 7.7$, $p\text{-value} = 2.13 \times 10^{-2}$, Table IV-4), while the fine root decomposition rate of the Faidherbia tree was only slightly impacted by depth (Table IV-4).

Table IV-4 The k1 coefficient for each plant species (Faidherbia tree, pearl millet and cowpea) according to soil depth (20, 40, 90, 180 cm). Data are mean values (n = 6). The different lowercase letters indicate significant differences between the soil depths accompanied by their p-values for each plant species, and ns indicates the absence of a significant effect of soil depth.

	Soil depths (cm)				Statistics	
	20	40	90	180	F-value	P-value
Faidherbia	5.08×10^{-3}	-	-	4.44×10^{-3}	ns	
Pearl millet	5.93×10^{-3} ^b	5.17×10^{-3} ^a	4.55×10^{-3} ^a	4.16×10^{-3} ^a	7.4	4.54×10^{-3}

Cowpea	$6.53 \times 10^{-3}^b$	$5.75 \times 10^{-3}^a$	-	$5.37 \times 10^{-3}^a$	7.7	2.13×10^{-2}
--------	-------------------------	-------------------------	---	-------------------------	-----	-----------------------

3.4. Relationships between fine root decomposition, soil characteristics and litter quality

The contribution of the main soil variables and the fine root decomposition rate to differences among soil depths is represented by the PCA (Fig. IV-12), which explained 50.5% of the dataset's variability. Individuals at each soil depth were well separated with no overlap between 95% confidence ellipses of three distinguished groups: 0-40 cm, 90 cm and 180 cm (Fig. IV-12, p-value = 2.20×10^{-9} for Wilk's test). The variables that best explained the separation between soil depths were C:N, sand, Olsen P and clay. The k1 coefficient increased with these variables. These variables were not correlated (orthogonal) with k2, the soil pH or silt content (Fig. IV-12). Therefore, the first axis of the PCA best described variables that correlated with k1, and the second axis variables correlated with k2. Importantly, k1 and k2 were not correlated.

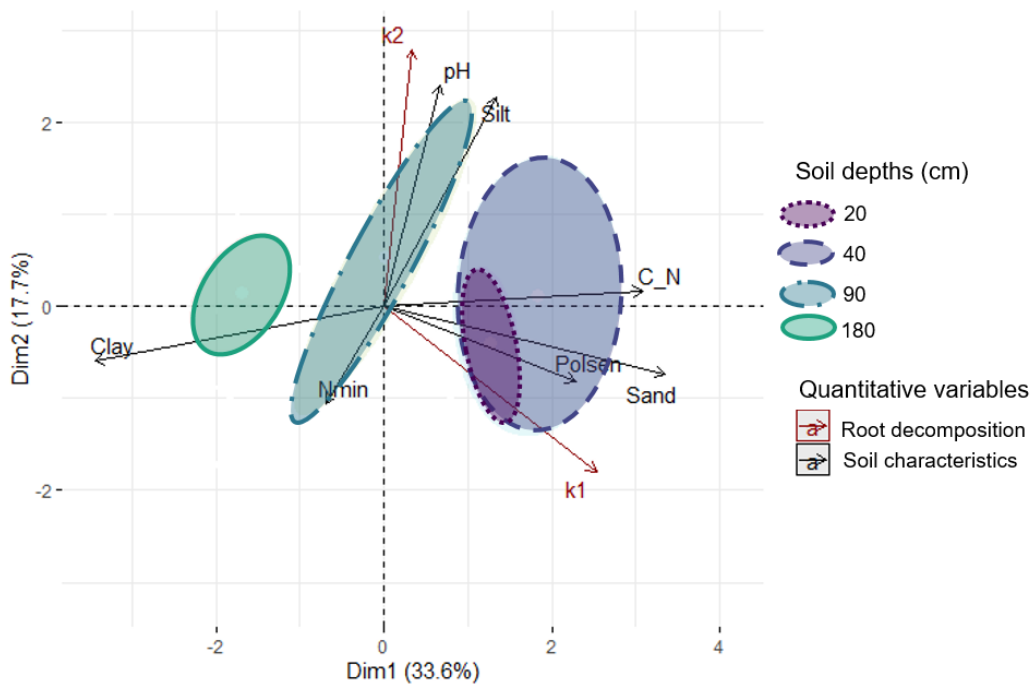


Fig. IV-12 Relationships between soil characteristics (clay, silt, sand, available P (as P_{Olsen}) and mineral N (as N_{min}) contents, pH and the C:N ratio) and root decomposition (k1 and k2), according to the soil depth (20, 40, 90, 180 cm).

4. Discussion

4.1. Impact of *Faidherbia albida* trees on soil characteristics

As expected for this type of soil, the total C and N contents were quite low (less than 0.5 and 0.05%, respectively), as previously described (Barthès et al. 2006; Tounkara et al. 2020). The C and N contents decreased with soil depth and were higher under than far from the tree, as expected according to other agroforestry studies (Felix et al. 2018; Nair et al. 2009b), especially with *Faidherbia albida* (Dilla et al.

2019), but these differences were surprisingly not significant (considering p -value > 0.05). In the 0 – 40 cm soil layer, the soil C:N ratio was higher far from than that under the tree, whereas in the deeper layers, the opposite was true. These changes were associated with a large standard deviation, probably due to the low N concentration. Because *Faidherbia* leaf litter was shown to release high amounts of nutrients, especially N, during decomposition (Mubarak et al. 2008), the long-term effects of this litter may have contributed to a decrease in the surface soil C:N ratio, likely by increasing the bacterial pathway of decomposition (Rousk and Bååth 2007).

At a depth of 40 – 180 cm, the higher C:N ratio under the tree than far from it was also related to a lower soil mineral N content, while the yield of the pearl millet was almost 3 times higher under tree (Roupsard et al. 2020; Leroux et al. 2020). Due to higher pearl millet above- and belowground production, more mineral N could be taken up by the crop under the tree. However, with respect to pearl millet root distribution, the main difference between the locations under and far from the tree occurred in the topsoil (0 – 40 cm), and millet did not invest biomass at great depth under the tree, which is in agreement with the higher root:total biomass ratio far from the tree. Another possible explanation is that microorganisms may immobilize soil mineral N following an N-mining strategy (Chen et al. 2014) to mineralize soil organic matter or plant litter with a high C:N ratio. The total amounts of soil C and N were not influenced by tree presence, suggesting that the nature of the litter entering the soil instead of the soil organic matter (C and N) differed under and far from the tree and would be responsible for the hypothetical N-mining strategy. We did not separate roots or aboveground plant parts according to their location (under or far from the tree) before assessing their C and N contents. However, the fine and medium roots of *Faidherbia* were particularly abundant under the tree below a depth of 40 cm and had a low C:N ratio of 13. The low root C:N ratio can be explained by the high N availability in this N-fixing species, which would prevent a lack of N and thus hamper the N-mining strategy. However, the presence of N-binding materials such as lignin and polyphenols could restrict N accessibility and lead to a microbial N immobilization phase, as described during the leaf decomposition of a N-fixing tree by Teklay and Malmer (2004). Furthermore, the slow decomposition of *Faidherbia* roots due to the high lignin content could favour the development of K-strategy microorganisms dominated by fungi (Chen et al. 2014). However, without more information on the importance and nature of the soil microbial communities in comparison to total soil C, we cannot conclude the origin of the soil C/N changes.

Several soil fertility indicators, such as mineral N and Olsen P, were higher in the topsoil (0 – 40 cm) than at depth (40 – 200 cm) under the tree. The enrichment of nutrients in the topsoil under the *Faidherbia albida* tree was in agreement with the results found by Yengwe et al. (2018) and explained the higher crop yield under this tree. No remaining detritus of *Faidherbia* leaves was observed on the soil surface during the sampling period. This was due to the active livestock in this silvo-agro-pastoral system removing the leaves, twigs and fruits from the ground during the litterfall season (April to July) due to the reverse phenology of this tree (Roupsard et al. 1999). However, ruminants tend to stand under

trees, where excrement is deposited, which enriches the topsoil nutrient content under trees. At a depth of 50 cm, the lack of nutrients under trees compared to that far from trees could come from the increase in *Faidherbia* root biomass at the same depth and thus the increase in nutrient uptake at depth compared to the topsoil.

A significant interaction between the soil depth and location impacted the soil pH. Indeed, the higher soil pH under the tree compared with that far from the tree occurred mostly below a depth of 40 cm, while no significant differences were observed in the topsoil, as previously reported by Félix et al. (2018) for *Piliostigma* shrubs in Burkina Faso. In the 40 – 90 cm horizon, soil pH tended to increase under the tree (from 6.7 to 7.3), as found by Rao et al. (1997), while acidification (from 6.5 to 5.7) was recorded far from the tree. Sandy soils are poorly buffered (Wezel et al. 2000), and pH is sensitive to small variations in acid-basic reactions. Although our study did not allow us to conclude the mechanisms to explain the increase in pH under the tree, acidification of the soil profile far from the tree is an indicator of fertility degradation. Acidic soils are indeed known for their relatively low microbial abundance and diversity and low cation exchange capacity (Robson 2012) and could affect millet productivity.

4.2. Impact of soil depth on root litter decomposition

Due to the climatic conditions in the study area, root decomposition occurred rapidly after crop harvest (end of October 2018), while the soil was still moist from the previous wet season, and lasted for two months thereafter (January 2019). Then, the soil dried progressively from $9.0 \pm 5.9 \text{ m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-3}_{\text{soil}}$ on d1 to $2.6 \pm 2.8 \text{ m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-3}_{\text{soil}}$ on d3, as no rain occurred until the next wet season, which started in July 2019. Faster decomposition in wetter soils confirmed a previous report by Duthoit et al. (2020) regarding soil respiration. This moisture regime leads to two contrasting kinetics of decomposition, with a relatively rapid first phase (k_1) and a slower second phase (k_2), following the same time scale, similar to the few other studies conducted under similar environmental conditions (Mubarak et al. 2008; Mubarak et al. 2012). This result suggested that the labile part of the root litter decomposed quickly during the first phase of decomposition (k_1) when the soil was very wet. Then, the decomposition slowed (k_2) as the soil dried.

Soil moisture is a key factor controlling root decomposition and seems to be the main driver of decomposition kinetics after litter species, i.e., quality (Arrouays et al. 2002; Butenschoen et al. 2011). Because the humidity of the root litterbags was significantly higher for the individuals located under the tree due to tree shading, which reduced soil evaporation (Hasselquist et al. 2018), greater soil water infiltration (Faye et al. 2020), the reduction of water runoff under the tree crown (Lal 1989) and the potential benefit of hydraulic redistribution through the *Faidherbia* root system (Bayala and Prieto 2020), we expected a slower fine root decomposition rate far from the tree than under the tree. This was not confirmed here. However, the lack of tree replicates may bias our results, and the study would need to

be extended to a wider area of the park, including different tree sizes representing the local diversity of the parkland.

Root litter quality was the main factor controlling the rate of decomposition. *Faidherbia albida* roots decomposed more slowly than cowpea roots due to less soluble compounds and high lignin contents, as reported in Mubarak et al. (2012), while the root N content (higher in *Faidherbia* fine roots) did not seem to influence k_1 . Over a short period of time, soluble C drives the decomposition of plant residues (Bertrand et al. 2006; Bertrand et al. 2009; Moorhead et al. 2016; Liang et al. 2018), while the litter N content (C:N ratio) has no impact unless N limits decomposition (Recous et al. 1995; Bertrand et al. 2006), which does not seem to be the case here.

The remaining C after 15 months of decomposition accounted for root C inputs (Fig. IV-13) for 2 plant species (*Faidherbia* fine roots and pearl millet), at both locations (under and far from the tree) and at 3 soil layers (0 – 40, 40 – 100 and 100 – 200 cm of depth). The effect of all combined factors was significant ($F = 10.3$, $p\text{-value} = 5.4 \times 10^{-3}$, Supplementary Table IV-2). Under the tree, *Faidherbia* root biomass was higher than far from the tree, and low decomposition rates of this perennial root litter were observed in the litterbags. Both of these factors resulted in higher C inputs from *Faidherbia* root litter under (0.62 gC m^{-2} between 0 and 200 cm of depth, Fig. IV-13) than far from the tree (0.02 gC m^{-2}), which could explain the tendency of higher soil C stocks under than far from the tree (Fig. IV-13, Table IV-1). Furthermore, the root C input was higher at depth than at the surface; between 100 and 200 cm depths, the amount of remaining C after 15 months of decomposition originating from *Faidherbia* root litter under the tree was 7 times higher than that at 20 cm. No significant C inputs from the *Faidherbia* root litter were noteworthy far from the tree. Due to a different root distribution, pearl millet presented the opposite trend. Pearl millet root C inputs were significantly higher at the soil surface than at depth, with no difference between the 2 locations (Fig. IV-13). The pearl millet crop provided 2.34 to 2.44 gC m^{-3} at 0–40 cm of depth through its roots. This amount is very low compared to the soil C stocks at the same depth (4708 gC m^{-3} far from the tree and 6429 gC m^{-3} under the tree), but it is repeated every growing season. The role in the root C stocks of pearl millet in topsoil and of *Faidherbia* fine roots at depth was in agreement with that described by Jackson et al. (2017), attesting that fine roots contribute substantially to soil organic carbon storage. Future studies should prospect deeper soil depths to take into account a more representative cross-section of the tree root system. We hypothesized that soil depth would slow the fine root decomposition rate due to reduced microbial activity and moisture and temperature buffering, which was confirmed for the first phase of decomposition (k_1 was higher at 20 cm than at soil depths of 40, 90 and 180 cm for the three species). We did not measure microbial biomass C; however, several studies have reported its close relationships with the organic C content in soils (Insam and Domsch 1988; Webster et al. 2001; Ng et al. 2014). In the topsoil, more abundant microbial biomass and activity as well as drying/rewetting cycles that create a flush of C and microbial activity may explain the quicker decomposition rates (Miller et al. 2005; Sun et al. 2013). According to the PCA,

the soil characteristics that best explained k_1 were sand, the Olsen P content and the soil C:N ratio, suggesting that the very low amount of P may have decreased the microbial activity at depth.

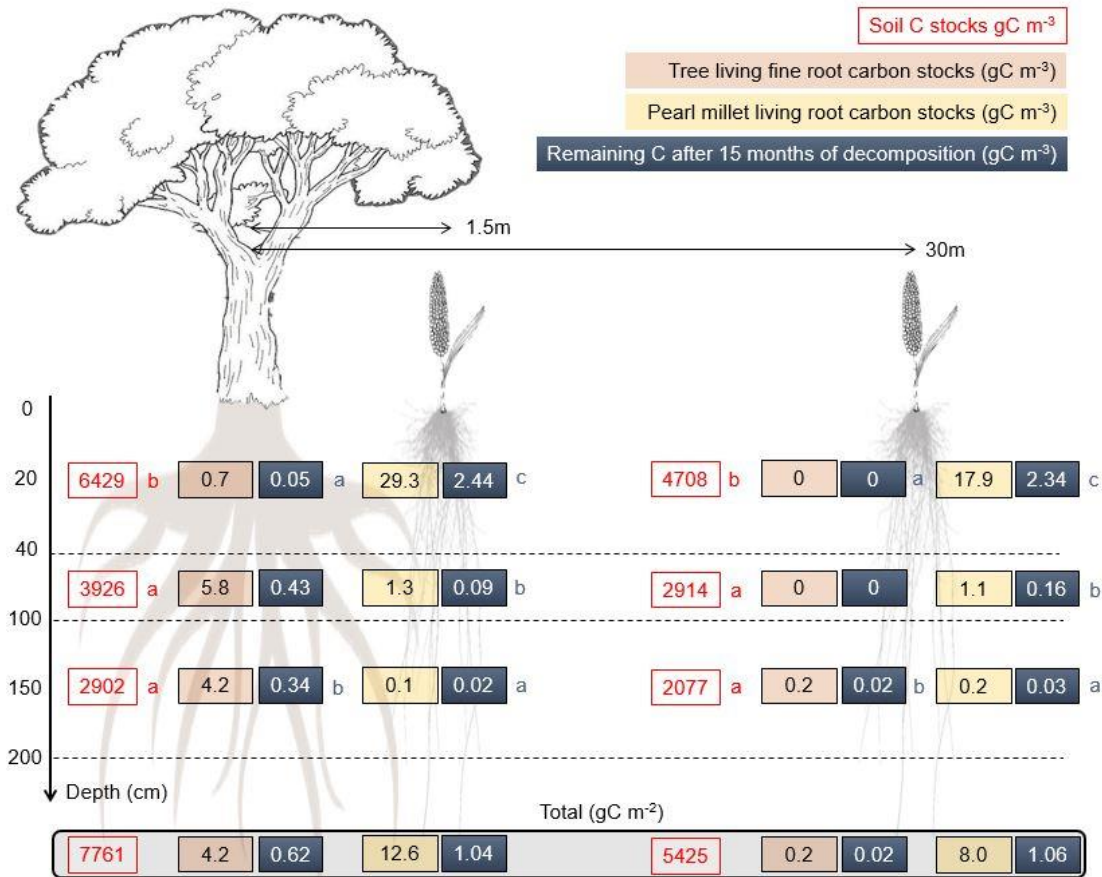


Fig. IV-13 Potential root C contribution to soil C stocks in one cultural season for Faidherbia and pearl millet according to the soil depth and at two locations: under (left) and far (right) from the tree. For each location, the different letters indicate significant differences in soil C stocks and in remaining C between the soil depths.

5. Conclusion

Root litter decomposition varied mostly according to soil depth, with litter quality and soil moisture being the main factors related to the decomposition coefficient k_1 in the first 1.5 months. Organic C originating from roots would be stored for a longer time period at depth than in the topsoil. Furthermore, tree root litter tended to be more recalcitrant than annual crop root litter and was more abundant below 40 cm, while annual roots were concentrated in the topsoil. Therefore, slow tree root decomposition at depth could play a role in increasing belowground C inputs and sequestration. In contrast, pearl millet induced root C inputs mainly in the topsoil and it did not depend on the location. The root decomposition rate was not affected by the location, but the tree fine root biomass and pearl millet vegetative production were higher under the tree than far from the tree. This difference resulted in higher soil carbon stocks under the tree than far from it.

In agroforestry systems, the diversity of plant species induces a great diversity of root qualities and thus various decomposition kinetics. Introducing trees in arable lands would globally increase root litter

inputs while slowing root decomposition, especially at depth, and would thus increase the soil carbon storage potential of the system. Further research should focus on this aspect with replicated trees and different distances from the trees according to a gradient to confirm the influence of tree presence on root decomposition kinetics.

References

- Arrouays D, Balesdent J, Germon J-C, Jayet P-A, Soussana J-F, Stengel P (2002) Contribution à la lutte contre l'effet de serre. Stocker du carbone dans les sols agricoles de France ?
- Balesdent J, Recous S (1997) Les temps de résidence du carbone et le potentiel de stockage de carbone dans quelques sols cultivés français. *Can J Soil Sci* 77:187–193. <https://doi.org/10.4141/S96-109>
- Barthès BG, Brunet D, Ferrer H, Chotte J-L, Feller C (2006) Determination of Total Carbon and Nitrogen Content in a Range of Tropical Soils Using near Infrared Spectroscopy: Influence of Replication and Sample Grinding and Drying. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14:341–348. <https://doi.org/10.1255/jnirs.686>
- Battie-Laclau P, Taschen E, Plassard C, Dezette D, Abadie J, Arnal D, Benezech P, Duthoit M, Pablo A-L, Jourdan C, Laclau J-P, Bertrand I, Taudière A, Hinsinger P (2020) Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant Soil* 453:153–171. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04181-z>
- Bayala J, Prieto I (2020) Water acquisition, sharing and redistribution by roots: applications to agroforestry systems. *Plant Soil* 453:17–28. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04173-z>
- Bertrand I, Chabbert B, Kurek B, Recous S (2006) Can the Biochemical Features and Histology of Wheat Residues Explain their Decomposition in Soil? *Plant Soil* 281:291–307. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4628-7>
- Bertrand I, Prevot M, Chabbert B (2009) Soil decomposition of wheat internodes of different maturity stages: Relative impact of the soluble and structural fractions. *Bioresource Technology* 100:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.019>
- Blake GR, Hartge KH (1986) Bulk Density. In: Klute A (ed) *SSSA Book Series*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, pp 363–375
- Butenschoen O, Scheu S, Eisenhauer N (2011) Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 43:1902–1907. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.011>
- Cardinael R (2015) Stockage de carbone et dynamique des matières organiques des sols en agroforesterie sous climat méditerranéen et tempéré. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE)
- Cardinael R, Mao Z, Prieto I, Stokes A, Dupraz C, Kim JH, Jourdan C (2015) Competition with winter crops induces deeper rooting of walnut trees in a Mediterranean alley cropping agroforestry system. *Plant Soil* 391:219–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2422-8>
- Chander K, Goyal S, Nandal DP, Kapoor KK (1998) Soil organic matter, microbial biomass and enzyme activities in a tropical agroforestry system. *Biol Fertil Soils* 27:168–172. <https://doi.org/10.1007/s003740050416>
- Chen R, Senbayram M, Blagodatsky S, Myachina O, Dittert K, Lin X, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2014) Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biology* 20:2356–2367. <https://doi.org/10.1111/gcb.12475>

- Chenu C, Angers DA, Barré P, Derrien D, Arrouays D, Balesdent J (2019) Increasing organic stocks in agricultural soils: Knowledge gaps and potential innovations. *Soil and Tillage Research* 188:41–52. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.04.011>
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19:988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Diatta S (2021) Estimation du stock et du stockage annuel de carbone dans la biomasse aérienne de *Faidherbia albida* du parc agroforestier de Sob (Observatoire de Niakhar, Sénégal) : approches par inventaires et dendrochronologie.
- Dilla AM, Smethurst PJ, Barry K, Parsons D (2019) Preliminary estimate of carbon sequestration potential of *Faidherbia albida* (Delile) A.Chev in an agroforestry parkland in the Central Rift Valley of Ethiopia. *Forests, Trees and Livelihoods* 28:79–89. <https://doi.org/10.1080/14728028.2018.1564146>
- Duthoit M, Roupsard O, Crequy N, Sauze J, Van Den Meersche K (2020) Conception d'un dispositif automatisé de chambres de mesures d'échanges gazeux du sol à fermeture horizontale. *Cahier des Techniques de l'INRA*
- Ellert BH, Bettany JR (1995) Calculation of organic matter and nutrients stored in soils under contrasting management regimes. *Can J Soil Sci* 75:529–538. <https://doi.org/10.4141/cjss95-075>
- Faye W, Fall AN, Orange D, Do F, Roupsard O, Kane A (2020) Climatic variability in the Sine-Saloum basin and its impacts on water resources: case of the Sob and Diohine watersheds in the region of Niakhar. *Proc IAHS* 383:391–399. <https://doi.org/10.5194/piahs-383-391-2020>
- Félix GF, Clermont-Dauphin C, Hien E, Groot JCJ, Penche A, Barthès BG, Manlay RJ, Tiftonell P, Cournac L (2018) Ramial wood amendments (*Ptilostigma reticulatum*) mitigate degradation of tropical soils but do not replenish nutrient exports. *Land Degrad Dev* 29:2694–2706. <https://doi.org/10.1002/ldr.3033>
- Feller C, Beare MH (1997) Physical control of soil organic matter dynamics in the tropics. *Geoderma* 79:69–116. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(97\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(97)00039-6)
- Freschet GT, Cornwell WK, Wardle DA, Elumeeva TG, Liu W, Jackson BG, Onipchenko VG, Soudzilovskaia NA, Tao J, Cornelissen JHC (2013) Linking litter decomposition of above- and below-ground organs to plant-soil feedbacks worldwide. *J Ecol* 101:943–952. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12092>
- Fujisaki K, Chevallier T, Chapuis-Lardy L, Albrecht A, Razafimbelo T, Masse D, Ndour YB, Chotte J-L (2018) Soil carbon stock changes in tropical croplands are mainly driven by carbon inputs: A synthesis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 259:147–158. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.008>
- Germon A, Cardinael R, Prieto I, Mao Z, Kim J, Stokes A, Dupraz C, Laclau J-P, Jourdan C (2016) Unexpected phenology and lifespan of shallow and deep fine roots of walnut trees grown in a silvoarable Mediterranean agroforestry system. *Plant Soil* 401:409–426. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2753-5>
- Goering HK, Van Soest PJ (1970) Forage Fiber Analyses: Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications

- Hasselquist NJ, Benegas L, Roupsard O, Malmer A, Ilstedt U (2018) Canopy cover effects on local soil water dynamics in a tropical agroforestry system: Evaporation drives soil water isotopic enrichment. *Hydrological Processes* 32:994–1004. <https://doi.org/10.1002/hyp.11482>
- Herman DJ, Firestone MK, Nuccio E, Hodge A (2012) Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus and a soil microbial community mediating litter decomposition. *FEMS Microbiol Ecol* 80:236–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01292.x>
- Hicks Pries CE, Sulman BN, West C, O'Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Insam H, Domsch KH (1988) Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microb Ecol* 15:177–188. <https://doi.org/10.1007/BF02011711>
- IUSS Working group WRB (2014) World reference base for soil resources 2014: international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome
- Jackson RB, Lajtha K, Crow SE, Hugelius G, Kramer MG, Piñeiro G (2017) The Ecology of Soil Carbon: Pools, Vulnerabilities, and Biotic and Abiotic Controls. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 48:419–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054234>
- Jha P, Prasad Mohapatra K (2010) Leaf litterfall, fine root production and turnover in four major tree species of the semi-arid region of India. *Plant Soil* 326:481–491. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0027-9>
- Koenig R, Johnson C (1942) Colorimetric Determination of Phosphorus in Biological Materials. *Ind Eng Chem Anal Ed* 14:155–156. <https://doi.org/10.1021/i560102a026>
- Kuzyakov Y, Domanski G (2000) Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163:421–431. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163:4<421::AID-JPLN421>3.0.CO;2-R)
- Lagerlöf J, Adolfsson L, Börjesson G, Ehlers K, Vinyoles GP, Sundh I (2014) Land-use intensification and agroforestry in the Kenyan highland: Impacts on soil microbial community composition and functional capacity. *Applied Soil Ecology* 82:93–99. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.015>
- Lal R (1989) Agroforestry systems and soil surface management of a tropical alfisol: I: Soil moisture and crop yields. *Agroforest Syst* 8:7–29. <https://doi.org/10.1007/BF00159066>
- Lalou R, Sultan B, Muller B, Ndonky A (2019) Does climate opportunity facilitate smallholder farmers' adaptive capacity in the Sahel? *Palgrave Communications* 5:1–11. <https://doi.org/10.1057/s41599-019-0288-8>
- Leakey R (1996) Definition of agroforestry revisited. *Agroforestry Today* 8:5–7
- Leroux L, Falconnier GN, Diouf AA, Ndao B, Gbodjo JE, Tall L, Balde AA, Clermont-Dauphin C, Bégué A, Affholder F, Roupsard O (2020) Using remote sensing to assess the effect of trees on millet yield in complex parklands of Central Senegal. *Agricultural Systems* 184:102918. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2020.102918>
- Liang Z, Elsgaard L, Nicolaisen MH, Lyhne-Kjærbye A, Olesen JE (2018) Carbon mineralization and microbial activity in agricultural topsoil and subsoil as regulated by root nitrogen and

- recalcitrant carbon concentrations. *Plant Soil* 433:65–82. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3826-z>
- Lin BB (2007) Agroforestry management as an adaptive strategy against potential microclimate extremes in coffee agriculture. *Agricultural and Forest Meteorology* 144:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2006.12.009>
- Liu C, Jin Y, Hu Y, Tang J, Xiong Q, Xu M, Bibi F, Beng KC (2019) Drivers of soil bacterial community structure and diversity in tropical agroforestry systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 278:24–34. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.03.015>
- Machinet GE, Bertrand I, Chabbert B, Recous S (2009) Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *European Journal of Soil Science* 60:176–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01109.x>
- Maignien R (1965) Notice explicative : carte pédologique du Sénégal au 1/1.000.000. 71
- Makkonen M, Berg MP, Handa IT, Hättenschwiler S, Ruijven J van, Bodegom PM van, Aerts R (2012) Highly consistent effects of plant litter identity and functional traits on decomposition across a latitudinal gradient. *Ecology Letters* 15:1033–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01826.x>
- Mary B, Beaudoin N, Justes E, Machet JM (1999) Calculation of nitrogen mineralization and leaching in fallow soil using a simple dynamic model. *Eur J Soil Science* 50:549–566. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00264.x>
- Matejovic I (1997) Determination of carbon and nitrogen in samples of various soils by the dry combustion. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28:1499–1511. <https://doi.org/10.1080/00103629709369892>
- Miller A, Schimel J, Meixner T, Sickman J, Melack J (2005) Episodic rewetting enhances carbon and nitrogen release from chaparral soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37:2195–2204. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.03.021>
- Monteith JL, Ong CK, Corlett JE (1991) Microclimatic interactions in agroforestry systems. *Forest Ecology and Management* 45:31–44. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(91\)90204-9](https://doi.org/10.1016/0378-1127(91)90204-9)
- Moorhead DL, Sinsabaugh RL, Hill BH, Weintraub MN (2016) Vector analysis of ecoenzyme activities reveal constraints on coupled C, N and P dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* 93:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.10.019>
- Mubarak AR, Abdalla MH, Nortcliff S (2012) Millet (*Pennisetum typhoides*) yield and selected soil attributes as influenced by some tree types of the semi-arid tropics of Sudan. *Journal of Arid Environments* 77:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2011.10.008>
- Mubarak AR, Elbashir AA, Elamin LA, Daldoum DMA, Steffens D, Benckiser G (2008) Decomposition and Nutrient Release from Litter Fall in the Semi-arid Tropics of Sudan. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39:2359–2377. <https://doi.org/10.1080/00103620802292574>
- Nair PKR, Kumar BM, Nair VD (2009a) Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 172:10–23. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800030>
- Nair PKR, Nair VD, Kumar BM, Haile SG (2009b) Soil carbon sequestration in tropical agroforestry systems: a feasibility appraisal. *Environmental Science & Policy* 12:1099–1111. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.01.010>

- Ndiaye O, Le Hesran J-Y, Etard J-F, Diallo A, Simondon F, Neil Ward M, Robert V (2001) Variations climatiques et mortalité attribuée au paludisme dans zone de Niakhar, Sénégal, de 1984 à 1996. *Cahiers santé* 11:25–33
- Ng E-L, Patti AF, Rose MT, Scheffe CR, Wilkinson K, Smernik RJ, Cavagnaro TR (2014) Does the chemical nature of soil carbon drive the structure and functioning of soil microbial communities? *Soil Biology and Biochemistry* 70:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.004>
- Oelbermann M, Paul Voroney R, Gordon AM (2004) Carbon sequestration in tropical and temperate agroforestry systems: a review with examples from Costa Rica and southern Canada. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 104:359–377. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.04.001>
- Oelbermann M, Voroney RP (2007) Carbon and nitrogen in a temperate agroforestry system: Using stable isotopes as a tool to understand soil dynamics. *Ecological Engineering* 29:342–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.09.014>
- Ohno T, Zibilske LM (1991) Determination of Low Concentrations of Phosphorus in Soil Extracts Using Malachite Green. *Soil Science Society of America Journal* 55:892–895. <https://doi.org/10.2136/sssaj1991.03615995005500030046x>
- Paustian K, Lehmann J, Ogle S, Reay D, Robertson GP, Smith P (2016) Climate-smart soils. *Nature* 532:49–57. <https://doi.org/10.1038/nature17174>
- Poeplau C, Vos C, Don A (2017) Soil organic carbon stocks are systematically overestimated by misuse of the parameters bulk density and rock fragment content. *SOIL* 3:61–66. <https://doi.org/10.5194/soil-3-61-2017>
- Pries CEH, Sulman BN, West C, O’Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Prieto I, Stokes A, Roumet C (2016) Root functional parameters predict fine root decomposability at the community level. *Journal of Ecology* 104:725–733. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12537>
- R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing
- Rahimi J, Ago EE, Ayantunde A, Berger S, Bogaert J, Butterbach-Bahl K, Cappelaere B, Demarty J, Diouf AA, Falk U, Haas E, Hiernaux P, Kraus D, Roupsard O, Scheer C, Srivastava AK, Tagesson T, Grote R (2021) Modelling Gas Exchange and Biomass Production in West African Sahelian and Sudanian Ecological Zones. *Geoscientific Model Development Discussions* 1–39. <https://doi.org/10.5194/gmd-2020-417>
- Rao MR, Nair PKR, Ong CK (1997) Biophysical interactions in tropical agroforestry systems. *Agroforestry Systems* 38:3–50. <https://doi.org/10.1023/A:1005971525590>
- Rasse DP, Rumpel C, Dignac M-F (2005) Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant Soil* 269:341–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0907-y>
- Recous S, Robin D, Darwis D, Mary B (1995) Soil inorganic N availability: Effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27:1529–1538. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00096-W](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00096-W)
- Robson A (2012) *Soil Acidity and Plant Growth*. Elsevier

- Roupsard O, Audebert A, Ndour AP, Clermont-Dauphin C, Agbohessou Y, Sanou J, Koala J, Faye E, Sambakhe D, Jourdan C, le Maire G, Tall L, Sanogo D, Seghieri J, Cournac L, Leroux L (2020) How far does the tree affect the crop in agroforestry? New spatial analysis methods in a *Faidherbia* parkland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 296:106928. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106928>
- Roupsard O, Ferhi A, Granier A, Pallo F, Depommier D, Mallet B, Joly HI, Dreyer E (1999) Reverse phenology and dry-season water uptake by *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. in an agroforestry parkland of Sudanese west Africa. *Functional Ecology* 13:460–472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00345.x>
- Rousk J, Bååth E (2007) Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiol Ecol* 62:258–267. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00398.x>
- Six J, Feller C, Deneff K, Ogle S, Joao Carlos De Moraes Sa, Albrecht A (2002) Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils - Effects of no-tillage. *Agronomie* 22:755–775. <https://doi.org/10.1051/agro:2002043>
- Smith P, Bustamante M, Ahammad H, Clark H, Dong H, Elsiddig EA, Haberl H, Harper R, House J, Jafari M, Masera M (2014) *Climate Change 2014 Mitigation of Climate Change: Working Group III Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Sun Y, Yan F, Liu F (2013) Drying/rewetting cycles of the soil under alternate partial root-zone drying irrigation reduce carbon and nitrogen retention in the soil–plant systems of potato. *Agricultural Water Management* 128:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.06.015>
- Teklay T, Malmer A (2004) Decomposition of leaves from two indigenous trees of contrasting qualities under shaded-coffee and agricultural land-uses during the dry season at Wondo Genet, Ethiopia. *Soil Biology and Biochemistry* 36:777–786. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.12.013>
- Van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 829–835
- Webster EA, Hopkins DW, Chudek JA, Haslam SFI, Šimek M, Pícek T (2001) The Relationship between Microbial Carbon and the Resource Quality of Soil Carbon. *Journal of Environmental Quality* 30:147–150. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.301147x>
- Wezel A, Rajot J-L, Herbrig C (2000) Influence of shrubs on soil characteristics and their function in Sahelian agro-ecosystems in semi-arid Niger. *Journal of Arid Environments* 44:383–398. <https://doi.org/10.1006/jare.1999.0609>
- Yengwe J, Gebremikael MT, Buchan D, Lungu O, De Neve S (2018) Effects of *Faidherbia albida* canopy and leaf litter on soil microbial communities and nitrogen mineralization in selected Zambian soils. *Agroforest Syst* 92:349–363. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-0063-4>

Supplementary Data

Supplementary Table IV-1 Impact of soil depth and location and their combined effect on soil variables (clay, silt, fine and coarse sand, total carbon, total nitrogen, available phosphorus (as P_{Olsen}), mineral nitrogen contents, C:N ratio and soil pH). For some variables, a transformation was necessary and is indicated in the table by jtrans or boxcox. ***, ** and * indicate the significance of the impact of the studied effects on soil variables with p-values < 0.001, 0.01, and 0.05, respectively, whereas ns indicates the absence of a significant effect.

	Soil depth	Location	Soil depth × Location
Clay	F = 3.64 p-value = 7.25×10^{-5} ***	ns	ns
Silt	F = 4.60 p-value = 1.71×10^{-3} **	ns	F = 7.10 p-value = 7.63×10^{-5} ***
Fine sand	F = 3.05 p-value = 1.67×10^{-2} *	F = 6.08 p-value = 1.94×10^{-2} *	ns
Coarse sand	F = 2.74 p-value = 2.76×10^{-2} *	ns	ns
Total carbon ^{boxcox}	F = 30.17 p-value = 3.0×10^{-11} ***	ns	ns
Total nitrogen ^{boxcox}	F = 11.30 p-value = 1.2×10^{-6} ***	ns	ns
C:N	F = 10.9 p-value = 1.8×10^{-6} ***	ns	F = 6.97 p-value = 8.7×10^{-5} ***
pH ^{jtrans}	ns	ns	F = 3.27 p-value = 0.01 *
Polsen ^{boxcox}	ns	ns	F = 3.77 p-value = 5.6×10^{-3} **
Mineral nitrogen ^{boxcox}	F = 3.57 p-value = 7.6×10^{-3} **	ns	F = 4.46 p-value = 2.1×10^{-3} **

Supplementary Table IV-2 Impact of soil depth, location and plant root species and their combined effect on the decomposition variables (remaining dry mass on sampling dates d1, d2, d3, d4 and d5 and coefficients k1 and k2 of the first and second linear regressions). ***, ** and * indicate the significance of the impact of the studied effects on soil variables with p-values < 0.001, 0.01, and 0.05, respectively, whereas ns indicates the absence of a significant effect

	Soil depth	Location	Root species	Interactions
Remaining dry mass at d1	ns	ns	ns	ns
Remaining dry mass at d2	F = 3.8 p-value = 4.8×10^{-2} *	ns	-	ns
Remaining dry mass at d3	ns	ns	ns	Layer × Specie

				F = 3.1 p-value = 4.0×10^{-2} *
Remaining dry mass at d4	ns	ns	-	ns
Remaining dry mass at d5	ns	ns	F = 3.9 p-value = 3.5×10^{-2} *	ns
Coef k1	F = 4.7 p-value = 1.1×10^{-2} *	ns	F = 3.9 p-value = 3.5×10^{-2} *	ns
Coef k2	ns	ns	ns	ns
Remaining carbon originating from roots in the soil after 15 months of decomposition	ns	ns	F = 10.5 p-value = 5.1×10^{-3} **	Layer x Specie x Location F = 10.3 p-value = 5.4×10^{-3} ***

Article 4

Optical scanner-based image analysis for assessing in situ crop root decomposition kinetics at different soil depths

Siegwart Lorène¹, Saimpha Garynechele¹, Bertrand Isabelle¹, Jourdan Christophe^{1,2}

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, InstitutAgro Montpellier, Montpellier, France

² CIRAD, UMR Eco&Sols, F-34398 Montpellier, France



Abstract

To increase C sequestration in the cultivated soils, a better understanding of the C dynamics is needed, especially at depth, where plant i.e. root litter decomposition is expected to be different than in the ploughed layer. This study aimed at measuring in situ crop root decomposition rates with an innovative method at different soil layers down to 90 cm of depth.

Root decomposition was assessed by measuring root diameter and length losses over time on images acquired by buried optical scanners in three soil layers (20, 50 and 90 cm of depth). In parallel, a root litterbag experimentation aimed at comparing both methods and results in the topsoil.

The main result was the starting decomposition in length and in diameter as soon as roots appeared in the soil, suggesting that the classic litterbags method might use already decomposed roots when starting the experimentation. Due to experimental bias, the root decomposition rate was higher with the litterbags than with the scanners method. Root decomposition was strongly positively correlated to root initial diameter. Furthermore, root decomposition rate was higher at 20 than at 50 cm only for roots with an initial diameter < 0.3 mm, while it was not impacted by depth for larger roots (between 0.3 and 1 mm) due to similar soil temperature and moisture conditions across the layers in this Mediterranean field.

The optical scanner based image analysis is an alternative to root litterbags allowing an individual root tracking and in situ decomposition assessment without any disturbance. We recommend a wider use of this method for other species and soil conditions, when scanner can stay buried in soils after harvest.

1. Introduction

In the current context of climate change, increasing root biomass in the agroecosystems is recently suggested for soil C sequestration (Balesdent and Balabane 1996; Kumar et al. 2006), as roots are an opportunity to reach deeper soil layers (Nakhforoosh et al. 2021) and recalcitrant litter (Bertrand et al. 2006; Freschet et al. 2013; Lin et al. 2020) compared to aerial C inputs. Understanding root decomposition kinetics along the soil profile is requested to evaluate the subsoils C sequestration potential (Blume et al. 2002; Harrison et al. 2011) compared to the ploughed layer.

In agroecosystems, the root decomposition is assumed to start when the root mortality occurs at harvest, hypothesizing a negligible turnover during the growing season (Cardinael et al. 2018; Hirte et al. 2018). Then, several factors intervene in the root litter decomposition. First, the root chemical composition and anatomy are important drivers (Liao et al. 2022). For example, roots with higher lignin content would have lower the decomposition rate (Silver and Miya 2001) and within the fine roots (diameter < 2 mm), the thinner roots would decompose more slowly than the larger ones (Sun et al. 2013; Sun et al. 2016; Lin and Zeng 2017). Second, the variations of the pedo-climatic conditions, especially the event of desiccation/rewetting (Smith 1932; Silver and Miya 2001) and the soil fauna, including the microorganisms (Sinsabaugh et al. 1991), the meso- and macrofauna (Curry and Schmidt 2007; Fujii et al. 2018) also control root decomposition. Last, soil depth is an important driver of root litter decomposition (Pries et al. 2018; Siegwart et al. 2022) due to varying root diameter according to depth (Prieto et al. 2015; Wang et al. 2016; Freschet et al. 2017), more stable climatic conditions, lower microbial (Lavahun et al. 1996; Fang and Moncrieff 2005) and lower meso- and macrofauna activity (Doblas-Miranda et al. 2009) due to lower oxygen content, soil organic matter, and root biomass (Suárez et al. 2018) in the sub- than the topsoils. As the impact of soil depth on root decomposition result from a combination of the previous cited factors, it is necessary to measure it in situ.

Root decomposition kinetics is mostly assessed with the method of the root litterbags with adapted mesh sizes for allowing all or part of the soil organisms to participate to litter decomposition (Lecerf 2017). Most of the few studies putting root litterbags in the subsoils were using roots from the topsoils (easier to harvest) or pools of roots (Gill and Burke 2002; Solly et al. 2015; Sun et al. 2016). To our knowledge, no study used roots from the studied soil layer when assessing deep root decomposition despite the recognized variations of root diameter and chemical composition along the soil profile (Gill and Burke 2002; Prieto et al.

2015; Wang et al. 2016; Freschet et al. 2017). In addition, the root litterbags method implies several manipulations of the roots (sampling, washing, drying), that free them from their microbial cortege, and of the soil, which is brought into contact with oxygen when burying the litterbags. Optical scanner-based images analyses, which are already used for measuring root production, mortality and turnover (Cheng et al. 1991; Majdi 1996), could represent an innovative opportunity to measure in situ root decomposition kinetics without disturbance of the soil nor the roots, by contrast to the litterbags (Majdi 1996; Dannoura et al. 2008). Minirhizotrons have already been used for root decomposition with a mass balance model (Li et al. 2020; Li et al. 2022) but the root diameter and length losses were never assessed despite the detailed information in two dimension they could provide.

The objective of this study was to measure in situ crop root decomposition rates with a new method based on optical scanner buried at three different soil layers down to the maximum rooting depth. Our main hypothesis was that the optical scanner-based image analysis would represent an alternative to root litterbag method to assess in situ root decomposition with a precise and additionnal information. More specifically, we hypothesized that the analysis of individual roots would allow to show that the rate of root diameter loss would be lower for root with a thinner initial diameter. Furthermore, soil depth was expected to be the main factor of root decomposition, with lower decomposition rate at depth due to more stable soil temperature and moisture across the seasons and lower soil fauna-root interactions than in the topsoil.

To test these hypotheses, root decomposition kinetics was assessed with root diameter and length loss analyses on images acquired every fortnight by optical scanner buried in 3 soil layers (20, 50 and 90 cm of depth). In parallel, a litterbag method was conducted in the topsoil in order to compare both methods and results.

2. Materials and methods

2.1. Study site

This study was conducted on the “Dispositif Instrumenté en Agroforesterie Méditerranéenne sous contrainte hydrique” (DIAM’s), which is located in Mauguio (France, 43.612°N; 3.976°E). The high proportion of stones (up to 60%), a pronounced red color and a layer deeper than 100 cm with accumulation of clay classify the soils as Skeletic Rhodic Luvisols (IUSS Working group WRB 2014). The climate is Mediterranean, which is characterized by hot and dry summers and mild winters. The soil temperature (°C) and the soil volumetric water content ($\text{m}^3_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-3}_{\text{soil}}$) were measured with CS655 probes (Campbell Scientific) buried at 20, 50 and

100 cm of depth. Both of them were measured in 3 replicated locations in the plot. Data were recorded every 15 minutes over the entire study period. The average daily temperature and soil moisture and sum of rainfall were calculated (Supplementary Fig. IV-1).

The experimental site was set-up in 2017 and is divided into 3 modalities: alley-cropping agroforestry, conventional pure crop and tree plantation, which are conducted similarly. This study only focuses on locations in the crop far from any influence of the tree. In this experimental site, permanent pits were available for our experimentation in the conventional pure crop plot and in the crop inter-row of the agroforestry plot at least 5 m far from the tree line.

End of January 2021, barley (*Hordeum vulgare*) was sown as spring crop. Fertilization campaigns were conducted on March 04th, 2021 with Smart 46 fertilizer (40.0 kg N ha⁻¹) and on April 26th, 2021 with Smart N 46 fertilizer (58.4 kg N ha⁻¹). Crop harvest occurred on June 30th, 2021. The straws were left on the topsoil and buried on July 07th, 2021.

2.2. Experimental set-up and images acquisition

Before the crop sowing, 9 desktop flatbed scanners (Epson Perfection V39, Epson-Seiko, Japan) were buried at 3 different soil depths (20, 50 and 90 cm) in the vicinity of 3 permanent pits. For each scanner, a connecting cable was directed towards the pits to allow manual images acquisition. On all the scanners, a graph paper was glued to the scanners' window for the scale. The agricultural practices were maintained above the scanners as in the rest of the plots. The scanners were kept buried for two years after sowing.

From March 2021 to July 2022 and approximatively every 2 weeks (31 to 38 dates), images were manually acquired from the 9 scanners by connecting a computer to the cable bound to each scanner. The size of the images were set up to 14039 × 10200 pixels (1200 Dot Per Inch) on a TIFF format (Tagged Image File Format). At 90 cm of depth, roots were found only in 1 out of the 3 scanners buried at this depth. In total, 251 images were acquired (Supplementary Fig. IV-2).

2.3. Images analysis

For each scanners, approximatively 100 roots by soil depth and by replicated scanner were selected for the analysis. The hypothesis that the barley root biomass was the most important at its flowering stage (Nicoullaud 1995; Gan et al. 2009) made us select the roots at barley's flowering : May 19th, 2021. The criteria for selecting a root was that at least part of it was visible

during the entire period of interest (no hiding by weed roots, by soil aggregates removed by ants etc, making the measurement impossible). On each root and for each date, the average root diameter calculated on 3 random points on the root and the root length were measured (Fig. IV-14a) with the ImageJ software (Java 1.8.0_172, 64-bit). In addition, for 30 roots by soil layer and replicated scanner, the date of apparition of the stele after gradual decomposition of the cortical parenchyma was noted and the stele diameter was measured (Fig. IV-14b).

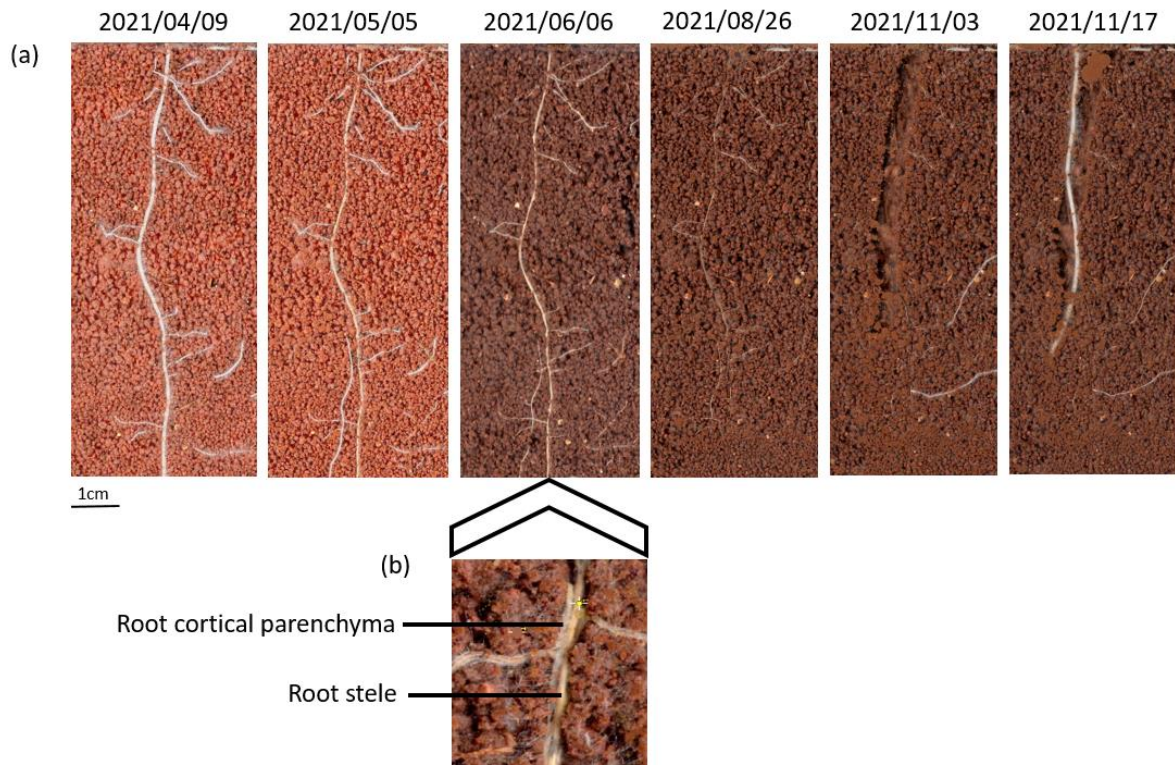


Fig. IV-14 Example of the evolution of a root decomposition – diameter loss from September 2021 to August 2021, length loss and worm’s gallery in November 2021, and weed root taking profit from the gallery to explore the soil (a). (b) is a zoom in from 2021/06/06 image highlighting the gradual loss of cortical parenchyma and the identification of the root stele.

The characterization of the initial pool of roots used in the scanner method corresponded to the measurements conducted at the date of apparition of the root on the scanner.

In addition, co-occurrences between soil fauno and roots were counted and soil fauna was identified as precisely as possible. Eight groups were defined: Acari, Oniscidea, Collembola, Enchytraediae, Geophilomorpha, Julida, Campodeiform larva, *Lepisma saccharinea* (Fig. IV-15).

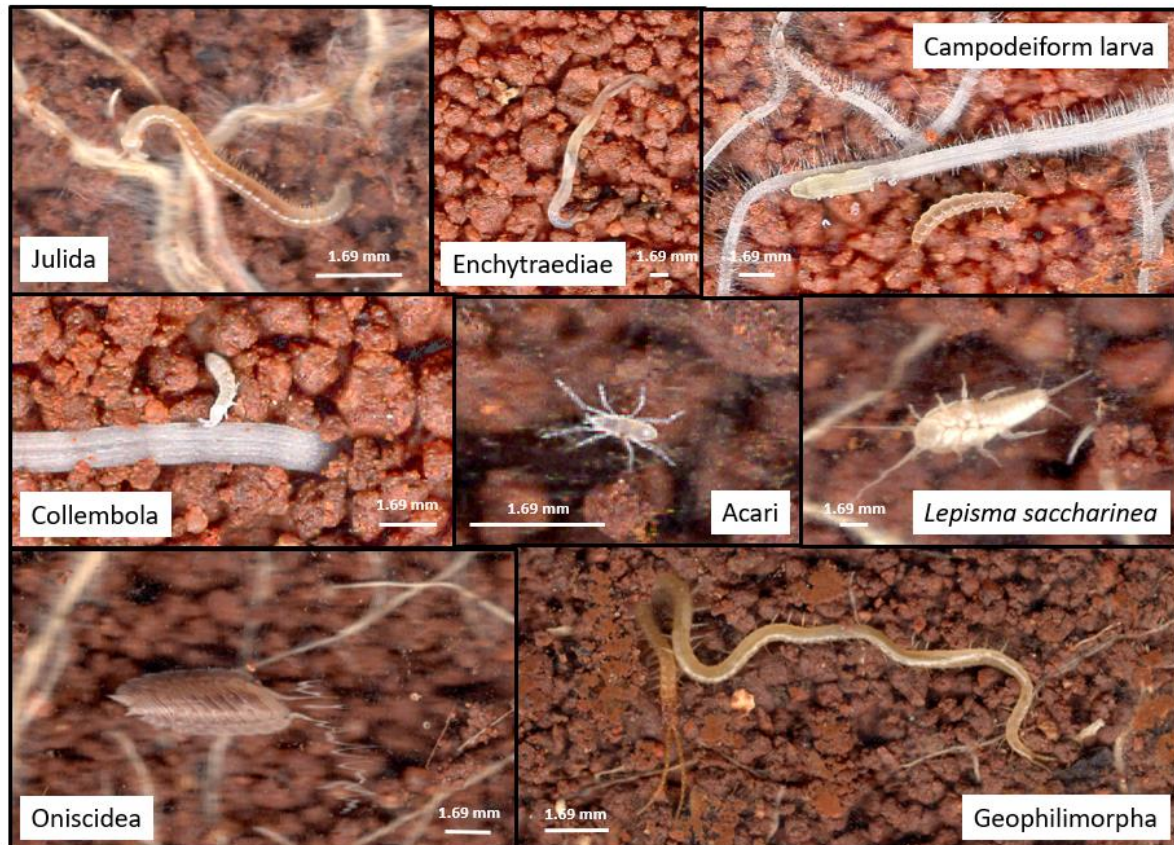


Fig. IV-15 Examples of identified soil organisms on the scanners.

2.4. Root litterbags experiment

To compare with the optical scanner-based image analysis method, a root litterbags experiment was conducted in the same place and during the same period. In May 2021 (flowering stage of the barley), barley roots were sampled between 0 and 20 cm of depth. Roots were washed on a 0.5 mm sieve and dried at 50°C for 72 hours. Then, 1g of the dried root sample was burned at 500°C for 4 hours to remove organic matter and obtain the mineral ash mass remaining in the root litter samples. Then, subsamples of 1.2 g of the dry roots were inserted in 36 nylon screens: 2 mesh sizes (5 and 0.6 mm) × 3 replicates × 6 sampling dates. The mesh size 5 mm allowed all mesofauna and small macrofauna decomposers to penetrate the litterbags and participate to root decomposition, while the root decomposition in the 0.6 mm mesh size was supposed to be mostly mediated by leaching and microbial activities (Lecerf 2017). Immediately after crop harvest on June, 30th 2021, all root litterbags were buried at 20 cm of depth at the vicinity of the scanners (at least 50 cm away from them to avoid perturbations). Litterbags sampling occurred on July, 29th 2021 (+1 month), August, 26th 2021 (+2 months), October 27th 2021 (+4 months), December 09th 2021 (+5.5 months), February 17th 2022 (+7.5 months) and July, 13th

2022 (+11.5 months). After litterbag sampling, the remaining root litter was retrieved and cleared from the soil particles and dried at 50°C for 72 hours. Ash corrections were made to remove soil particles contamination by burning the sample at 500°C for 4 hours. The remaining root dry mass in the litterbags was calculated as a percentage of the initial root dry mass. For the litterbags sampled at +1, +2 and +4 months, a subsample of the remaining root litter was spread out in a transparent bin with deionized water and scanned at 300 dpi with a scanner (Epson Expression © 10000 XL). The resulting images were processed with image analysis software (WinRHIZO v. 2021 Regent, Canada©) for each scanned sample, allowing us to determine the total root length (cm), volume (cm³) and the average root diameter (mm). The root tissue density was calculated for each scanned sample. The litterbags sampled at +4 months of decomposition could not be scanned because their content was not in sufficient conditions to come through the scanning process. Because the decomposition kinetic stagnated after November 2021 (see Results section), the root tissue density was assumed to be equal at +4 months than at +3 months, and the remaining root volume at +4 months could thus be calculated from the remaining mass.

In addition, anatomical measurements were processed on additional fresh sampled root (n = 30 pseudo-replicated roots × 3 replicated plots × 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm)) for a characterization of the initial pool of roots used in the litterbags. Immediately after sampling, the roots were cut with a razor blade. Root cross sections were colored with Carmine and Iodine green (Mondolot et al. 2001) and observed through the microscope with a x10 objective. The images were captured with a camera and saved for ulterior analysis. The total root diameter and the stele diameter measurements were conducted with the ImageJ software (Java 1.8.0_172, 64-bit). The stelediameter:total root diameter ratio was calculated (Supplementary Fig. IV-3). This ratio allowed us to calculate the average stele diameter in the initial pool of roots in the litterbags from their initial average root diameter.

2.5. Data analyses

For the root litterbags method, the remaining dry mass according to a time axis for each mesh size and replicate directly gave the root decomposition kinetics.

The optical scanner-based image analysis method gave access to the root diameter (Supplementary Fig. IV-4) and the root length (Supplementary Fig. IV-5) according to time for each individual.

In order to obtain the root decomposition kinetics, the root volume at each date and for each root was calculated as for cylinders:

$$V = \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times L$$

where V is the remaining root volume (mm^3), D is the remaining root diameter (mm) and L is the remaining root length (mm).

For the root diameter, volume and dry mass loss according to time, the exponential model of Olson (1963) was used as:

$$X_t = X_0 \times e^{-kt}$$

where X_t and X_0 represent the variable (diameter, volume and dry mass) at time t and initially respectively and k is the decomposition rate of the X loss.

Then, k_{diameter} was represented according to the initial root diameter (Fig. IV-16) and a piecewise regression model was fitted with the package “segmented”, finding a breakpoint for an initial root diameter of 0.309 mm. As a consequence, the breakpoint of 0.3 mm was used as an additional factor impacting root decomposition in this study: roots with initial diameter < or > than 0.3 mm.

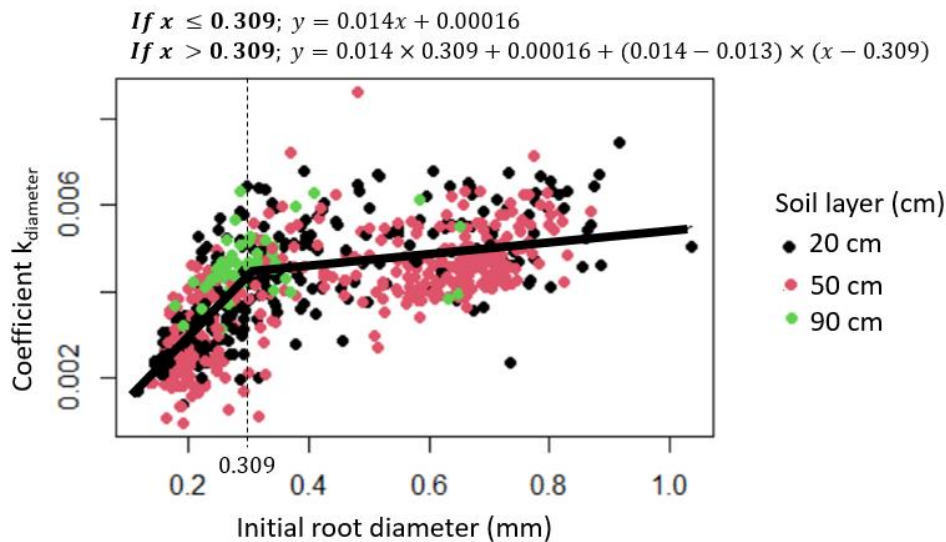


Fig. IV-16 Coefficient k of the diameter loss kinetics according to the initial root diameter class in each soil layer (20, 50 and 90 cm). Each point represents one root.

All statistical analyses were processed with the R software (version 4.0.0) (R Core Team 2020). Statistics were conducted on a data set rid of the soil layer 90 cm, because only 1 replicated

scanner at this depth had been reached by the roots. Layers from the same soil profile were considered as dependent from each other. Several linear mixed models were fitted with the three replicated soil profiles as random factors. In the scanner, the effect of soil layer was tested on the initial root diameter, the initial stele diameter and stele : total diameter ratio. The effects of soil layer, the period (before and after harvest), the initial root diameter class and their interactions were tested on the total root length loss. The effects of the soil layer, the root diameter class and their interactions were tested on the root diameter loss, the root volume loss and the decomposition rates. In the litterbags, the effect of the mesh size was tested on the root mass and the root volume losses. For all the linear mixed models and analyses of variance, lme4 and car packages were used. The normality of the residues was always verified with a Shapiro-Wilk test and the homogeneity of the variances with a Bartlett test. When necessary (variance homogeneity p-values < 5%), logarithmic, square root, Box-Cox or Yeo Johnson transformations were applied. Post-hoc Tukey tests allowed to evince significance of the differences between each category.

3. Results

3.1. Initial pool of roots

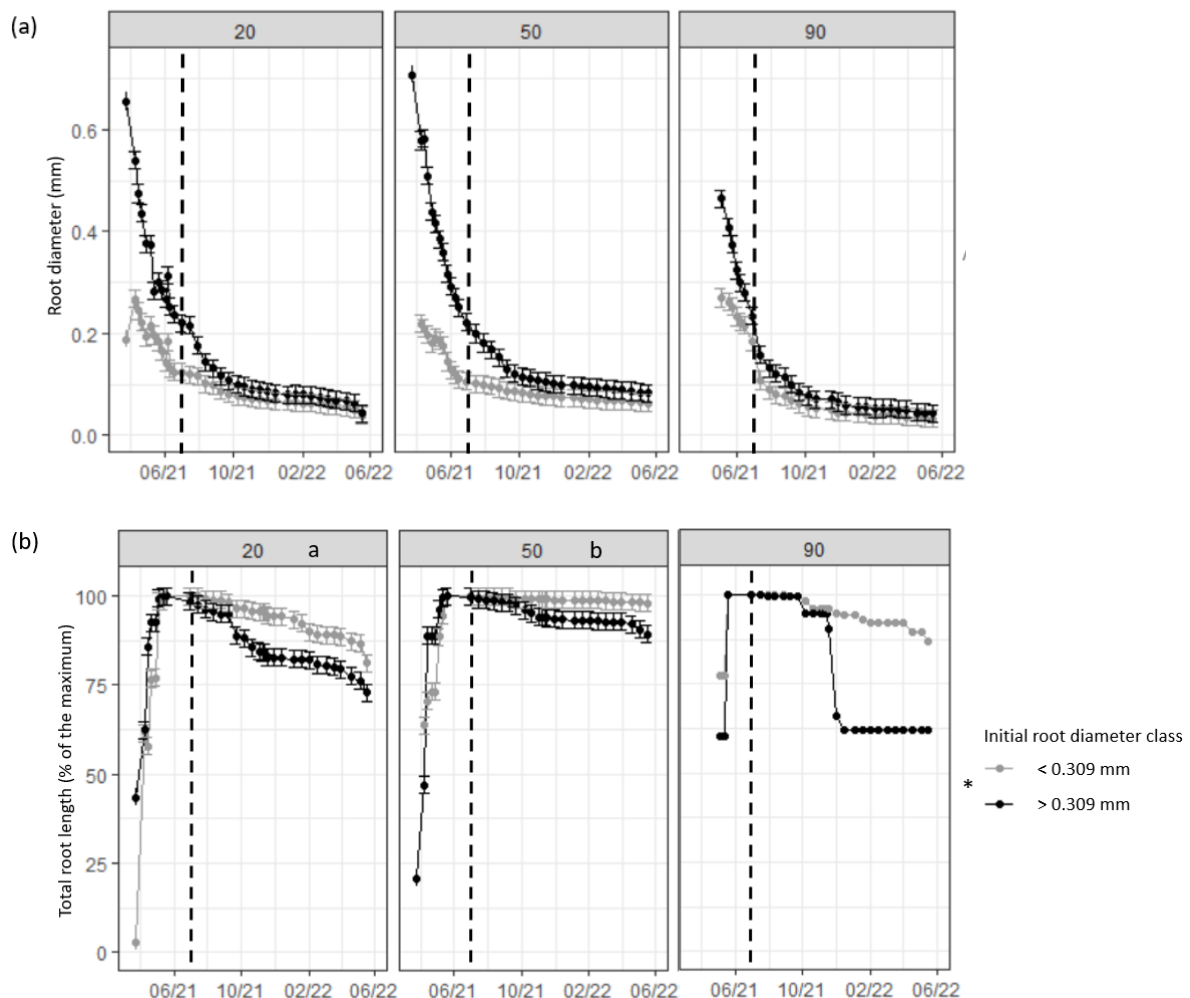
The initial pools of roots were different according to the two methods (Table IV-5). In the litterbags, the roots had a higher average diameter (0.65 mm) than in the scanners (0.41 ± 0.17 mm), which presented no difference according to the soil layer (p-value = 0.78, Supplementary Table IV-3). Furthermore in the scanners, the ratio stele : total diameter did not change according to the initial root diameter (Supplementary Fig. IV-6).

Table IV-5 Initial characterization of the pools of roots in each method (litterbags and scanners) and soil layer (20, 50 and 90 cm). Data are mean values \pm standard deviations.

	Litterbags	Scanners		
	0-20	20	50	90
Soil depth (cm)	0-20	20	50	90
n	1 pool	3 \times 30	3 \times 30	1 \times 30
Initial average root diameter (mm)	0.65	0.41 ± 0.21	0.46 ± 0.22	0.31 ± 0.10
Stele diameter (mm)	0.25	0.18 ± 0.11	0.17 ± 0.08	0.14 ± 0.06
Ratio stele : total diameter (%)	38.5	41.8 ± 19.6	39.1 ± 11.8	45.7 ± 21.7

3.2. Root decomposition with the scanners method

On the scanners, three measurements on roots could be tracked according to time (Fig. IV-17). The root diameter loss started from the apparition of the root, i.e. before crop harvest (Fig. IV-17a), while the root length still increased until end of May 2021, meaning that the root length grow was more important than the length losses, followed by length losses from June to the end of the experiment (Fig. IV-17b). The root volume according to time resulted from these two measurements (Fig. IV-17c). The roots classified with an initial diameter < 0.309 mm decomposed more slowly in diameter (p -value = 7.99×10^{-13}) and in length (2.40×10^{-2}) than the larger roots. The soil layer had no significant impact on root diameter nor volume losses (Supplementary Table IV-3), but the root loss length more rapidly at 20 than at 50 cm of depth (p -value = 5.35×10^{-3}).



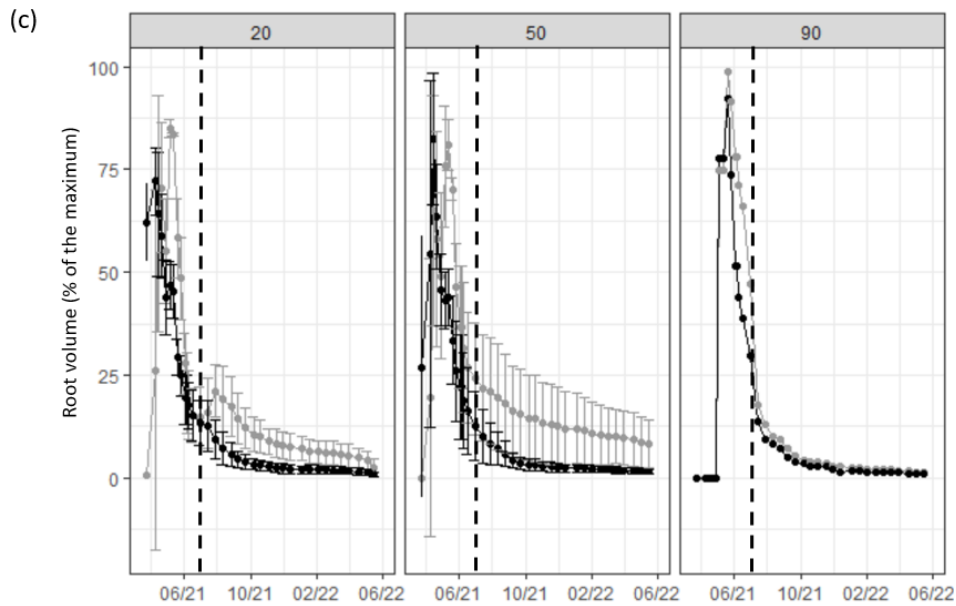


Fig. IV-17 Measurements on the scanners – Root diameter (mm, a), total root length on each scanner (as a percentage of the maximum achieved, b) and root volume (as a percentage of the initial, c) according to time (from March 2021 to July 2022) in each soil layer (20, 50 and 90 cm) and for each initial root diameter class (< and > 0.309 mm). The vertical dotted line represented the day of barley harvest (2021/06/30). Data are mean values and error bars represent the estimated standard error from the mixed effect model. In the legend, * indicated the significant differences between the initial root diameter classes for all graphs (a), (b) and (c). In (b), the lowercase letters indicated the significant differences between the soil layers after harvest.

3.3. Root decomposition with the litterbags method

The root mass and volume losses according to time in the litterbags were not significantly different according to the mesh size (Fig. IV-18, Supplementary Table IV-3). In addition, the root tissue density in the litterbags increased with time (Supplementary Fig. IV-7).

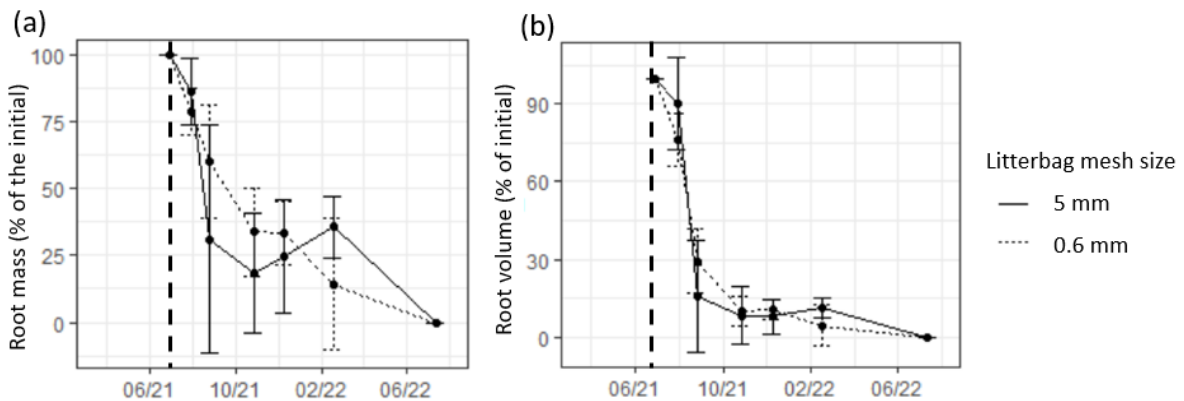


Fig. IV-18 Measurements on the litterbags – Remaining root mass (as a percentage of the initial pool, a) and root volume (as a percentage of the initial pool, b) according to time (from March 2021 to July 2022) at 20 cm of depth and for each litterbag mesh size (5 and 0.6 mm). The vertical dotted line represented the day of barley harvest (30/06/2021). Data are mean values and error bars represent standard deviation (n = 3).

3.4. Factors of the decomposition

The decomposition rates of the volume loss were significantly higher in the litterbags (0.02 to 0.03, Fig. IV-19a and b) than in the scanners (0.005 to 0.02, Fig. IV-19c, statistics not shown).

In the scanner, the decomposition rate increased with the initial root diameter with a breakpoint at 0.329 mm (Fig. IV-19a). This increase was stronger for thinner (< 0.3 mm) than for larger ($0.3 < 1$ mm) roots. The soil layer and the initial root diameter class had an interacting effect on the decomposition rate (p -value = 8.51×10^{-3}). While the decomposition rate was higher for larger than for thinner roots at all depths, it was higher at 20 than at 50 cm for the thinner roots and equivalent at all depths for the larger roots (Supplementary Fig. IV-8).

Furthermore, the decomposition rate decreased linearly with increasing stele : total root diameter ratio (Fig. IV-19b). By contrast to the root traits, no relation could be established between the soil temperature and moisture and the root decomposition (Supplementary Fig. IV-9).

In the litterbags, the decomposition rate was measured for a pool of root instead of for each individuals and could thus not be related to the initial root characterization (Fig. IV-19c). The litterbag mesh size did not impact the decomposition rate (p -value = 0.94, Supplementary Table IV-3).

$$\text{If } x \leq 0.329; y = 0.033x + 0.0014$$

$$\text{If } x > 0.329; y = 0.0039x + 0.011$$

$$R^2 = 0.48$$

$$y = -0.017x + 0.018$$

$$R^2 = 0.41$$

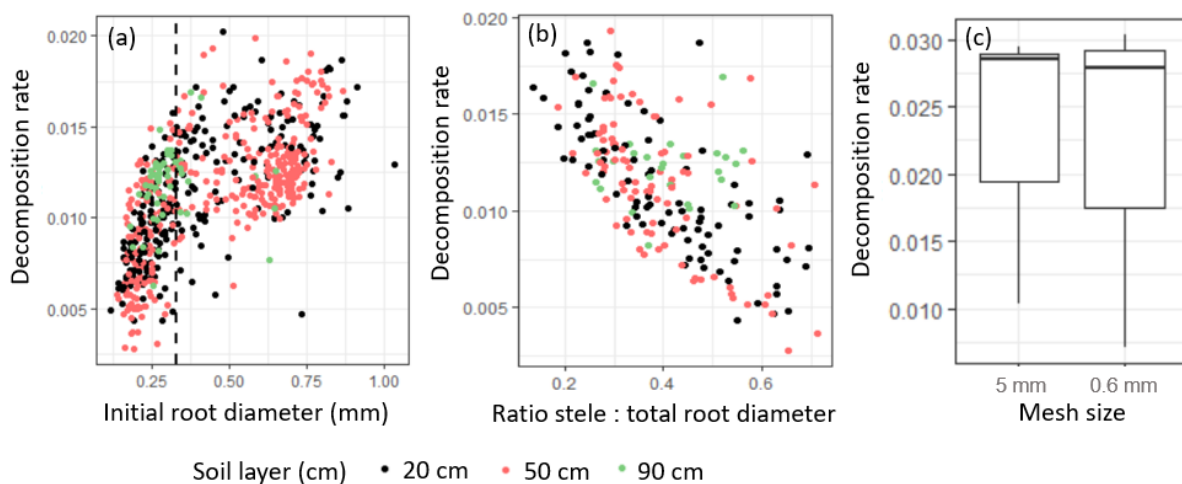


Fig. IV-19 Decomposition rate (loss of root volume) from the scanner experimentation according to the initial root diameter (a) and to the ratio stele : total root diameter (b) in each soil layer (20, 50 and 90 cm) and from the litterbag experimentation (c) according to the mesh size (5 and 0.6 mm) ($n=3$). In (a) and (b), each point represents one root.

Only mesofauna and no macrofauna were identified in the scanners. The observations showed an active soil fauna during Spring and Autumn (Fig. IV-20 and Supplementary Fig. IV-10). Collembola was the most representative group, followed by enchytraeidae and acari. Except the collembola, that were almost twice more important at 20 than at 50 cm of depth, the other organisms seemed to be equivalent in these two layers (Fig. IV-20).

Despite these observations, no relation between the soil fauna and the root decomposition could be deduced (Supplementary Fig. IV-11 to 13).

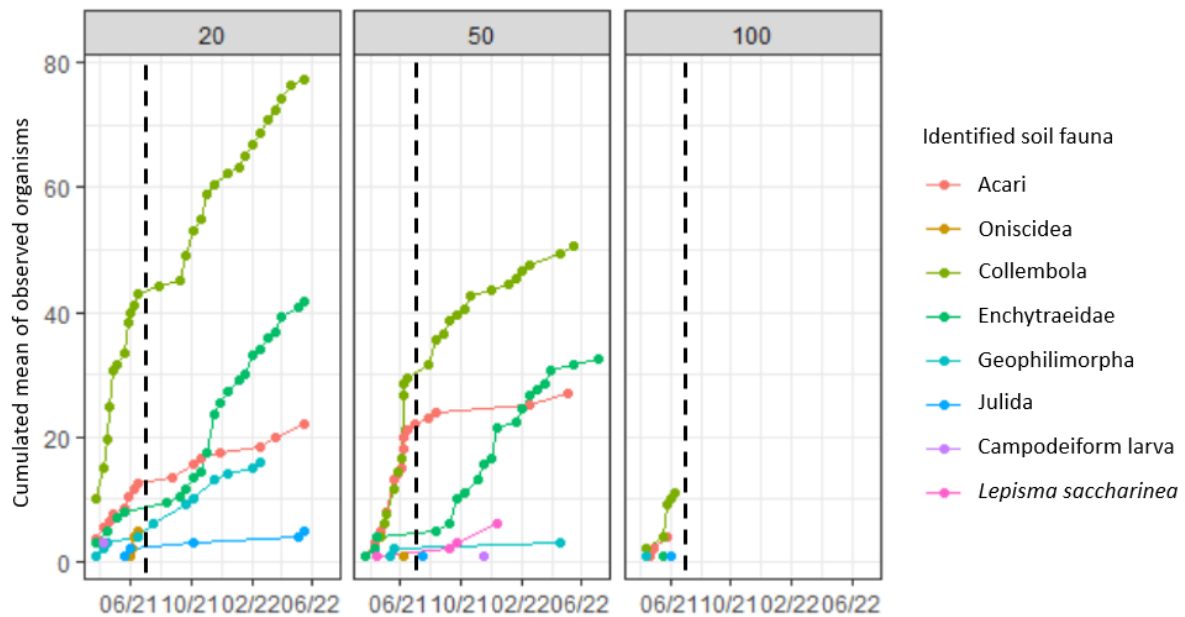


Fig. IV-20 Cumulated mean of the number of observed soil organisms according to time (from March 2021 to July 2022) in each soil layer (20, 50 and 90 cm). Data are mean values ($n = 3$ for the layers at 20 and 50 cm and $n = 1$ for the layer at 90 cm). The vertical dotted line represented the day of barley harvest (30/06/2021).

4. Discussion

As expected, the optical scanner-based image analysis allowed to assess in situ root decomposition. More specifically, several differences with the classic method of the root litterbags were encountered. First, the initial pool of root was different between the two methods. In the scanners, roots were grown and tracked in their natural environment i.e. in their original soil layer, and no manipulation of the soil had been processed since the scanner burial (before seeding). By contrast, the litterbags method request numerous processing of the roots such as sampling, washing, drying (Li et al. 2022). It resulted in average larger roots in the litterbags than in the scanners, suggesting an involuntary selection by the human eyes or hands. Furthermore, the main result of the scanner based image analysis was that in May, date of root sampling for the litterbags, the roots had already loss 40% of their initial volume,

meaning that the litterbags experimentation started with already decomposed root litter. The fact that root decomposition starts as soon as the root appears in the soil could be explained by the rhizodeposits emitted by roots in their period of high activity, during plant growing until flowering, which would attract soil organisms and thus enhance decomposition (Nguyen 2009; Hassan et al. 2019; Tian et al. 2020). Second, the scanners method allowed a complementary analysis of the root decomposition to the litterbags method. In the litterbags, the mass and the volume losses were assessed for pools of roots, while in the scanners, the diameter and the length losses were measured and the volume loss was calculated from these variables for each studied individual root. Third, the scanner method avoid any soil or root disturbance, which explained the lower root decomposition rates compared to the litterbags, that were brought into contact with oxygen when burying them, thus enhancing microbial activity and decomposition.

The individual tracking in the scanners highlighted an increasing decomposition rate with increasing initial root diameter, as already stated (Sun et al. 2016; Lin and Zeng 2017). The scanner based analysis allowed to link the decomposition rate to the initial root diameter and to determine a breakpoint at 0.3 mm, adding precision to the previous studies, that separated the root according to their branching order before starting the decomposition experimentation (Fan and Guo 2010; Sun et al. 2016). Compared to roots with an initial diameter > 0.3 mm i.e. exploration roots, slower decay of roots with a smaller diameter (Han et al. 2019) < 0.3 mm i.e. absorptive roots could be due to higher concentrations of soluble compounds (Fan and Guo 2010; Lin and Zeng 2017), for example phenols (Wang et al. 2015), which are labile compounds easy to decompose. Furthermore, the decomposition rate decreased with increasing initial stele : total diameter ratio. Indeed, on the images acquired by the scanners, we could see the parenchymal cortex disappearing gradually (Fig. IV-14b) and leaving a perfectly visible stele, thus more recalcitrant to decomposition. The stele represent a chemical and a physical barrier (larger cells, numerous vessels and thus highly lignified) for the soil macro-, meso- and microorganisms, and remained in the soil almost one year with very slow decomposition (Spaeth and Cortes 1995).

The role of soil fauna in root decomposition could be evaluated in both methods but in different ways. In the litterbags experiment, the mesh size allowed to exclude part of the soil fauna (Lecerf 2017). The absence of difference between the two tested mesh sizes could be due to the low concentrations of soil meso- and macrofauna in this site because of the historical intensive agriculture (Filser et al. 1995; Menta 2017). The impact of soil fauna was difficult to analyse on the scanners method due to insufficient acquisitions in time regarding the movement speed

of the organisms. Future studies aiming at linking the root decomposition to the soil meso- and macrofauna should increase the frequency of acquisitions. However, our study still identified some mesofauna (enchytreidae, collembola and acari), susceptible to participate to root decomposition (Fujii et al. 2018). When comparing their size to the roots (Fig. IV-15), it is difficult to believe that these organisms are responsible for the loss of entire root segments. We speculated that (i) other organisms such as worms were responsible for length loss as root fragments had already been found in their digestive system (Curry and Schmidt 2007), but we could not observe them on the images due to their rapid movements, only their galleries were visible (Fig. IV-14a) and (ii) microorganisms such as fungi could be attracted by a root after its attack by some mesofauna and be responsible for length loss. Further studies are strongly needed to assess the fate of root C after being ingested by the macro- and mesofauna and how they contribute to soil C storage and to soil biodiversity by being a resource for the soil organisms according to their initial diameter.

While soil depth has been widely recognized as major factor on root decomposition along the soil profile (Pries et al. 2018; Siegwart et al. 2022), the impact of soil depth on root decomposition in the present study was surprisingly only visible for the roots initially < 0.3 mm, with a higher decomposition rate at 20 than at 50 cm of depth. Soil depth did not have any significant impact on root decomposition for larger roots (between 0.3 and 1 mm), on the root initial diameter nor on soil fauna observations in the present study. It could be explained by the similarities of soil temperature and moisture variations across the year between all three studied layers of this Mediterranean field. Furthermore, no relation could be found between root decomposition and soil temperature nor moisture, confirming the main role of root diameter on decomposition in this dry environment.

5. Conclusion

The optical scanner based image analysis for root decomposition assessment is an innovative method giving access to complementary information compared to the classic root litterbags, which presented higher values of root decomposition rates than the scanners due to experimental bias. The individual root analysis showed that root decomposition significantly increased with increasing root initial diameter. Surprisingly, soil depth only affected the decomposition of roots < 0.3 mm and not the larger ones, due to similar soil temperature and moisture conditions across the layers in this Mediterranean field. Furthermore, the decomposition started as soon as the roots appear in the soil, suggesting that when using the classic litterbags method, the roots might already been in an advanced stage of decomposition

at the start of the experiment. The optical scanner based image analysis represents an alternative to root litterbags, as an in situ measure without any disturbance of roots nor soil. This method could be reuse for other species and the images acquisition frequency should be increased when aiming to study soil meso- and macrofauna.

References

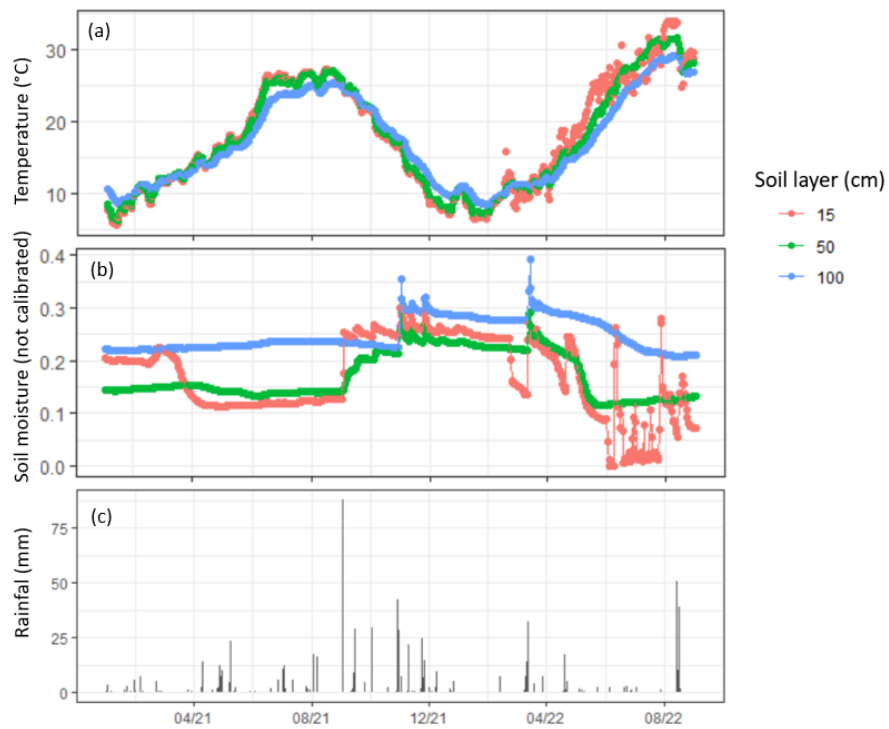
- Balesdent J, Balabane M (1996) Major contribution of roots to soil carbon storage inferred from maize cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 28:1261–1263. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(96\)00112-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(96)00112-5)
- Bertrand I, Chabbert B, Kurek B, Recous S (2006) Can the Biochemical Features and Histology of Wheat Residues Explain their Decomposition in Soil? *Plant Soil* 281:291–307. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-4628-7>
- Blume E, Bischoff M, Reichert JM, Moorman T, Konopka A, Turco RF (2002) Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology* 20:171–181. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00025-2)
- Cardinael R, Guenet B, Chevallier T, Dupraz C, Cozzi T, Chenu C (2018) High organic inputs explain shallow and deep SOC storage in a long-term agroforestry system – combining experimental and modeling approaches. *Biogeosciences* 15:297–317. <https://doi.org/10.5194/bg-15-297-2018>
- Cheng W, Coleman DC, Box JE (1991) Measuring root turnover using the minirhizotron technique. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 34:261–267. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(91\)90113-C](https://doi.org/10.1016/0167-8809(91)90113-C)
- Curry JP, Schmidt O (2007) The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia* 50:463–477. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.09.001>
- Dannoura M, Kominami Y, Oguma H, Kanazawa Y (2008) The development of an optical scanner method for observation of plant root dynamics. *Plant Root* 2:14–18. <https://doi.org/10.3117/plantroot.2.14>
- Doblas-Miranda E, Sánchez-Piñero F, González-Megías A (2009) Vertical distribution of soil macrofauna in an arid ecosystem: Are litter and belowground compartmentalized habitats? *Pedobiologia* 52:361–373. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.11.006>
- Fan P, Guo D (2010) Slow decomposition of lower order roots: a key mechanism of root carbon and nutrient retention in the soil. *Oecologia* 163:509–515. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1541-4>
- Fang C, Moncrieff JB (2005) The variation of soil microbial respiration with depth in relation to soil carbon composition. *Plant Soil* 268:243–253. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0278-4>
- Filser J, Fromm H, Nagel RF, Winter K (1995) Effects of previous intensive agricultural management on microorganisms and the biodiversity of soil fauna. *Plant Soil* 170:123–129. <https://doi.org/10.1007/BF02183060>
- Freschet GT, Cornwell WK, Wardle DA, Elumeeva TG, Liu W, Jackson BG, Onipchenko VG, Soudzilovskaia NA, Tao J, Cornelissen JHC (2013) Linking litter decomposition of above- and below-ground organs to plant-soil feedbacks worldwide. *J Ecol* 101:943–952. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12092>
- Freschet GT, Valverde-Barrantes OJ, Tucker CM, Craine JM, McCormack ML, Violle C, Fort F, Blackwood CB, Urban-Mead KR, Iversen CM, Bonis A, Comas LH, Cornelissen JHC, Dong M, Guo D, Hobbie SE, Holdaway RJ, Kembel SW, Makita N, Onipchenko VG, Picon-Cochard C, Reich PB, de la Riva EG, Smith SW, Soudzilovskaia NA, Tjoelker MG, Wardle DA, Roumet

- C (2017) Climate, soil and plant functional types as drivers of global fine-root trait variation. *Journal of Ecology* 105:1182–1196. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12769>
- Fujii S, Cornelissen JHC, Berg MP, Mori AS (2018) Tree leaf and root traits mediate soil faunal contribution to litter decomposition across an elevational gradient. *Functional Ecology* 32:840–852. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13027>
- Gan YT, Campbell CA, Janzen HH, Lemke R, Liu LP, Basnyat P, McDonald CL (2009) Root mass for oilseed and pulse crops: Growth and distribution in the soil profile. *Can J Plant Sci* 89:883–893. <https://doi.org/10.4141/CJPS08154>
- Gill RA, Burke IC (2002) Influence of soil depth on the decomposition of *Bouteloua gracilis* roots in the shortgrass steppe. *Plant and Soil* 241:233–242. <https://doi.org/10.1023/A:1016146805542>
- Han SH, Kim S, Chang H, Kim H-J, Khamzina A, Son Y (2019) Soil depth- and root diameter-related variations affect root decomposition in temperate pine and oak forests. *Journal of Plant Ecology* 12:871–881. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtz023>
- Harrison RB, Footen PW, Strahm BD (2011) Deep Soil Horizons: Contribution and Importance to Soil Carbon Pools and in Assessing Whole-Ecosystem Response to Management and Global Change. *Forest Science* 57:67–76. <https://doi.org/10.1093/forestscience/57.1.67>
- Hassan MK, McInroy JA, Kloepper JW (2019) The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture* 9:142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>
- Hirte J, Leifeld J, Abiven S, Oberholzer H-R, Mayer J (2018) Below ground carbon inputs to soil via root biomass and rhizodeposition of field-grown maize and wheat at harvest are independent of net primary productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 265:556–566. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.010>
- IUSS Working group WRB (2014) World reference base for soil resources 2014: international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome
- Kumar R, Pandey S, Pandey A (2006) Plant roots and carbon sequestration. *Current Science* 91:885–890
- Lavahun MFE, Joergensen RG, Meyer B (1996) Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. *Biol Fertil Soils* 23:38–42. <https://doi.org/10.1007/BF00335816>
- Lecerf A (2017) Methods for estimating the effect of litterbag mesh size on decomposition. *Ecological Modelling* 362:65–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2017.08.011>
- Li X, Minick KJ, Li T, Williamson JC, Gavazzi M, McNulty S, King JS (2020) An improved method for quantifying total fine root decomposition in plantation forests combining measurements of soil coring and minirhizotrons with a mass balance model. *Tree Physiology* 40:1466–1473. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa074>
- Li X, Zheng X, Zhou Q, McNulty S, King JS (2022) Measurements of fine root decomposition rate: Method matters. *Soil Biology and Biochemistry* 164:108482. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108482>
- Liao C, Long C, Zhang Q, Cheng X (2022) Stronger effect of litter quality than micro-organisms on leaf and root litter C and N loss at different decomposition stages following a subtropical land use change. *Functional Ecology* 36:896–907. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13999>

- Lin D, Dou P, Yang G, Qian S, Wang H, Zhao L, Yang Y, Mi X, Ma K, Fanin N (2020) Home-field advantage of litter decomposition differs between leaves and fine roots. *New Phytol* 165:16517. <https://doi.org/10.1111/nph.16517>
- Lin G, Zeng D-H (2017) Heterogeneity in decomposition rates and annual litter inputs within fine-root architecture of tree species: Implications for forest soil carbon accumulation. *Forest Ecology and Management* 389:386–394. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.01.012>
- Majdi H (1996) Root sampling methods - applications and limitations of the minirhizotron technique. *Plant Soil* 185:255–258. <https://doi.org/10.1007/BF02257530>
- Menta C (2017) Agriculture Management and Soil Fauna Monitoring: The Case of Emilia-Romagna Region (Italy). *ARTOAJ* 4. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.04.555649>
- Mondolot L, Roussel J-L, Andary C (2001) New Applications for an Old Lignified Element Staining Reagent. *Histochem J* 33:379–385. <https://doi.org/10.1023/A:1013798426161>
- Moorhead DL, Sinsabaugh RL (2006) A Theoretical Model of Litter Decay and Microbial Interaction. *Ecological Monographs* 76:151–174. [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(2006\)076\[0151:ATMOLD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(2006)076[0151:ATMOLD]2.0.CO;2)
- Nakhforoosh A, Nagel KA, Fiorani F, Bodner G (2021) Deep soil exploration vs. topsoil exploitation: distinctive rooting strategies between wheat landraces and wild relatives. *Plant Soil* 459:397–421. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04794-9>
- Nguyen C (2009) Rhizodeposition of Organic C by Plant: Mechanisms and Controls. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P, Véronique S, Alberola C (eds) *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 97–123
- Nicoullaud B (1995) Étude de l'enracinement du blé tendre d'hiver et du maïs dans les sols argilo-limoneux de Petite Beauce. *Étude et Gestion des Sols* 18
- Olson JS (1963) Energy Storage and the Balance of Producers and Decomposers in Ecological Systems. *Ecology* 44:322–331. <https://doi.org/10.2307/1932179>
- Pries CEH, Sulman BN, West C, O'Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Prieto I, Roumet C, Cardinael R, Dupraz C, Jourdan C, Kim JH, Maeght JL, Mao Z, Pierret A, Portillo N, Roupsard O, Thammahacksa C, Stokes A (2015) Root functional parameters along a land-use gradient: evidence of a community-level economics spectrum. *Journal of Ecology* 103:361–373. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12351>
- R Core Team (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*
- Siegwart L, Bertrand I, Roupsard O, Duthoit M, Jourdan C (2022) Root litter decomposition in a sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *Faidherbia albida*. *Journal of Arid Environments* 198:104696. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104696>
- Silver WL, Miya RK (2001) Global patterns in root decomposition: comparisons of climate and litter quality effects. *Oecologia* 129:407–419. <https://doi.org/10.1007/s004420100740>
- Sinsabaugh RL, Antibus RK, Linkins AE (1991) An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 34:43–54. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(91\)90092-C](https://doi.org/10.1016/0167-8809(91)90092-C)

- Smith A (1932) Seasonal subsoil temperature variations. *Journal of Agricultural Research* 44:421–428
- Solly EF, Schöning I, Herold N, Trumbore SE, Schrumpf M (2015) No depth-dependence of fine root litter decomposition in temperate beech forest soils. *Plant Soil* 393:273–282. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2492-7>
- Spaeth SC, Cortes PM (1995) Root cortex death and subsequent initiation and growth of lateral roots from bare steles of chickpeas. *Can J Bot* 73:253–261. <https://doi.org/10.1139/b95-028>
- Suárez LR, Josa YTP, Samboni EJA, Cifuentes KDL, Bautista EHD, Salazar JCS (2018) Soil macrofauna under different land uses in the Colombian Amazon. *Pesq agropec bras* 53:1383–1391. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018001200011>
- Sun T, Dong L, Zhang L, Wu Z, Wang Q, Li Y, Zhang H, Wang Z (2016) Early Stage Fine-Root Decomposition and Its Relationship with Root Order and Soil Depth in a *Larix gmelinii* Plantation. *Forests* 7:234. <https://doi.org/10.3390/f7100234>
- Sun T, Mao Z, Dong L, Hou L, Song Y, Wang X (2013) Further evidence for slow decomposition of very fine roots using two methods: litterbags and intact cores. *Plant Soil* 366:633–646. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1457-3>
- Tian T, Reverdy A, She Q, Sun B, Chai Y (2020) The role of rhizodeposits in shaping rhizomicrobiome. *Environmental Microbiology Reports* 12:160–172. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12816>
- Wang J-J, Tharayil N, Chow AT, Suseela V, Zeng H (2015) Phenolic profile within the fine-root branching orders of an evergreen species highlights a disconnect in root tissue quality predicted by elemental- and molecular-level carbon composition. *New Phytologist* 206:1261–1273. <https://doi.org/10.1111/nph.13385>
- Wang Y, Dong X, Wang H, Wang Z, Gu J (2016) Root tip morphology, anatomy, chemistry and potential hydraulic conductivity vary with soil depth in three temperate hardwood species. *Tree Physiol* 36:99–108. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv094>

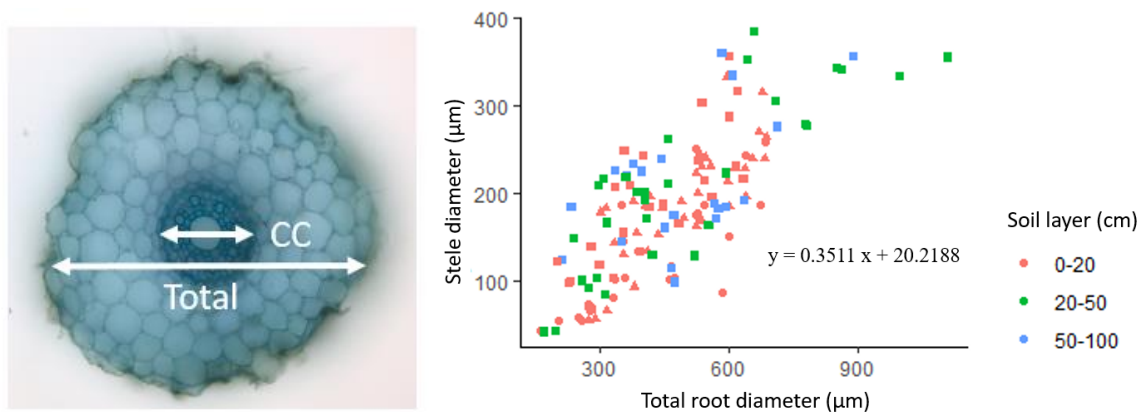
Supplementary Data



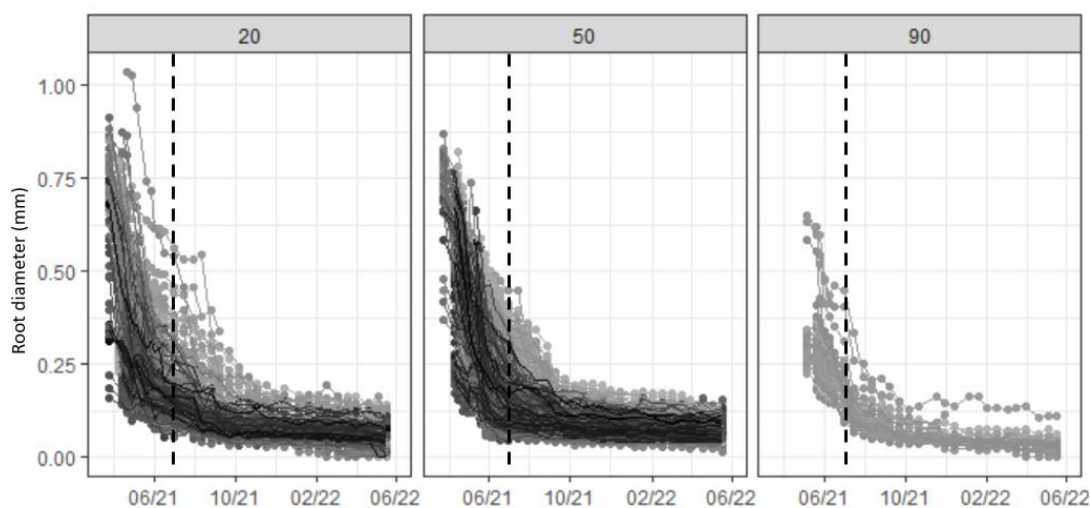
Supplementary Fig. IV-1 Dynamics of soil temperature (a), volumetric soil water content (b) and rainfall (c) over time according to soil depth (20, 50 and 100 cm) from 01/01/2021 to the end of the experiment. In a and b, data are mean values and error bars represent standard deviations ($n = 3$).



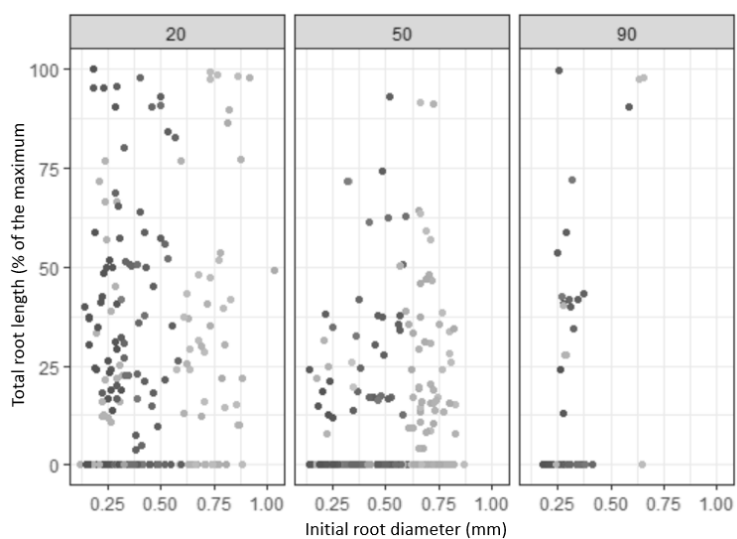
Supplementary Fig. IV-2 Image acquired by Scanner 1 (20 cm of depth) on May 19th, 2021.



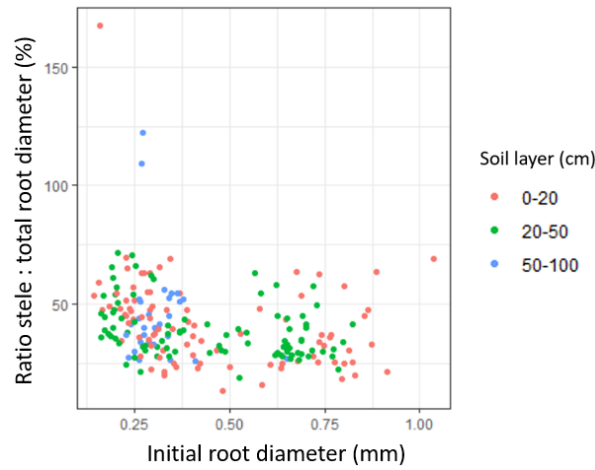
Supplementary Fig. IV-3 Stele diameter according to the total root diameter for each layer (0-20, 20-50 and 50-100 cm of depth) measured on roots sections.



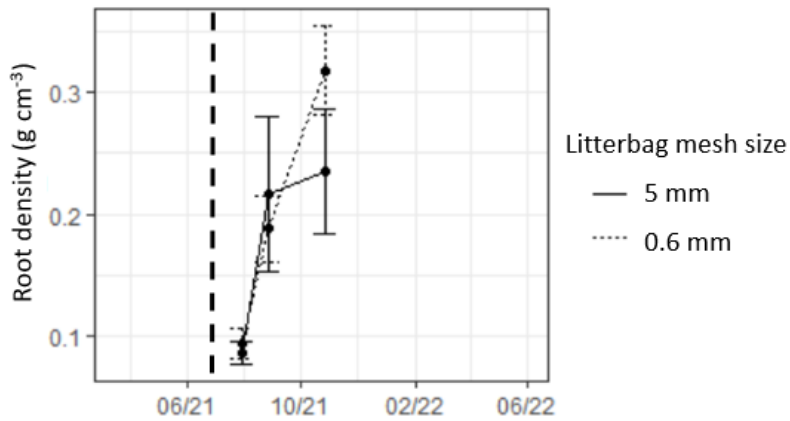
Supplementary Fig. IV-4 Root diameter (mm) according to time (from March 2021 to July 2022) in each soil layer (20, 50 and 90 cm). The vertical dotted line represented the day of barley harvest (30/06/2021). Each curve represents one root.



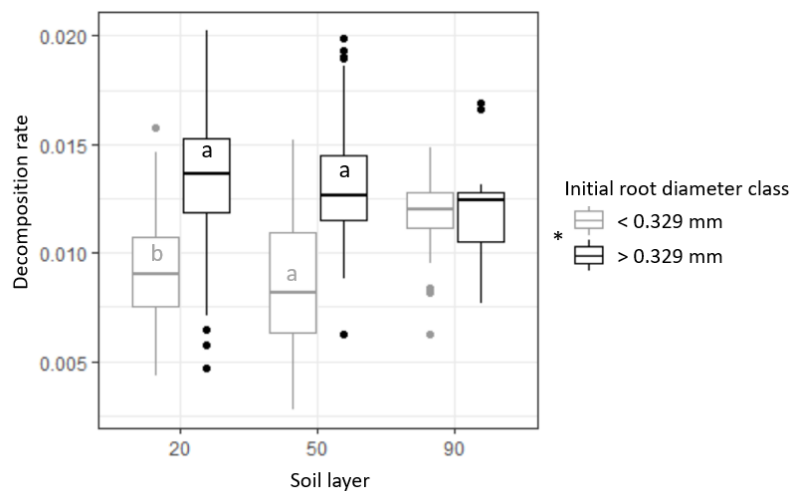
Supplementary Fig. IV-5 Total loss of root length as a percentage of the maximum achieved according to the initial root diameter in each soil layer (20, 50 and 90 cm). Each point corresponded to one root.



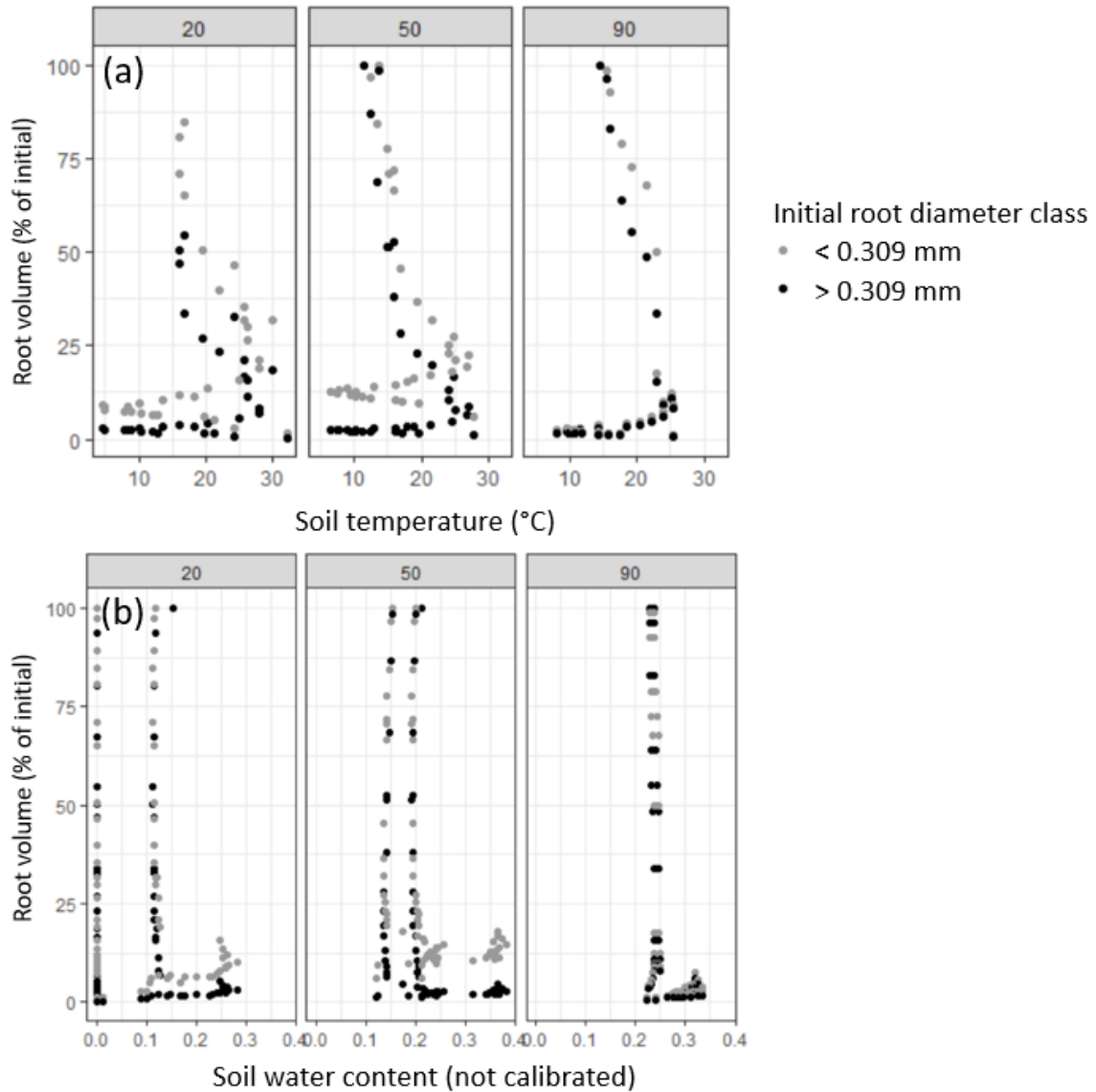
Supplementary Fig. IV-6 root stele:total root diameter ratio according to the initial root diameter in each soil layer (0-20, 20-50 and 50-100 cm of depth).



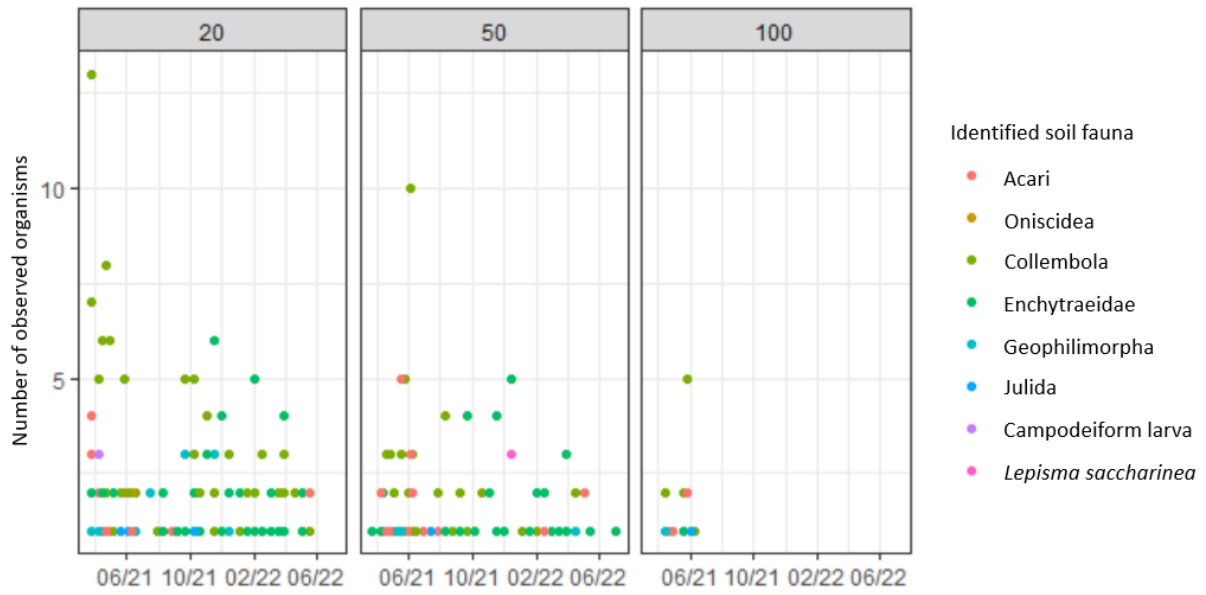
Supplementary Fig. IV-7 Root tissue density (g cm^{-3}) according to time (from March 2021 to July 2022) at 20 cm of depth and for each litterbag mesh size (5 and 0.6 mm). The vertical dotted line represented the day of barley harvest (30/06/2021). Data are mean values and error bars represent standard deviation ($n = 3$).



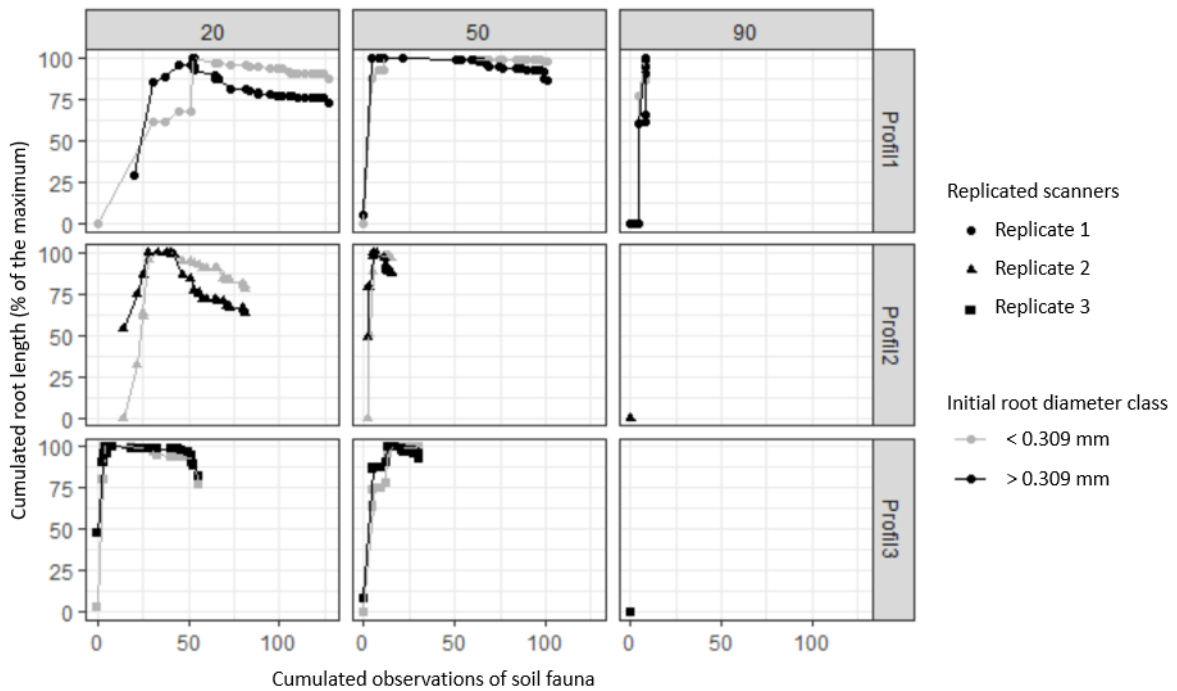
Supplementary Fig. IV-8 Decomposition rate (loss of root volume) from the scanner experimentation according to the initial root diameter in each soil layer (20, 50 and 90 cm) ($n=3$). * indicated the significant differences between the initial root diameter classes for all layers and the lowercase letters indicated the significant differences between the soil layers within the root diameter classes.



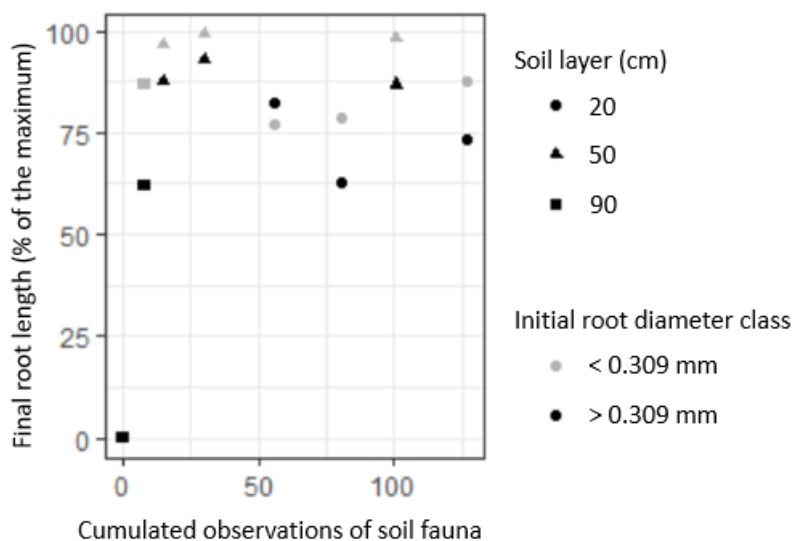
Supplementary Fig. IV-9 Root volume in the scanner according to soil temperature (a) and soil water content (b) for each initial root diameter class (< and > 0.3 mm) and in each soil layer (20, 50 and 90 cm).



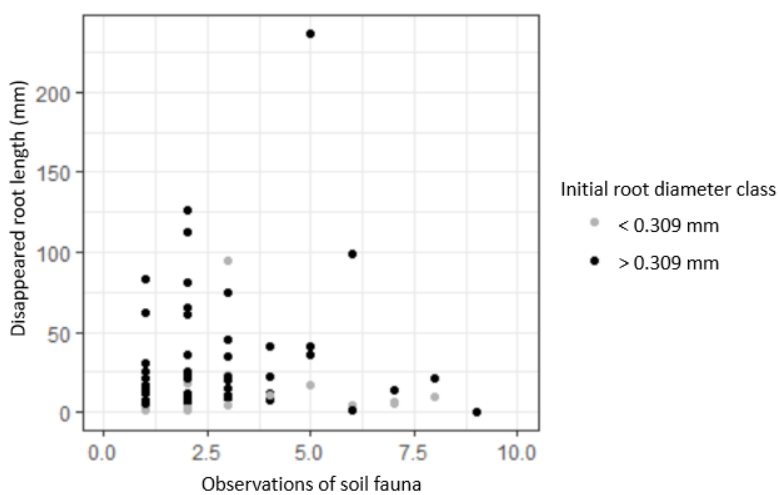
Supplementary Fig. IV-10 Observations of soil fauna according to time (from March 2021 to July 2022) in each soil layer (20, 50 and 90 cm). Each point state for one type of organism co-occurring with a root at a specific date.



Supplementary Fig. IV-11 Cumulated root length according to the cumulated observations of soil fauna co-occurring with roots for each scanner, in each soil layers (20, 50 and 90 cm of depth) and for each initial root diameter class (< and > 0.3 mm).



Supplementary Fig. IV-12 Final root length according to the total observations of soil fauna co-occurring with roots in each soil layers (20, 50 and 90 cm of depth) and for each initial root diameter class (< and > 0.3 mm) at the end of the experimentation.



Supplementary Table IV-3 Statistics

	Soil layer			
Initial root diameter (scanner)	0.78			
Stele diameter (scanner)	0.40			
Ratio stele : total root diameter (scanner)	0.24			

	Soil layer	Period	Root diameter class	Interaction
Total root length (scanner)	0.07	3.22×10^{-13}	0.09	Root diameter class : Period
				2.40×10^{-2}
				Soil layer : Period
				5.35×10^{-3}

	Soil layer	Root diameter class	Interaction
Root diameter (scanner)	0.43	7.99×10^{-13}	0.29
Root volume (scanners)	0.28	1.16×10^{-13}	0.46
Coefficient k of the root diameter loss kinetics (scanner)	2.39×10^{-7}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	1.63×10^{-6}
Coefficient k of the root volume loss kinetics (scanner)	0.35	$< 2.2 \times 10^{-16}$	8.51×10^{-3}

	Mesh size
Root mass (litterbags)	0.80
Root volume (litterbags)	0.94

Article 5

Carbon and nutrient colimitations control the microbial response to fresh organic carbon inputs in soil at different depths

Siegwart Lorène¹, Jourdan Christophe^{1,2}, Piel Clément³, Piton Gabin¹, Sauze Joana³, Sugihara Soh⁴, Bertrand Isabelle¹

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, InstitutAgro Montpellier, Montpellier, France

² CIRAD, UMR Eco&Sols, F-34398 Montpellier, France

³ ECOTRON Européen de Montpellier, UAR 3248 CNRS, 1 Chemin du Rioux, 34980 Montferrier sur Lez, France

⁴ Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan



Abstract

Despite the potential of subsoil carbon (C) to buffer or amplify climate change impacts, how fresh C and nutrients interact to control microbial effects on the C balance in deep soil horizons has yet to be determined. In this study, we aimed to estimate the actual impact of fresh C input at different soil depths on soil microbial activity. To conduct this study, Mediterranean soils from 3 layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm of depth) were incubated over 28 days. Carbon and nutrient fluxes were measured after the addition of an amount of C equivalent to the postharvest root litter derived-C of a barley crop (5% ^{13}C), with and without nitrogen and phosphorus. We found that topsoil was C limited while subsoil was C and N colimited. These variations in stoichiometric constraints along the soil profile induced different microbial responses to C and/or nutrient addition. A stronger priming effect was observed in the topsoil than in the subsoil, and the sole C addition induced a negative C balance. Conversely, subsoil showed a positive C balance following fresh C addition, changing to critical soil C losses when nutrients were supplied with C. Our results show that fresh C input to subsoil (e.g., through deep-rooting crops) might foster soil C sequestration, but this positive effect can be reversed if such C inputs are combined with high nutrient availability (e.g., through fertilization), alleviating microbial limitation at depth.

Abbreviations

C: carbon; CO_2 : carbon dioxide; CUE: carbon use efficiency; FOM: fresh organic matter; N: nitrogen; O_2 : dioxygen; P: phosphorus; PE: priming effect; BG: b-1,4-glucosidase; NAG: b-1,4-N-acetylglucosaminidase; LAP: leucine aminopeptidase; AP: alkaline phosphatase

1. Introduction

Increasing root biomass at depth has been suggested as a lever to foster soil C storage (Ojeda et al. 2018). In soil, the fates of litter-derived C and soil organic C depend on the microbial biomass, its metabolism and its resource acquisition strategy (Fontaine et al. 2007, Bernard et al. 2022). The CO₂ emissions from soil organic C decomposition following fresh organic matter (FOM) supply is the process called the priming effect (PE) (Kuzyakov et al. 2000; Fontaine et al. 2007; Bernard et al. 2022). While the impact of litter quality (Fanin et al. 2016; Lin et al. 2020; Liu et al. 2020b; Fanin et al. 2020) and soil properties (Perveen et al. 2019; Bastida et al. 2019; Chen et al. 2019; Siles et al. 2022) on microbial mechanisms and especially PE have been widely studied in topsoil, the variations across depth gradients are still unclear (Rumpel et al. 2012; Jones et al. 2018; Moreira et al. 2022)

Subsoil properties exhibit many differences compared to topsoil properties (Sanaullah et al. 2011; Sanaullah et al. 2016; Button et al. 2022): more stable physicochemical conditions (Holden and Fierer 2005); lower availability of fresh plant material, i.e., root residues and C derived from rhizodeposition (Müller et al. 2016); lower organic C content (Blume et al. 2002); and lower C:N ratios (Rumpel and Kögel-Knabner 2011). Deep soil organic matter is generally older than that in topsoil and is thus considered to have a greater degree of recalcitrance (Batjes 1996). Vertical variations in C resources (plant litter and soil organic matter) can impact microbial abundance and enzyme activity, which generally decrease with soil depth (Sanaullah et al. 2016; Piotrowska-Długosz et al. 2022b; Piotrowska-Długosz et al. 2022a) and are related to changes in microbial community composition and structure (Sanaullah et al. 2016). Microorganism physiological traits also respond to soil depth, with contrasting patterns reported for the microbial metabolic quotient (qCO_2) (Lavahun et al. 1996; Fang and Moncrieff 2005), growth rate and C use efficiency (Spohn et al. 2016; Li et al. 2021a). C use efficiency is defined as the ratio of C assimilated to C respired and is a major factor for soil C storage (Cotrufo et al. 2013; Sinsabaugh et al. 2013; Kallenbach et al. 2019; Angers et al. 2022).

Because of the limited resources at depth, the stoichiometric response of soil microorganisms may govern the C and nutrient fluxes (Mooshammer et al. 2014b; Zechmeister-Boltenstern et al. 2015). For example, lower soil (i.e., resource) C:N ratios in the cultivated subsoil (Batjes 1996; Schneider et al. 2021) can lead to C limitations, to high C use efficiency and thus to high N mineralization fluxes (Mooshammer et al. 2014b; Zechmeister-Boltenstern et al. 2015). To highlight resource stoichiometric constraints, two complementary approaches can be used: the C:N imbalance (Karhu et al. 2022), reflecting microbial nutrient demand compared to resource availability (Li et al. 2021b), and the assessment of changes in enzyme C:N:P ratios, which are expected to reflect relative limitations of the soil microorganisms, as they generally invest preferentially in enzymes for the acquisition of the most limiting elements (Fanin et al. 2016; Cui et al. 2021), despite some limits to this approach (Mori 2020).

Due to contrasting microbial properties and nutrient availability along the soil profile, the fate of FOM inputs can differ between top- and subsoil: faster root litter decomposition is observed in the topsoil (Pries et al. 2018; Siegwart et al. 2022a), and a lag phase due to slower development of soil microbial biomass seemed to prevail before decomposition in the subsoil (Sanaullah et al. 2011; Sanaullah et al. 2016). Differences in PE have also been reported between the topsoil and subsoil. Few studies report an absence of PE in the subsoil in contrast to a significant PE in the topsoil from the same profile (Salomé et al. 2010; de Graaff et al. 2014), explaining these differences by the physical separation of the C-substrate (i.e., residue) and decomposers (Xiang et al. 2008; Salomé et al. 2010). In contrast, other studies have reported a high PE in subsoils (Fontaine et al. 2007; Karhu et al. 2016; Shahzad et al. 2019), justifying it by a strong C (energy) limitation. Furthermore, other authors justify a higher PE in the subsoil because of microbial nutrient limitation, and thus, FOM would provide the energy for microbes to prime soil organic matter to mine N. These studies suggest that the variation in soil organic C sensitivity to PE along a soil depth gradient might depend on microbial limitations for C or nutrients, as confirmed by a recent meta-analysis (Gaudel et al. 2021). Two hypotheses have been proposed to explain such control of soil organic matter priming by soil nutrient availability: ‘stoichiometric decomposition’, when stoichiometric ratios of the inputs match those of the microbial demand (Chen et al. 2014), generally occurring in the first days (immediate PE) following the inputs (Razanamalala et al. 2018), and ‘microbial N-mining’ under N-shortage conditions (Craine et al. 2007), possibly occurring after the stoichiometric decomposition PE (Razanamalala et al. 2018). Despite the important consequences for C dynamics, most studies investigating the microbial response to FOM addition in subsoil (Fontaine et al. 2007; Salomé et al. 2010; de Graaff et al. 2014; Shahzad et al. 2019) do not take into account the soil and microbial nutrient status and stoichiometry.

Our study aims to assess the impact of soil nutrient availability on the microbial response to fresh organic C addition according to depth. To do so, we selected an arable soil with low C content representative of the soils found in the Mediterranean climate (Ferreira et al. 2022; Siegwart et al. 2022b).

We hypothesized that soil microbial biomass and mineralization activities are C-limited in poor Mediterranean soils and more strongly limited in soils from the deeper horizons. The addition of a small amount of C could overcome these limitations, especially at depth, while shifting microorganisms to nutrient limitations in both top- and subsoil, as the topsoil would be characterized by a high soil C:N ratio and the subsoil would have a small nutrient pool compared to the C amendments. The resulting nutrient limitations following C input would induce different microbial responses (enzymatic stoichiometry and PE) along the soil profile depending on the strength of the potential colimitations for C and nutrients assessed by a combined input of C and nutrients.

2. Materials and methods

2.1. Soil sampling

The soils were collected in the « Dispositif Instrumenté en Agroforesterie Méditerranéenne sous contrainte hydrique » (DIAMs) at the experimental station of INRAE (UE Diascope, Mauguio, France) in May 2021. The climate is Mediterranean, and the soils are classified as Skeletic Rhodic Luvisols (IUSS Working group WRB 2014). The site is divided into three independent plots. In 2017, this site was transformed into an agroforestry system with “alley-cropping” as a plantation of black locust (*Robinia pseudoacacia*) with a density of 295 trees ha⁻¹ (tree lines spaced 17 m apart). On the 22nd of January 2021, barley (*Hordeum vulgare*) was sown as a spring crop at a sowing density of 180 kg ha⁻¹. Fertilization campaigns were conducted with a Smart N 46 Fertilizer on the 4th of March 2021 (40 kg N ha⁻¹) and on the 26th of April 2021 (58.4 kg N ha⁻¹). Harvest occurred on June 30th, 2021, and straw was left on the soil surface.

According to previous studies conducted at the same site (Siegwart et al. 2022b), the soil properties did not vary according to the distance perpendicular to the tree, as this agroforestry system was young (trees planted in 2017). Consequently, this study focused on the inter row. In May 2021, corresponding to the flowering period of barley, 3 replicated pits (one on each independent plot) were dug in the middle of the inter row (1.7 m wide × 1.7 m long × 1.5 m deep), where no influence of the microclimate was observed. During the excavation of the pits, soils were sampled with a backhoe bucket from 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm of depth) corresponding to the identified soil layers in which crop roots had been previously found and quantified (Siegwart et al. 2022b). The soils were immediately sieved on a 2 mm sieve and stored at 4 °C prior to analysis. The soil physicochemical properties are summarized in Table IV-6.

Table IV-6 Initial soil physicochemical properties according to depth (0-20, 20-50 and 50-100 cm). Data are mean values ± standard deviations (n=3). Lowercase letters indicate significant differences between each soil depth (p value < 0.05)

	0-20 cm			20-50 cm			50-100 cm			Statistics
	Mean	Sd		Mean	Sd		Mean	Sd		p-value
Bulk density (g cm ⁻³)	1.17	0.05	a	1.69	0.01	b	1.87	0.10	c	7.88 × 10⁻¹⁵
Clay (g kg ⁻¹)	187.0	19.5	a	269.0	96.2	ab	458.3	94.7	b	1.43 × 10⁻²
Silt (g kg ⁻¹)	326.7	13.5		315.0	21.6		273.3	77.2		0.30
Sand (g kg ⁻¹)	486.3	12.7	b	416.0	115.9	ab	268.3	30.9	a	2.23 × 10⁻²
CEC	8.2	2.4	a	10.2	1.1	ab	17.6	4.6	b	3.99 × 10⁻²
pH	6.4	0.4	a	7.0	0.6	ab	7.4	0.1	b	2.22 × 10⁻²
Organic C (g kg ⁻¹)	11.3	3.0	b	8.5	1.6	ab	5.6	1.5	a	1.97 × 10⁻²
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	0.8	0.4		0.6	0.5		0.4	0.5		0.59
Total N (g kg ⁻¹)	0.9	0.2	b	0.7	0.1	ab	0.6	0.1	a	4.58 × 10⁻²
Total P g kg ⁻¹	0.6	0.2	b	0.5	0.2	ab	0.3	0.1	a	3.59 × 10⁻²
C:N	12.7	2.5		12.8	0.5		9.8	3.1		0.28
C:P	20.4	0.4		18.5	3.2		16.3	3.5		0.24
N:P	1.6	0.4		1.4	0.2		1.7	0.2		0.48
16S:18S	0.98	0.42		1.40	0.85		2.75	1.48		0.16

2.2. Experimental design

Soils from the three different layers were incubated in four treatments representing different resource additions: Ctrl with water only, Glu with glucose (C), Nut with nutrients (N+P) and Glu+Nut with glucose + nutrients (C+N+P). The Glu treatment evaluated the microbial response to organic C addition to the soil, in comparison with the “no added C” soils of the Ctrl treatment. In two other treatments, nutrients were simultaneously added to overcome hypothetical microbial nutrient needs, and the Glu+Nut treatment evaluated the microbial response to organic C addition to the soil in comparison with the “no added C” soils of the Nut treatments (Feng and Zhu 2021). Consequently, Ctrl was the control treatment of Glu, and Nut was the control treatment of Glu+Nut.

^{13}C -labelled glucose was used to mimic fresh C supply from plant roots. The quantity of added C was $70 \text{ mgC kg}_{\text{soil}}^{-1}$, which corresponded to the postharvest root litter-derived C inputs from barley assumed from the maximum root density ($0.2 \text{ g}_{\text{root}} \text{ dm}^{-3}$) measured at the 0-20 cm depth in the same location as the soil sampling at barley’s flowering stage (Siegwart et al. 2022b). The added C contained 4.3% excess ^{13}C , as determined by isotopic mass spectrometry (Elemental Analyser Vario-PYROcube coupled to an IsoPrime Precision mass spectrometer, Elementar, UK). Solutions of KNO_3 and KH_2PO_4 were used as N and P additions, respectively. The quantities of added N and P were $20 \text{ mgN kg}_{\text{soil}}^{-1}$ and $10 \text{ mgP kg}_{\text{soil}}^{-1}$, respectively, which were calculated to sufficiently overcome a hypothetical microbial C:N ratio of 8 and a C:P ratio of 19 (Kirkby et al. 2011; Guillot et al. 2019), considering a hypothetical high C use efficiency of 80% (Bernard et al. 2022).

For this study, independent replicates from 3 physically separated plots in the field were used to reflect the field heterogeneity.

A total of 216 soil jars with 100 g of soil each were prepared from the 3 field replicates (plots) \times 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) \times 4 treatments (Ctrl, Glu, Nut and Glu+Nut) \times 6 laboratory replicates (for sampling at days 0, 1, 3, 7, 14 and 28 after treatment starts). Before starting the treatments, soils were first preincubated for 2 weeks at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ at 21% of the water holding capacity, which was evaluated at $46.8 \pm 5.9\%$ (with no effect of the soil depth) with the funnel method (Bernard 1963). Immediately after substrate addition, the soil moisture was adjusted and maintained throughout the incubation period to 32% of the holding capacity, which was not feasible regarding the natural dry conditions of these Mediterranean soils. The incubation temperature was maintained at $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Then, destructive soil sampling occurred on days 0, 1, 3, 7, 14 and 28.

2.3. Carbon dynamics

On days 1, 3, 7, 10, 14, 17, 23 and 28, 50 μL of gas from the soil incubation jar was sampled through the septa with a 100 μL syringe (100F-LL-GT, SGE) and directly injected into 12 mL exetainers (Labco). For the jars without soils, 100 μL of gas was sampled. Those exetainers were previously flushed

with N₂ (Alphagaz 2, Air Liquide). The CO₂ concentration and the isotopic ratios ¹³C/¹²C were measured with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Delta V Plus, ThermoFisher Scientific, USA) equipped with a Gasbench II and a Conflo IV. The total C mineralization (C-CO₂ emissions) in Glu (and Glu+Nut) treatments was noted *Total*C_{CO₂}, and the C mineralization in the Ctrl (and Nut) treatments was noted *Control*C_{CO₂}. The mineralization of C was reported per g of kg soil and per g of soil organic C. Furthermore, the isotopic excess was given by the difference between the sample and the standard reference PDB, and the mineralization of C derived from the added glucose (*Newly from added C*C_{CO₂}) was calculated from the released ¹³C-CO₂, considering the excess ¹³C of 4.3% of the added C.

The contribution of carbonates to the C emissions was meant to be nonsignificant, as the CaCO₃ content was low (<1 g kg⁻¹) and independent of soil depth (Table IV-6).

At each date, soil layer and replicate, the PE was calculated in Glu and Glu+Nut as Fontaine et al. (2011):

$$PE = TotalC_{CO_2} - Newly\ from\ added\ C\ C_{CO_2} - ControlC_{CO_2}$$

where *Total*C_{CO₂} is the total C mineralization from the soils of treatment Glu (or Glu+Nut), *Newly from added C*C_{CO₂} is the mineralized C derived from the added glucose, and *Control*C_{CO₂} is the total C mineralization from the soils of treatment Ctrl (or Nut, respectively). All data were expressed as mgC kg_{soil}⁻¹.

On Day 28, the soils were analysed by isotopic mass spectrometry (Elemental Analyser Vario-PYROcube coupled to an IsoPrime Precision mass spectrometer, Elementar, UK) to determine the isotopic ratios ¹³C/¹²C and C contents. The isotopic excess was given by the difference between the sample and the standard reference PDB. The soil organic C derived from the added glucose (*Newly from added C*SOC) was calculated from the measured soil ¹³C, considering the excess ¹³C as 4.3% of the added C.

At the end of the experiment for each soil layer and treatment, the change in soil organic C induced by the addition of glucose was calculated as Fontaine et al. (2011):

$$\Delta SOC = Newly\ from\ added\ C\ SOC - PE$$

where ΔSOC is the change in soil organic C induced by the addition of glucose, *Newly from added C*SOC is the remaining soil organic C derived from the added glucose and PE is the priming effect. All data were expressed as mgC kg_{soil}⁻¹.

The percentage of added C that was recovered was calculated as Fanin et al. (2020):

$$Recovery = \frac{Newly\ from\ added\ C\ C_{CO_2} + Newly\ from\ added\ C\ SOC}{added\ C} \times 100$$

where *Recovery* is the percentage of added C that was recovered at the end of the experiment, $^{Newly\ from\ added\ C}C_{CO_2}$ is the mineralized C derived from the added glucose, $^{Newly\ from\ added\ C}SOC$ is the remaining soil organic C derived from the added glucose and $^{added}C$ is the amount of added C. All data were expressed as $mgC\ kg_{soil}^{-1}$, except *Recovery* as %.

2.4. Microbial biomass

On days 0, 1, 3, 7, 14 and 28, the microbial C and N biomass were evaluated with the chloroform fumigation-extraction method (Brookes et al. 1985; Vance et al. 1987a) immediately after soil sampling. Briefly, the soluble C and N were extracted with K_2SO_4 in fumigated and nonfumigated soils and determined with a TOC/TN analyser (TOC-VCSH/TNM-1, Shimadzu). The soluble C measured in the nonfumigated soils accounted for the soil dissolved organic C. The total microbial biomass C and N were calculated as the difference between the fumigated and the nonfumigated soils, corrected with a conversion factor of 0.45 (Vance et al. 1987a; Vance et al. 1987b). The total microbial biomass in the Glu (and Glu+Nut) treatments was noted $^{Total}MBC$, and the microbial biomass in the Ctrl (and Nut) treatments was noted $^{Control}MBC$. In addition, 10 mL subsamples of the K_2SO_4 extracts were lyophilized and analysed by isotopic mass spectrometry (Elemental Analyser Vario-PYROcube coupled to an IsoPrime Precision mass spectrometer, Elementar, UK) to determine the isotopic ratios $^{13}C/^{12}C$. The isotopic excess was given by the difference between the sample and the standard reference PDB. A mass balance equation was used to determine the ^{13}C values of the microbial biomass C (Marx et al. 2010):

$$IE_{MBC} = \frac{(IE_{C_f} \times C_f) - (IE_{C_{nf}} \times C_{nf})}{C_f \times C_{nf}}$$

where IE_{MBC} is the isotopic excess of the microbial biomass C; IE_{C_f} and $IE_{C_{nf}}$ are the isotopic excess of the fumigated and nonfumigated samples, respectively; and C_f and C_{nf} are the quantities of C in the fumigated and nonfumigated K_2SO_4 extracts, respectively. The newly formed microbial biomass C derived from the added glucose ($^{Newly\ from\ added\ C}MBC$) was calculated from IE_{MBC} , considering the excess ^{13}C as 4.3% of the added C.

At each date, soil layer and replicate, the newly formed microbial biomass derived from soil C rather than from the added glucose was calculated in Glu and Glu+Nut as Fanin et al. (2020):

$$^{Newly\ from\ soil\ C}MBC = ^{Total}MBC - ^{Newly\ from\ added\ C}MBC - ^{Control}MBC$$

where $^{Newly\ from\ soil\ C}MBC$ is the newly formed microbial biomass derived from soil C in the soils of the Glu (or Glu+Nut) treatment, $^{Total}MBC$ is the total microbial biomass in the soils of the Glu (or Glu+Nut) treatment, $^{Control}MBC$ is the total microbial biomass in the soils of the Ctrl (or Nut) treatment

and $\Delta^{Newly\ from\ added\ C}MBC$ is the newly formed microbial biomass derived from the added glucose in the soils of the Glu (or Glu+Nut) treatment. All data were expressed as $mgC\ kg_{soil}^{-1}$.

The microbial imbalance ratio, defined as the $(C:N_{resource}): (C:N_{needs})$ ratio, was calculated for each soil layer, treatment and date as the C:N ratio of soil over the C:N ratio of the microbial biomass (Mooshammer et al. 2014b; Li et al. 2021b). A decreasing (or increasing) imbalance ratio potentially reflects an increasing N limitation (or C limitation, respectively) (Mooshammer et al. 2014a).

For each soil layer and replicate, the C use efficiency was calculated in the Glu and Glu+Nut treatments during the growing phase of the microorganisms, i.e., during the first day of the incubation as Sauvadet et al. (2018):

$$CUE = \frac{\Delta^{Newly\ from\ added\ C}MBC}{\Delta^{Newly\ from\ added\ C}MBC + \Delta^{Newly\ from\ added\ C}C_{CO_2}}$$

where CUE is the C use efficiency, $\Delta^{Newly\ from\ added\ C}MBC$ is the newly formed microbial biomass derived from the added glucose between Day 0 and Day 1, and $\Delta^{Newly\ from\ added\ C}C_{CO_2}$ is the mineralized C derived from the added glucose. All data were expressed as $mgC\ kg_{soil}^{-1}$, except the CUE in %.

2.5. Enzymatic activities

On days 1, 3, 7, 14 and 28, part of the sampled soils was immediately frozen at $-20\ ^\circ C$ to measure the potential activities of 4 hydrolytic enzymes (Bell et al. 2013): β -1,4-glucosidase (BG), which hydrolyses cellulose (organic C); N-acetyl-glucosaminidase (NAG), which hydrolyses chitin and peptidoglycan; leucine aminopeptidase (LAP), which hydrolyses leucine and other hydrophobic amino acids from the N-terminus of polypeptides; and alkaline phosphatase (AP), which hydrolyses phosphosaccharides and phospholipids to produce phosphate ions (Sinsabaugh et al. 2008). The enzymatic activities ($nmol\ g^{-1}_{soil}\ min^{-1}$) were measured with a fluorometric microplate reader (Victor 3, Perkin Elmer, 365 nm excitation and 450 nm emission). C acquisition was represented by the activity of BG, and N acquisition was represented by the sum of the activities of NAG and LAP. P acquisition was represented by the activity of AP.

For each soil layer, treatment and date, ecoenzymatic stoichiometry was calculated as Fanin et al. (2016) and Cui et al. (2021) by plotting the relative proportion of C versus N acquiring activities (y) according to the relative proportion of C versus P acquiring enzyme activities (x). The vector lengths were calculated as the square root of the squared sum of x and y. The vector angles were calculated as the arctangent of the point (x, y).

2.6. Nutrient dynamics

On days 0, 1, 3, 7, 14 and 28, soil nutrient contents were measured immediately after sampling. Soil mineral N was extracted with a 1:4 soil-1 M KCl solution. NO_3^- and NH_4^+ were determined with a continuous flow analyser (San ++ Automated Wet Chemistry Analyser, Skalar), and the sum of NO_3^- and NH_4^+ accounted for the mineral soil N content. The soil available P content was also measured (Olsen 1954). The net N and P mineralization were calculated as the difference between the mineral N and P (respectively) content at a given sampling date and the value at Day 0 (Fanin et al. 2020).

2.7. Statistical analyses

Linear mixed models were used to analyse the effects of the soil layers, treatments, dates and their interactions as fixed factors and the three replicated profiles as random factors on all studied variables, except the cumulated ones. For the cumulated variables and for the variables not significantly affected by the date of sampling, linear mixed models were used by only testing the effect of the soil layers, treatments and their interaction as fixed factors and the three replicated profiles as random factors. Variables presenting significant differences on only a few dates were selected, and a model per date was applied. Post hoc Tukey tests were used to assess differences between soil depths and locations. The *lme4* and *car* packages were used for all the linear mixed models and analyses of variance. The normality of the residuals was verified with a Shapiro–Wilk test, and the homogeneity of the variances was verified with a Bartlett test. When necessary (p values $< 5\%$), logarithmic, square root, Box–Cox or Yeo Johnson transformations were applied. All statistical analyses were performed with R software (version 4.0.0).

3. Results

3.1. Carbon and nutrient mineralization

C mineralization and its response to glucose and nutrient addition changed along the soil profile. The C addition stimulated C mineralization with higher $^{\text{Total}}\text{C-CO}_2$ (i.e., with C addition) than $^{\text{Control}}\text{C-CO}_2$ (i.e., without C addition) in all the soil layers. Furthermore, when expressed as a proportion of soil organic C, $^{\text{Total}}\text{C-CO}_2$ was significantly different in the 3 soil layers (p value = 2.38×10^{-5} , Supplementary Table IV-4). In fact, the accumulated amount of $^{\text{Total}}\text{C-CO}_2$ after 28 days was significantly lower in the subsoil than in the topsoil, ranging across treatments from 7 to 25 $\text{mgC-CO}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{soilC}}$ at 50-100 cm compared to 20 to 40 $\text{mgC-CO}_2 \text{ g}^{-1}_{\text{soilC}}$ at 0-20 cm (Fig. IV-21a). As expected, in all the soil layers, the Glu and Glu+Nut treatments presented higher C mineralization than the Nut and Ctrl treatments (p value = 8.47×10^{-7} , Supplementary Table IV-4). The increase in C mineralization following glucose addition tended to be greater in the subsoil ($\times 2$ at 50-100 cm), than in the topsoil ($\times 1.4$ at 0-20 cm). Similar trends were observed when expressing the mineralized total C per g of soil rather than of per g of soil organic C (data not shown). Most of the total CO_2 was emitted in the first 3 days of incubation for all layers and treatments (Supplementary Fig. IV-14). However, the subsoil at 50-100 cm presented relatively delayed

CO₂ emissions compared to those in the upper soil layers (Fig. IV-21a). Furthermore, the metabolic quotient qCO₂ presented a significant increase at Day 3 only in the 0-20 and 20-50 cm layers with glucose addition (Supplementary Fig. IV-15).

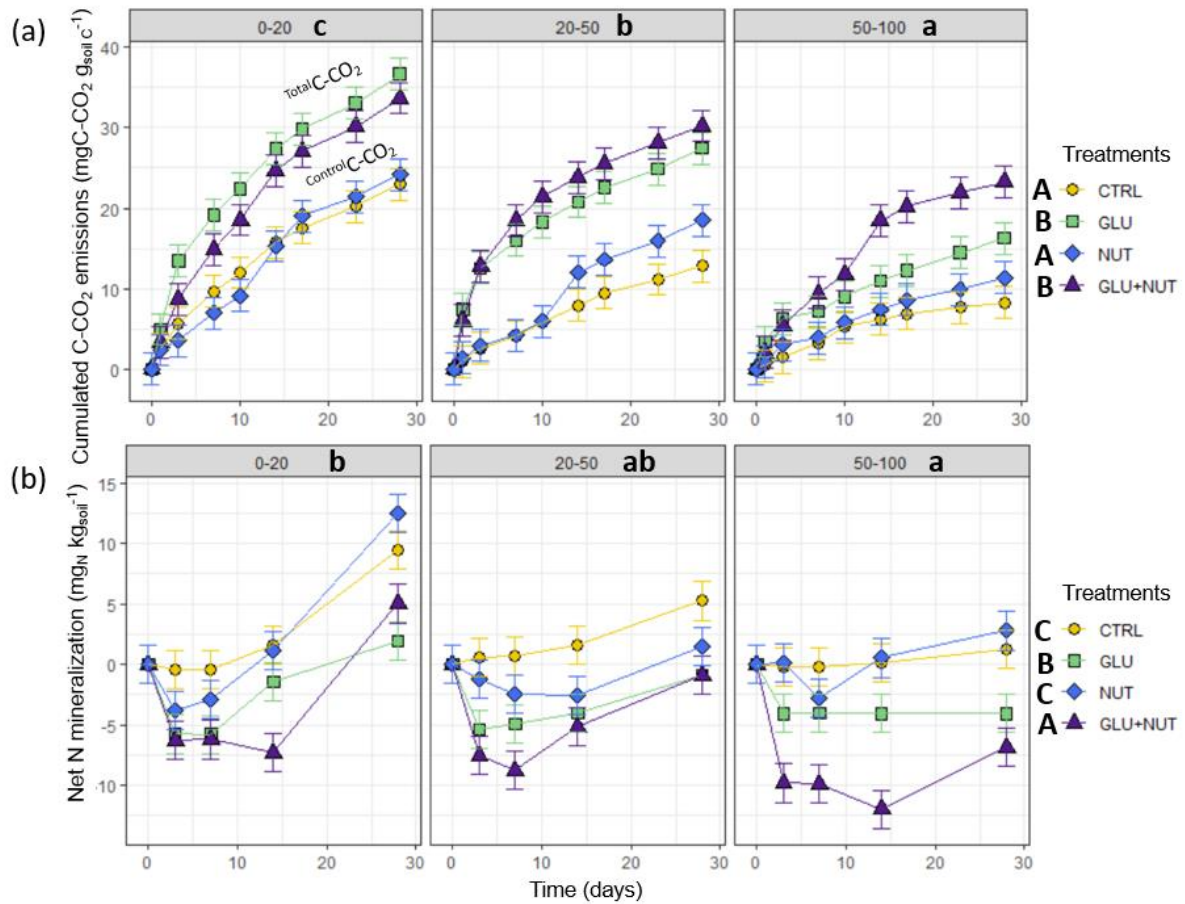


Fig. IV-21 Mineralization of C and N—cumulated ^{Total} C-CO₂ and ^{Control}C-CO₂ emissions normalized by the soil organic C content (a) and net N mineralization (b) according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Nut: nutrient addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). For each graph (a – C mineralization and b – N mineralization), lowercase letters indicate significant differences between the soil layers, and uppercase letters indicate significant differences between the treatments.

In the glucose-amended treatments, additional CO₂ was not only emitted from the added C (Newly from added C-CO₂) but also from soil C (PE), mainly during the first 3 days of incubation (Fig. IV-22). The soils from 50-100 cm had significantly lower PE than the two other layers (p value = 2.79×10^{-8} , Supplementary Table IV-5) and the Glu treatments had higher PE values than those of the Glu+Nut (p value = 1.60×10^{-2}). However, these differences occurred only during the first days of incubation; then, the PE was equivalent between all layers and treatments.

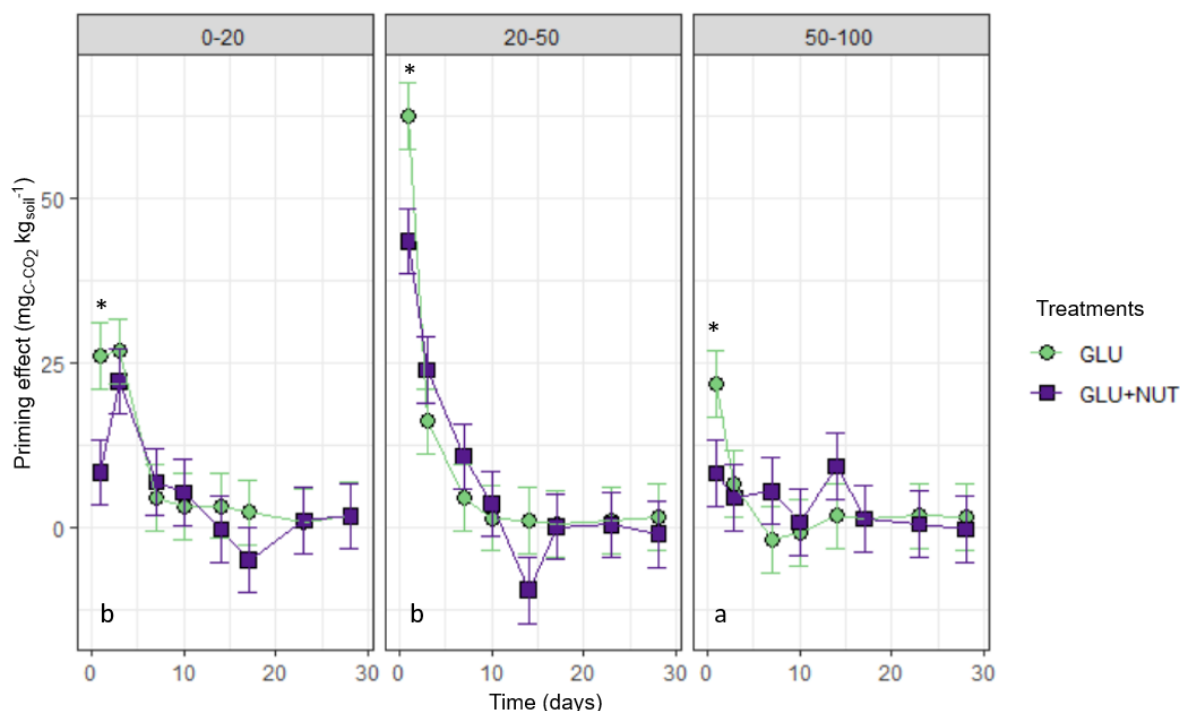


Fig. IV-22 Priming effect according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 2 treatments (Glu: glucose addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model ($n = 3$). * indicates that Glu was significantly higher than Glu+Nut. Lowercase letters indicate significant differences between the soil layers at Day 1 and Day 3.

The mineral N dynamics were also significantly impacted by soil layer and treatment (Supplementary Table IV-4). For all soil layers, the soils in the Ctrl treatment showed progressive net mineralization, that was slower in the 50-100 cm layer than in the upper layers. Conversely, in the other treatments, a rapid immobilization of N (Fig. IV-21b) was observed in the first days of incubation, which was only slight in the Nut treatment, while representing approximately 7.5, 9 and 12 mgN kg_{soil}⁻¹ for the layers at 0-20, 20-50 and 50-100 cm, respectively, in the Glu+Nut treatment. For this treatment, the peak of immobilization was reached at Day 14 except for the 20-50 cm soil layer, for which it was at Day 7. After this immobilization phase, important net mineralization occurred in the surface layer equally across all treatments (on average $+16.4 \pm 15.9$ mgN kg_{soil}⁻¹) to reach a significantly higher N level in the Nut and Ctrl treatments than in the glucose-amended treatments (p value $< 2.2 \times 10^{-16}$). In contrast, in comparison to the topsoil, the deepest soils presented lower remineralization ($+1.5$, $+5.7$ and $+5.1$ mgN kg_{soil}⁻¹ in the Ctrl, Nut and Glu+Nut treatments, respectively) and even no remineralization in the Glu treatment, with a soil mineral N content stabilized at 0 mgN kg_{soil}⁻¹ since Day 3 (Supplementary Fig. IV-16). This result highlighted a limitation in N in the subsoil amended with C only. No effect of nutrient addition was observed on the soil Olsen P (Supplementary Figs. IV-16 and 17).

3.2. Microbial biomass

On the first day of incubation, all C fractions contributing to the microbial biomass increased in all treatments and all soil layers (Fig. IV-23). Then, from Day 3 to Day 28, the ^{Control}MBC returned to its

initial amount: approx. 150 mgC kg_{soil}⁻¹ at 0-20 and 90 mgC kg_{soil}⁻¹ at 50-100 cm, the ^{Newly from soil C}MBC was constant at approximately 30-40 mgC kg_{soil}⁻¹, and the ^{Newly from added C}MBC was constant at approximately 3 mgC kg_{soil}⁻¹. Hence, the following description focuses on the microbial biomass evolution from Day 0 to Day 1:

On Day 1, without glucose addition, the ^{Control}MBC was significantly higher in the Nut treatment than in the Ctrl treatment (p value = 7.61×10^{-3} , Supplementary Table IV-4), indicating that sole nutrient addition stimulated the acquisition of C from the soil organic C by the microbial biomass.

All treatments and soil layers accumulated similar amounts of ^{Newly from added C}MBC on Day 1 (p value = 0.57 and 0.09, respectively, Supplementary Table IV-4). However, the dissolved organic ¹³C from the added ¹³C glucose and remaining at Day 1, as an indicator of the unused C by the microorganisms, differed between soil layers (Supplementary Fig. IV-17). Little dissolved organic C from added C remained at 0-20 and 20-50 cm (approximately 20 and 10 mgC kg_{soil}⁻¹, respectively, in the Glu treatment), whereas at 50-100 cm, it was still at 62.5 ± 30.4 mgC kg_{soil}⁻¹, suggesting that all added C had been assimilated in the upper layers in the first hours of incubation but that 89% of it was still in the dissolved organic C pool at Day 1 in the deeper layer.

The ^{Newly from soil C}MBC also differed between treatments and soil layers on Day 1. It was significantly higher in the Glu treatment than in the Glu+Nut treatment (p value = 1.39×10^{-2} , Supplementary Table IV-4) and significantly lower at 50-100 cm than in the upper soil layers (p value = 2.48×10^{-3} , Supplementary Table IV-4). In addition, a lag phase was observed at the 50-100 cm depth in the Glu+Nut treatment with higher ^{Newly from soil C}MBC at Day 3 than at Day 1.

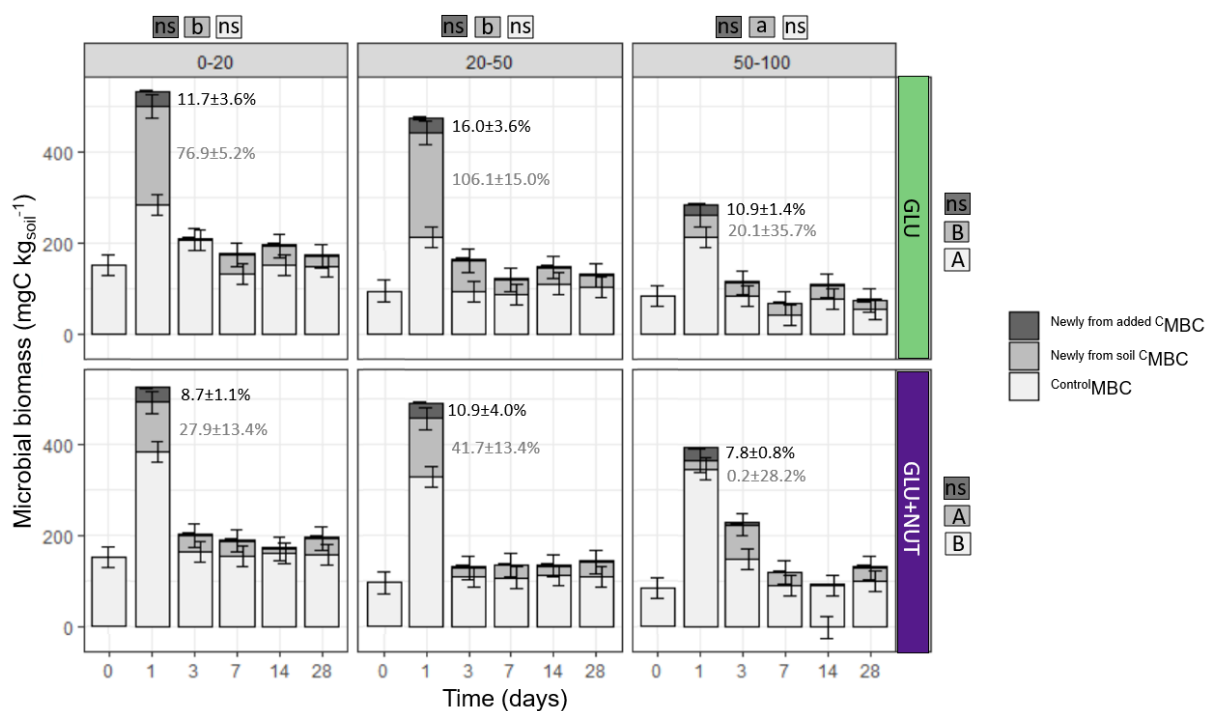


Fig. IV-23 Microbial biomass according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 2 treatments (Glu: glucose addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition). Colours accounted for the type of microbial biomass (black: Newly from added C_{MBC} – the newly formed microbial biomass derived from the added glucose, grey: Newly from soil C_{MBC} – the newly formed microbial biomass that was derived from soil C instead of from the added C, and white: Control_{MBC} (in Ctrl for Glu and in Nut for Glu+Nut)). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). For each type of biomass, lowercase letters indicate significant differences between the soil layers, uppercase letters indicate significant differences between the treatments at Day 1 only, and “ns” indicates “not significant”. Numbers expressed in % represent the newly formed biomass (from added C and from soil C according to the font colour) calculated as a proportion of the biomass in the controls for each soil layer and treatment at Day 1.

The microbial biomass N showed extremely similar patterns to the total MBC and was higher in the upper soil layers than in the deeper soil layers (p value = 1.29×10^{-9} , Supplementary Table IV-4), and it increased with glucose addition (p value = 5.89×10^{-4} , Supplementary Table IV-4). However, it remained unchanged with the sole nutrient addition (Supplementary Fig. IV-19).

The C use efficiency was high for all incubated soils, ranging from approximately 0.80 to 0.95 (Fig. IV-24). There was only a marginal difference (not significant) between treatments (p value = 0.13, Supplementary Table IV-4), with the Glu+Nut treatment mean higher than the Glu treatment mean in all soil layers.

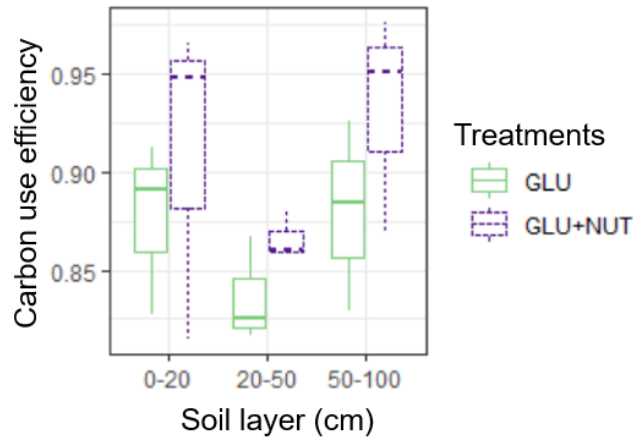


Fig. IV-24 C use efficiency during the growing phase of the microorganisms, i.e., during the first day of incubation (CUE) in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 2 treatments (Glu: glucose addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition) (n = 3).

The $(C:N_{\text{resource}}):(C:N_{\text{needs}})$ ratio indicated the availability of the resources relative to the microbial needs (Fig. IV-25). At depths of 0-20 cm for all treatments, this ratio was lower than 1 (below 0.17), showing a strong imbalance and more specifically, a general C limitation. In the two other soil layers, while it was constantly low in the Ctrl, Nut and Glu+Nut treatments, the imbalance ratio was substantially increased by the sole glucose addition at the 20-50 and 50-100 depths. In the Glu treatment, the imbalance ratio was approx. = 1 at 20-50 cm of depth, in spite of strong temporal variations, suggesting a more balanced stoichiometry between the resources compared to microbial biomass compared to the 2 other layers. It was even higher at 50-100 cm (2.5 at Day 13 and reaching very high values from Day 14), suggesting that the Glu treatment at 50-100 cm depth became nutrient limited (Fig. IV-25). The variations in the imbalance ratio were strongly related to the resources (soil C:N) more than to the needs because at the 50-100 cm depth, the microbial C:N was the same in the treatment Glu as in the other treatments in the same soil layer (Supplementary Fig. IV-18).

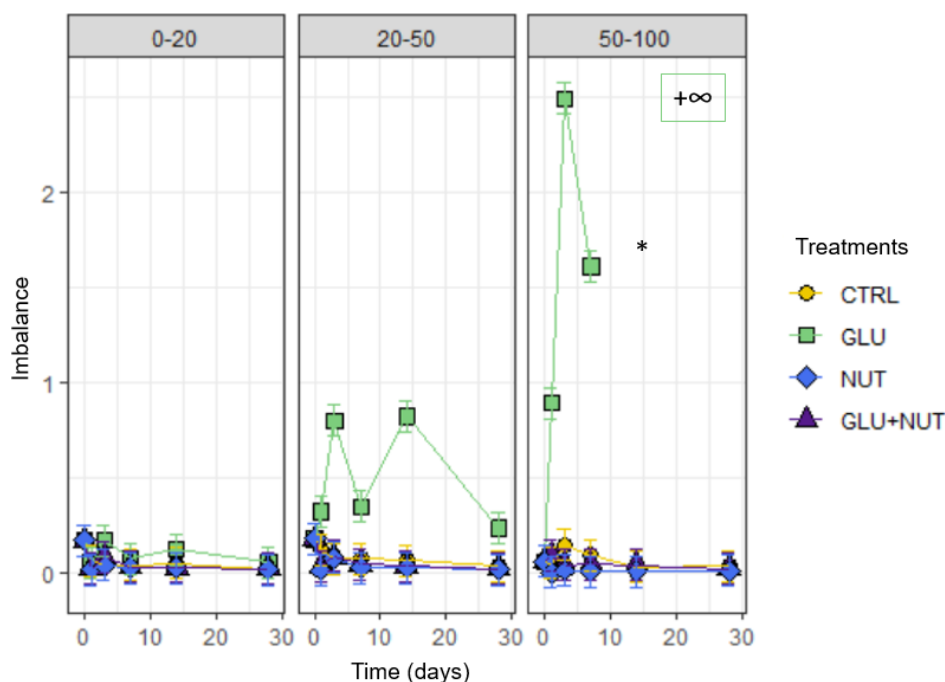


Fig. IV-25 Microbial imbalance ratio as the $(C:N_{resource}): (C:N_{needs})$ ratio according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Nut: nutrients addition and Glu+Nut: glucose and nutrients addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model ($n = 3$). * indicates the only significantly different soil layer within all treatments and the only significantly different treatment within all soil layers.

3.3. Enzymatic activity

The ecoenzymatic stoichiometry showed different relative C:N:P acquisitions according to soil layer and treatment (Fig. IV-26a). While the ecoenzymatic stoichiometry showed equivalent vector angles in all the soil layers (p value = 0.94) and treatments (p value = 0.47, data not shown), the vector length was significantly impacted by the combined effect of soil layer and treatment (p value = 3.50×10^{-5} , Supplementary Table IV-4). In fact, the vector length decreased with increasing depth for all treatments, suggesting a lower C limitation in the deeper soil layers than in the upper ones. This result was in agreement with the decreasing enzymatic C:N ratio with increasing depth (Supplementary Fig. IV-20) due to lower C- and higher N-enzyme specific activities at 50-100 cm than at 0-20 cm (Supplementary Fig. IV-19). Furthermore, the vector length at 50-100 cm was significantly higher in the Glu+Nut treatment than in the other treatments, suggesting a decrease in nutrient limitation or an increase in C limitation (Fig. IV-26b).

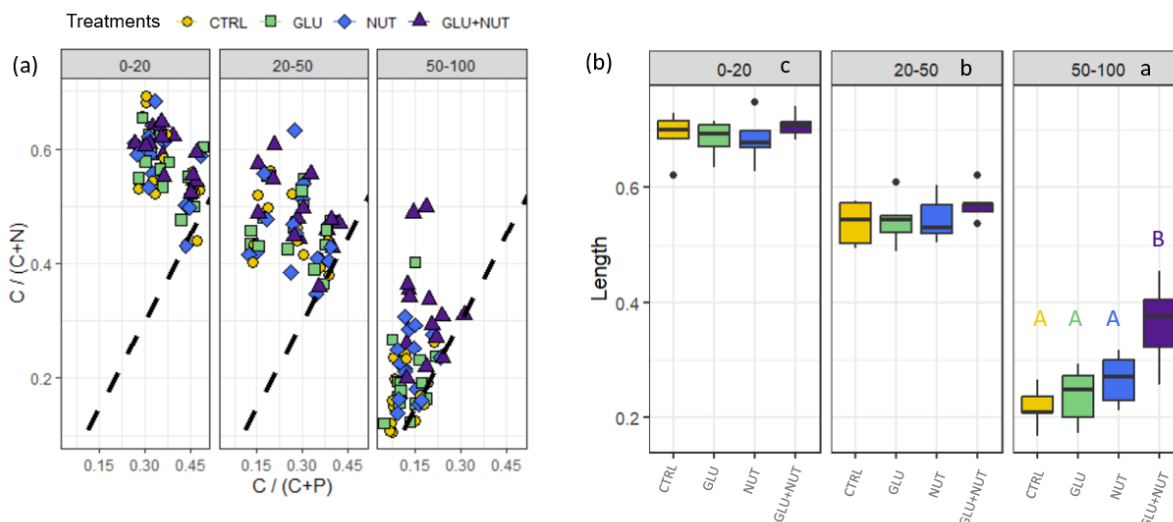


Fig. IV-26 Ecoenzymatic stoichiometry – relative C to N acquisition versus C to P acquisition (a) and the length of the vector (b). C acquisition was represented by the activity of b-1,4-glucosidase (BG), N acquisition was represented by the sum of the activities of b-1,4-N-acetylglucosaminidase (NAG) and leucine aminopeptidase (LAP), and P acquisition was represented by the activity of alkaline phosphatase (AP) in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Nut: nutrient addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition). In (b), data were merged for all dates ($n = 15$), lowercase letters indicate differences between the soil layers, and uppercase letters indicate differences between the treatments within the soil layer when they were significant.

3.4. Carbon balance

At the end of the incubation experiment, the distribution of the added C in the different pools differed in the soils according to soil layer and treatment, despite equivalent C addition (Table IV-7). After 28 days, from $70.28 \text{ mgC kg}_{\text{soil}}^{-1}$ of added C, 4.1, 2.6 and 1.3% were still in the microbial biomass (^{Newly from added C}MBC), while 14.2, 12.8 and 8.5% were emitted as CO_2 (^{Newly from added C}C-CO₂) at depths of 0-20, 20-50 and 50-100 cm, respectively. These fluxes were slightly higher when nutrients were added with C, although the difference was not significant. Furthermore, the remaining C that had not been emitted or immobilized in the microbial biomass C after 28 days (approx. 90%) remained in the soil (^{Newly from added C}SOC).

After 28 days of incubation, the cumulated PE was twice the amount of added C at 0-20 and 20-50 cm. Conversely, at 50-100 cm, the PE was $15 \text{ mgC kg}_{\text{soil}}^{-1}$ lower than the amount of added C (Table IV-7). When nutrients were added in addition to glucose, the PE was lower than that without nutrients in the upper soil layers, whereas at 50-100 cm, the PE was higher than that without nutrients (Supplementary Fig. IV-21a) and substantially higher than that in the other soil layers when reporting on a per soil organic carbon basis (Supplementary Fig. IV-21b). The high standard deviations of the PE led to high uncertainties in the calculated C balance ΔSOC .

Table IV-7 C balance of the added C after 28 days of incubation in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 2 treatments (Glu: glucose addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition). Data are mean values \pm standard deviations. $^{Newly\ from\ added\ C}SOC$ is the remaining soil organic C derived from the added glucose, $^{Newly\ from\ added\ C}DOC$ is the remaining dissolved organic C derived from the added glucose, $^{Newly\ from\ added\ C}MBC$ is the newly formed microbial biomass derived from the added glucose, $^{Newly\ from\ added\ C}C_{CO_2}$ is the mineralized C derived from the added glucose, PE is the priming effect, ΔSOC is the change in soil organic C induced by the addition of glucose, and *Recovery* is the percentage of added C that was recovered at the end of the experiment.

Soil layer	Treatment	Newly from added ^{C}SOC	Newly from added ^{C}DOC	Newly from added ^{C}MBC	Newly from added $^{C}C_{CO_2}$	PE	ΔSOC	Recovery
cm		mgC kg _{soil} ⁻¹	mgC kg _{soil} ⁻¹	mgC kg _{soil} ⁻¹	mgC kg _{soil} ⁻¹	mgC kg _{soil} ⁻¹	mgC kg _{soil} ⁻¹	% added C
0-20	Glu	66.2 \pm 9.7	0.9 \pm 0.9	2.9 \pm 0.5	10.4 \pm 3.6	141.9 \pm 36.6	-75.8 \pm 46.7	109
	Glu+Nut	68.4 \pm 13.8	0.5 \pm 0.9	3.8 \pm 0.8	10.8 \pm 4.7	95.1 \pm 80.5	-26.6 \pm 85.7	113
20-50	Glu	69.9 \pm 3.0	0.1 \pm 0.1	1.8 \pm 0.6	9.2 \pm 1.4	137.8 \pm 40.9	-67.4 \pm 40.1	113
	Glu+Nut	68.7 \pm 5.1	2.0 \pm 3.2	2.0 \pm 1.2	13.0 \pm 5.4	105.0 \pm 87.2	-36.3 \pm 83.1	116
50-100	Glu	69.7 \pm 4.6	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.8	6.0 \pm 2.6	54.9 \pm 40.7	5.5 \pm 54.9	108
	Glu+Nut	69.9 \pm 12.9	0.3 \pm 0.3	2.1 \pm 1.1	6.2 \pm 1.2	84.8 \pm 44.5	-15.1 \pm 46.8	108

4. Discussion

4.1. C and nutrient limitations of soil microorganisms at different depths

To test the first hypothesis that the microorganisms of the typical Mediterranean arable soil used in this study were C-limited, we added glucose to soil sampled from 3 different layers up to the maximum crop rooting depth (Siegwart et al. 2022b). The amount of added C was small compared to that in other studies testing priming effects with glucose addition (Tian et al. 2016; Karhu et al. 2016; Jia et al. 2017). However, the amount in this study represented the annual root litter-derived C input of a barley crop at the 0-20 cm depth cultivated in the same soil and was used to evaluate the microbial response (Soong et al. 2020). This amount of added C was shown to stimulate the microbial biomass and activity (respiration and extracellular enzymes) in all soil layers in the short term, suggesting a C limitation. This C limitation across different depths was consistent with the low $(C:N_{\text{resource}}):(C:N_{\text{needs}})$ ratio observed in these soils, indicating an imbalance between the stoichiometry of the resources and of the microbial needs (Mooshammer et al. 2014b; Song et al. 2020). Such C limitation of soil microbial communities has been extensively reported across topsoil (Cheng et al. 1996; Demoling et al. 2007; Kallenbach and Grandy 2011; Ning et al. 2021), but it has remained rarely investigated in deeper soil layers (Jones et al. 2018; Button et al. 2022).

In the present study, the response to C addition differed according to soil depth. In the topsoil, the addition of C resulted in a significant increase in microbial respiration (+152 and +106 mgC kg_{soil}⁻¹ in the Glu and Glu+Nut treatments, respectively) and biomass C (+ 249 and +140 mgC kg_{soil}⁻¹) compared to that in the control treatments. However, the stoichiometric imbalance ratio was constant because of significant microbial immobilization of N (+ 7.5 and +3.5 mgN kg_{soil}⁻¹ in the Glu and Glu+Nut treatments, respectively) driven by the addition of C. Therefore, N was not limiting in the topsoil, which could have been due to chemical fertilization practices during crop cultivation.

We found evidence that subsoils can be colimited by C and nutrients. In the subsoil, the smaller enzymatic vector suggested lower needs for C compared to that in the topsoil. Despite the possible uncertainty of the coenzymatic stoichiometry analyses (Mori 2020), other indicators support these observations. In fact, the same quantity of added C was responsible for a lower increase in the CO₂ emissions (+61 mgC kg_{soil}⁻¹) in the subsoil than that in the topsoil. However, when reported on a per soil organic C basis, the increase in total CO₂ emissions after C addition was similar at 50-100 cm (+1.1%) to that at 0-20 cm (+1.3%). Furthermore, the lower enzymatic C:N ratio and the higher N-acquisition specific activity in the subsoil compared to those in topsoil suggested that microorganisms at depth were more accustomed to facing nutrient limitation than topsoil communities (Fanin et al. 2016). Additionally, the addition of C in the subsoil extensively increased the stoichiometric imbalance ratio, as no N was available from Day 3, suggesting a colimitation in C and nutrients in the subsoil. The colimitation of C and N following C addition in the subsoil was confirmed by the treatments with both

C and nutrient addition, in which the subsoil showed higher production of microbial biomass C (+300 vs. +200 mgC kg_{soil}⁻¹ from Day 0 to Day 1) and a higher respiration compared to those with C addition without nutrients. A longer enzymatic vector observed in the subsoil amended with C and nutrients compared to with C only was also consistent with the idea that nutrient limitation was relaxed (compared to C limitations that were strengthened) when C and nutrients were added together. Such colimitations have also been reported in deep soils from tropical forests (Meyer et al. 2018; Liu et al. 2020a) and from temperate arable lands (Peixoto et al. 2021) but were contrary to our hypotheses based on the variations in the soil C:N ratio (Mooshammer et al. 2014b; Zhao et al. 2021), suggesting that the soil C:N ratio alone is not enough for predicting microbial mechanisms. Altogether, the results of this study showed that soil microbial limitations can change along the soil profile and confirmed that stoichiometric imbalance and, to a lesser extent, enzymatic stoichiometry provide a better picture of these limitations than the soil stoichiometric ratio alone (Karhu et al. 2022).

4.2. Consequences of the C and nutrient colimitations on the fate of added C according to depth

The C addition stimulated the microbial metabolism, which induced a PE varying according to the stoichiometric constraints along the soil profile. First, after glucose addition, the mineralization of soil organic matter increased, and the soil organic matter was assimilated into microbial biomass, as the unlabelled microbial biomass increased. Our data thus suggested a ‘real’ PE more than an ‘apparent’ PE after glucose addition (Wu et al. 1993; Fontaine et al. 2004; Fanin et al. 2020). Furthermore, differences in intensity and temporal dynamics were observed between the top- and subsoil PE. In the subsoil layer (50-100 cm), the cumulative PE was lower (representing 1/3) than that in the topsoil (0-20 cm) after 28 days of incubation, consistent with previous findings (de Graaff et al. 2014). This result contrasted with those of Karhu et al. (2016), who reported an increasing PE with depth in boreal forest soil. These boreal soils present very different organic matter contents, qualities and stoichiometries compared to those of our Mediterranean soil, which might have explained the different responses if they involve different microbial limitations and/or different C sensitivities to priming. In addition to the lower intensity of PE in the subsoil, a lag in microbial response to C addition was found in the subsoil and has already been reported (Sanaullah et al. 2011; Sanaullah et al. 2016). Several hypotheses can explain the observed lag in the subsoil: (i) a higher proportion of microbial communities with slower growth rates, (ii) a higher proportion of dormant biomass (Maharjan et al. 2017; Joergensen and Wichern 2018), (iii) a higher proportion of recalcitrant organic matter (stable C) (Fanin et al. 2020), or (iv) a shift from a stoichiometric decomposition PE to a N-mining PE due to the induced N limitations (Razanamalala et al. 2018). These differences contributed to the negative C balance in the topsoil and a positive C balance in the subsoil when comparing PE loss and added soil organic C. When nutrients were added with C, the C balance became negative in the subsoil, as opposed to our hypothesis based on the low soil C:N and in agreement with Meyer et al. (2018). These indicators suggested that the PE in the subsoil was

consistent with the stoichiometric decomposition theory (Chen et al. 2014) with a PE explained by the stimulation of microbial metabolism induced by the relaxation of its stoichiometric constraints. In contrast, in the topsoil, the combined addition of C and nutrients reduced the PE compared to C addition alone. This was probably due to a positive effect of N on the C use efficiency, as already described by Manzoni et al. (2012), stimulating microbial biomass production instead of mineralization (Sinsabaugh et al. 2013). Then, the microbial biomass stabilized through the entombing effect (Liang 2020), thus contributing to a relatively stable soil organic C pool and reducing the PE. Such reasoning was also involved in a recent study (Liao et al. 2022). However, in the present study, the reduction in PE in the topsoil when nutrients were supplied was not sufficient to shift the balance from negative to positive. Overall, a quantity of added C equivalent to in situ barley root input induced a PE, which was controlled by stoichiometric constraints on microbial metabolism and varied along the soil profile.

5. Conclusion

Our study showed that variations in stoichiometric constraints along a Mediterranean soil profile highly controlled the microbial response to fresh C input and the resulting C balance. Our results suggest that fresh C input into Mediterranean soil can decrease soil C stocks in topsoil through priming, whereas it can increase soil C stocks in subsoil. However, increased nutrient availability can radically change this pattern by decreasing priming in the topsoil and inducing the opposite effect in the subsoil. Thus, our results emphasize that the C balance resulting from farming practices that increase fresh C input in subsoil (e.g. deep-rooted crops) could be highly linked with nutrient availability and associated practices (e.g., fertilization).

References

- Angers D, Arrouays D, Cardinael R, Chenu C, Corbeels M, Demenois J, Farrell M, Martin M, Minasny B, Recous S, Six J (2022) A well-established fact: Rapid mineralization of organic inputs is an important factor for soil carbon sequestration. *Eur J Soil Sci*. <https://doi.org/10.1111/ejss.13242>
- Bastida F, García C, Fierer N, Eldridge DJ, Bowker MA, Abades S, Alfaro FD, Asefaw Berhe A, Cutler NA, Gallardo A, García-Velázquez L, Hart SC, Hayes PE, Hernández T, Hseu Z-Y, Jehmlich N, Kirchmair M, Lambers H, Neuhauser S, Peña-Ramírez VM, Pérez CA, Reed SC, Santos F, Siebe C, Sullivan BW, Trivedi P, Vera A, Williams MA, Luis Moreno J, Delgado-Baquerizo M (2019) Global ecological predictors of the soil priming effect. *Nat Commun* 10:3481. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11472-7>
- Batjes N h. (1996) Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *Eur J Soil Sci* 47:151–163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1996.tb01386.x>
- Bell CW, Fricks BE, Rocca JD, Steinweg JM, McMahon SK, Wallenstein MD (2013) High-throughput Fluorometric Measurement of Potential Soil Extracellular Enzyme Activities. *JoVE J Vis Exp* e50961. <https://doi.org/10.3791/50961>
- Bernard JM (1963) Forest Floor Moisture Capacity of the New Jersey Pine Barrens. *Ecology* 44:574–576. <https://doi.org/10.2307/1932538>
- Bernard L, Basile-Doelsch I, Derrien D, Fanin N, Fontaine S, Guenet B, Karimi B, Marsden C, Maron P-A (2022) Advancing the mechanistic understanding of the priming effect on soil organic matter mineralisation. *Funct Ecol* 36:1355–1377. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14038>
- Blume E, Bischoff M, Reichert JM, Moorman T, Konopka A, Turco RF (2002) Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Appl Soil Ecol* 20:171–181. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00025-2)
- Brookes PC, Landman A, Pruden G, Jenkinson DS (1985) Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol Biochem* 17:837–842. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90144-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90144-0)
- Button ES, Pett-Ridge J, Murphy DV, Kuzyakov Y, Chadwick DR, Jones DL (2022) Deep-C storage: Biological, chemical and physical strategies to enhance carbon stocks in agricultural subsoils. *Soil Biol Biochem* 170:108697. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108697>
- Chen L, Liu L, Qin S, Yang G, Fang K, Zhu B, Kuzyakov Y, Chen P, Xu Y, Yang Y (2019) Regulation of priming effect by soil organic matter stability over a broad geographic scale. *Nat Commun* 10:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13119-z>
- Chen R, Senbayram M, Blagodatsky S, Myachina O, Dittert K, Lin X, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2014) Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Glob Change Biol* 20:2356–2367. <https://doi.org/10.1111/gcb.12475>
- Cheng W, Zhang Q, Coleman DC, Ronald Carroll C, Hoffman CA (1996) Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? *Soil Biol Biochem* 28:1283–1288. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00138-1)
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Glob Change Biol* 19:988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Craine JM, Morrow C, Fierer N (2007) Microbial Nitrogen Limitation Increases Decomposition. *Ecology* 88:2105–2113. <https://doi.org/10.1890/06-1847.1>

- Cui Y, Moorhead DL, Guo X, Peng S, Wang Y, Zhang X, Fang L (2021) Stoichiometric models of microbial metabolic limitation in soil systems. *Glob Ecol Biogeogr* 30:2297–2311. <https://doi.org/10.1111/geb.13378>
- de Graaff M-A, Jastrow JD, Gillette S, Johns A, Wullschlegel SD (2014) Differential priming of soil carbon driven by soil depth and root impacts on carbon availability. *Soil Biol Biochem* 69:147–156. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.047>
- Demoling F, Figueroa D, Bååth E (2007) Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biol Biochem* 39:2485–2495. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.002>
- Fang C, Moncrieff JB (2005) The variation of soil microbial respiration with depth in relation to soil carbon composition. *Plant Soil* 268:243–253. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0278-4>
- Fanin N, Alavoine G, Bertrand I (2020) Temporal dynamics of litter quality, soil properties and microbial strategies as main drivers of the priming effect. *Geoderma* 377:114576. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114576>
- Fanin N, Moorhead D, Bertrand I (2016) Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry* 129:21–36. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0217-5>
- Feng J, Zhu B (2021) Does calculation method affect the nutrient-addition effect on priming? *Geoderma* 393:115040. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115040>
- Ferreira CSS, Seifollahi-Aghmiuni S, Destouni G, Ghajarnia N, Kalantari Z (2022) Soil degradation in the European Mediterranean region: Processes, status and consequences. *Sci Total Environ* 805:150106. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150106>
- Fontaine S, Bardoux G, Abbadie L, Mariotti A (2004) Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecol Lett* 7:314–320. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00579.x>
- Fontaine S, Barot S, Barré P, Bdioui N, Mary B, Rumpel C (2007) Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450:277–280. <https://doi.org/10.1038/nature06275>
- Fontaine S, Henault C, Aamor A, Bdioui N, Bloor JMG, Maire V, Mary B, Revaillet S, Maron PA (2011) Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biol Biochem* 43:86–96. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.017>
- Gaudel G, Poudel M, Mosongo PS, Xing L, Oljira AM, Zhang Y, Bizimana F, Liu B, Wang Y, Dong W, Uwamungu JY, Hu C (2021) Meta-analysis of the priming effect on native soil organic carbon in response to glucose amendment across soil depths. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05168-5>
- Guillot E, Hinsinger P, Dufour L, Roy J, Bertrand I (2019) With or without trees: Resistance and resilience of soil microbial communities to drought and heat stress in a Mediterranean agroforestry system. *Soil Biol Biochem* 129:122–135. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.11.011>
- Holden PA, Fierer N (2005) Microbial Processes in the Vadose Zone. *Vadose Zone J* 4:1–21. <https://doi.org/10.2136/vzj2005.0001>
- IUSS Working group WRB (2014) World reference base for soil resources 2014: international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome
- Jia J, Feng X, He J-S, He H, Lin L, Liu Z (2017) Comparing microbial carbon sequestration and priming in the subsoil versus topsoil of a Qinghai-Tibetan alpine grassland. *Soil Biol Biochem* 104:141–151. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.018>
- Joergensen RG, Wichern F (2018) Alive and kicking: Why dormant soil microorganisms matter. *Soil Biol Biochem* 116:419–430. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.022>

- Jones DL, Magthab EA, Gleeson DB, Hill PW, Sánchez-Rodríguez AR, Roberts P, Ge T, Murphy DV (2018) Microbial competition for nitrogen and carbon is as intense in the subsoil as in the topsoil. *Soil Biol Biochem* 117:72–82. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.024>
- Kallenbach C, Grandy AS (2011) Controls over soil microbial biomass responses to carbon amendments in agricultural systems: A meta-analysis. *Agric Ecosyst Environ* 144:241–252. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.08.020>
- Kallenbach CM, Wallenstein MD, Schipanski ME, Grandy AS (2019) Managing Agroecosystems for Soil Microbial Carbon Use Efficiency: Ecological Unknowns, Potential Outcomes, and a Path Forward. *Front Microbiol* 10
- Karhu K, Alaei S, Li J, Merilä P, Ostonen I, Bengtson P (2022) Microbial carbon use efficiency and priming of soil organic matter mineralization by glucose additions in boreal forest soils with different C:N ratios. *Soil Biol Biochem* 167:108615. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108615>
- Karhu K, Hilasvuori E, Fritze H, Biasi C, Nykänen H, Liski J, Vanhala P, Heinonsalo J, Pumpanen J (2016) Priming effect increases with depth in a boreal forest soil. *Soil Biol Biochem* 99:104–107. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.001>
- Kirkby CA, Kirkegaard JA, Richardson AE, Wade LJ, Blanchard C, Batten G (2011) Stable soil organic matter: A comparison of C:N:P:S ratios in Australian and other world soils. *Geoderma* 163:197–208. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.04.010>
- Kuzyakov Y, Friedel JK, Stahr K (2000) Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol Biochem* 32:1485–1498. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00084-5)
- Lavahun MFE, Joergensen RG, Meyer B (1996) Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. *Biol Fertil Soils* 23:38–42. <https://doi.org/10.1007/BF00335816>
- Li J, Pei J, Dijkstra FA, Nie M, Pendall E (2021a) Microbial carbon use efficiency, biomass residence time and temperature sensitivity across ecosystems and soil depths. *Soil Biol Biochem* 154:108117. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108117>
- Li J, Sang C, Yang J, Qu L, Xia Z, Sun H, Jiang P, Wang X, He H, Wang C (2021b) Stoichiometric imbalance and microbial community regulate microbial elements use efficiencies under nitrogen addition. *Soil Biol Biochem* 156:108207. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108207>
- Liang C (2020) Soil microbial carbon pump: Mechanism and appraisal. *Soil Ecol Lett* 2:241–254. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0052-4>
- Liao C, Long C, Zhang Q, Cheng X (2022) Stronger effect of litter quality than micro-organisms on leaf and root litter C and N loss at different decomposition stages following a subtropical land use change. *Funct Ecol* 36:896–907. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13999>
- Lin D, Dou P, Yang G, Qian S, Wang H, Zhao L, Yang Y, Mi X, Ma K, Fanin N (2020) Home-field advantage of litter decomposition differs between leaves and fine roots. *New Phytol* 165:17. <https://doi.org/10.1111/nph.16517>
- Liu J, Chen J, Chen G, Guo J, Li Y (2020a) Enzyme stoichiometry indicates the variation of microbial nutrient requirements at different soil depths in subtropical forests. *PLOS ONE* 15:e0220599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220599>
- Liu M, Qiao N, Xu X, Fang H, Wang H, Kuzyakov Y (2020b) C:N stoichiometry of stable and labile organic compounds determine priming patterns. *Geoderma* 362:114122. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114122>
- Maharjan M, Sanaullah M, Razavi BS, Kuzyakov Y (2017) Effect of land use and management practices on microbial biomass and enzyme activities in subtropical top-and sub-soils. *Appl Soil Ecol* 113:22–28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.008>

- Manzoni S, Taylor P, Richter A, Porporato A, Ågren GI (2012) Environmental and stoichiometric controls on microbial carbon-use efficiency in soils. *New Phytol* 196:79–91. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04225.x>
- Marx M, Buegger F, Gattinger A, Zsolnay Á, Charles Munch J (2010) Determination of the fate of regularly applied ¹³C-labeled-artificial-exudates C in two agricultural soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 173:80–87. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800104>
- Meyer N, Welp G, Rodionov A, Borchard N, Martius C, Amelung W (2018) Nitrogen and phosphorus supply controls soil organic carbon mineralization in tropical topsoil and subsoil. *Soil Biol Biochem* 119:152–161. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.024>
- Mooshammer M, Wanek W, Hämmerle I, Fuchslueger L, Hofhansl F, Knoltsch A, Schnecker J, Takriti M, Watzka M, Wild B, Keiblinger KM, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A (2014a) Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nat Commun* 5:3694. <https://doi.org/10.1038/ncomms4694>
- Mooshammer M, Wanek W, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A (2014b) Stoichiometric imbalances between terrestrial decomposer communities and their resources: mechanisms and implications of microbial adaptations to their resources. *Front Microbiol* 5
- Moreira BC, Prates Júnior P, Dell B, Kasuya MCM (2022) Roots and Beneficial Interactions with Soil Microbes. In: Oliveira TS de, Bell RW (eds) *Subsoil Constraints for Crop Production*. Springer International Publishing, Cham, pp 263–287
- Mori T (2020) Does ecoenzymatic stoichiometry really determine microbial nutrient limitations? *Soil Biol Biochem* 146:107816. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107816>
- Müller K, Kramer S, Haslwimmer H, Marhan S, Scheunemann N, Butenschön O, Scheu S, Kandeler E (2016) Carbon transfer from maize roots and litter into bacteria and fungi depends on soil depth and time. *Soil Biol Biochem* 93:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.10.015>
- Ning Q, Hättenschwiler S, Lü X, Kardol P, Zhang Y, Wei C, Xu C, Huang J, Li A, Yang J, Wang J, Peng Y, Peñuelas J, Sardans J, He J, Xu Z, Gao Y, Han X (2021) Carbon limitation overrides acidification in mediating soil microbial activity to nitrogen enrichment in a temperate grassland. *Glob Change Biol* 27:5976–5988. <https://doi.org/10.1111/gcb.15819>
- Ojeda JJ, Caviglia OP, Agnusdei MG (2018) Vertical distribution of root biomass and soil carbon stocks in forage cropping systems. *Plant Soil* 423:175–191. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3502-8>
- Olsen SR (1954) Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. U.S. Department of Agriculture
- Peixoto L, Elsgaard L, Rasmussen J, Olesen JE (2021) Nitrogen and phosphorus co-limit mineralization of labile carbon in deep subsoil. *Eur J Soil Sci* 72:1879–1884. <https://doi.org/10.1111/ejss.13083>
- Perveen N, Barot S, Maire V, Cotrufo MF, Shahzad T, Blagodatskaya E, Stewart CE, Ding W, Siddiq MR, Dimassi B, Mary B, Fontaine S (2019) Universality of priming effect: An analysis using thirty five soils with contrasted properties sampled from five continents. *Soil Biol Biochem* 134:162–171. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.027>
- Piotrowska-Długosz A, Długosz J, Frąc M, Gryta A, Breza-Boruta B (2022a) Enzymatic activity and functional diversity of soil microorganisms along the soil profile – A matter of soil depth and soil-forming processes. *Geoderma* 416:115779. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115779>
- Piotrowska-Długosz A, Długosz J, Gryta A, Frąc M (2022b) Responses of N-Cycling Enzyme Activities and Functional Diversity of Soil Microorganisms to Soil Depth, Pedogenic Processes and Cultivated Plants. *Agronomy* 12:264. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020264>

- Pries CEH, Sulman BN, West C, O'Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biol Biochem* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Razanamalala K, Fanomezana RA, Razafimbelo T, Chevallier T, Trap J, Blanchart E, Bernard L (2018) The priming effect generated by stoichiometric decomposition and nutrient mining in cultivated tropical soils: Actors and drivers. *Appl Soil Ecol* 126:21–33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.02.008>
- Rumpel C, Chabbi A, Marschner B (2012) Carbon Storage and Sequestration in Subsoil Horizons: Knowledge, Gaps and Potentials. In: Lal R, Lorenz K, Hüttl RF, Schneider BU, von Braun J (eds) *Recarbonization of the Biosphere: Ecosystems and the Global Carbon Cycle*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 445–464
- Rumpel C, Kögel-Knabner I (2011) Deep soil organic matter—a key but poorly understood component of terrestrial C cycle. *Plant Soil* 338:143–158. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0391-5>
- Salomé C, Nunan N, Pouteau V, Lerch TZ, Chenu C (2010) Carbon dynamics in topsoil and in subsoil may be controlled by different regulatory mechanisms. *Glob Change Biol* 16:416–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01884.x>
- Sanaullah M, Chabbi A, Leifeld J, Bardoux G, Billou D, Rumpel C (2011) Decomposition and stabilization of root litter in top- and subsoil horizons: what is the difference? *Plant Soil* 338:127–141. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0554-4>
- Sanaullah M, Chabbi A, Maron P-A, Baumann K, Tardy V, Blagodatskaya E, Kuzyakov Y, Rumpel C (2016) How do microbial communities in top- and subsoil respond to root litter addition under field conditions? *Soil Biol Biochem* 103:28–38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.07.017>
- Sauvadet M, Lashermes G, Alavoine G, Recous S, Chauvat M, Maron P-A, Bertrand I (2018) High carbon use efficiency and low priming effect promote soil C stabilization under reduced tillage. *Soil Biol Biochem* 123:64–73. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.026>
- Schneider F, Amelung W, Don A (2021) Origin of carbon in agricultural soil profiles deduced from depth gradients of C:N ratios, carbon fractions, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values. *Plant Soil* 460:123–148. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04769-w>
- Shahzad T, Anwar F, Hussain S, Mahmood F, Arif MS, Sahar A, Nawaz MF, Perveen N, Sanaullah M, Rehman K, Rashid MI (2019) Carbon dynamics in surface and deep soil in response to increasing litter addition rates in an agro-ecosystem. *Geoderma* 333:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.018>
- Siegwart L, Bertrand I, Roupsard O, Duthoit M, Jourdan C (2022a) Root litter decomposition in a sub-Saharan agroforestry parkland dominated by *Faidherbia albida*. *J Arid Environ* 198:104696. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2021.104696>
- Siegwart L, Jourdan C, Piton G, Sugihara S, Van den Meersche K, Bertrand I (2022b) Root distribution and properties of a young alley-cropping system: effects on soil carbon storage and microbial activity. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05714-9>
- Siles JA, Díaz-López M, Vera A, Eisenhauer N, Guerra CA, Smith LC, Buscot F, Reitz T, Breitzkreuz C, van den Hoogen J, Crowther TW, Orgiazzi A, Kuzyakov Y, Delgado-Baquerizo M, Bastida F (2022) Priming effects in soils across Europe. *Glob Change Biol* 28:2146–2157. <https://doi.org/10.1111/gcb.16062>
- Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, Gartner TB, Hobbie SE, Holland K, Keeler BL, Powers JS, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop MP, Wallenstein MD, Zak DR, Zeglin LH (2008) Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol Lett* 11:1252–1264. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>
- Sinsabaugh RL, Manzoni S, Moorhead DL, Richter A (2013) Carbon use efficiency of microbial communities: stoichiometry, methodology and modelling. *Ecol Lett* 16:930–939. <https://doi.org/10.1111/ele.12113>

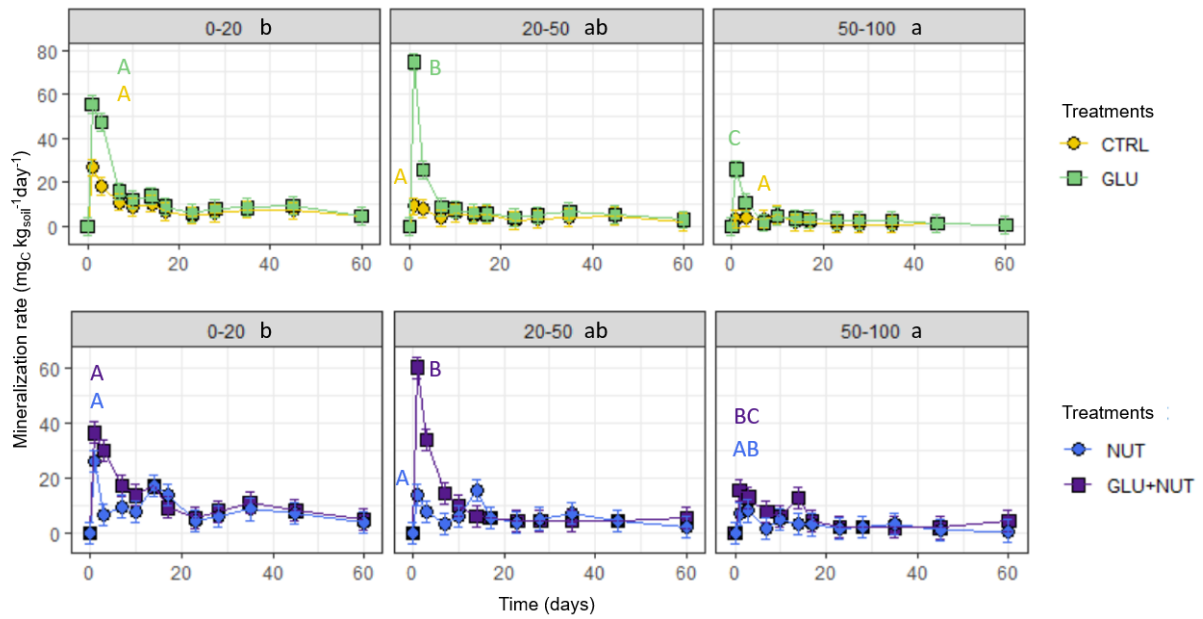
- Song M, Yu L, Fu S, Korpelainen H, Li C (2020) Stoichiometric flexibility and soil bacterial communities respond to nitrogen fertilization and neighbor competition at the early stage of primary succession. *Biol Fertil Soils* 56:1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01495-4>
- Soong JL, Fuchslueger L, Marañon-Jimenez S, Torn MS, Janssens IA, Penuelas J, Richter A (2020) Microbial carbon limitation: The need for integrating microorganisms into our understanding of ecosystem carbon cycling. *Glob Change Biol* 26:1953–1961. <https://doi.org/10.1111/gcb.14962>
- Spohn M, Klaus K, Wanek W, Richter A (2016) Microbial carbon use efficiency and biomass turnover times depending on soil depth – Implications for carbon cycling. *Soil Biol Biochem* 96:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.01.016>
- Tian Q, Yang X, Wang X, Liao C, Li Q, Wang M, Wu Y, Liu F (2016) Microbial community mediated response of organic carbon mineralization to labile carbon and nitrogen addition in topsoil and subsoil. *Biogeochemistry* 128:125–139. <https://doi.org/10.1007/s10533-016-0198-4>
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987a) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem* 19:703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987b) Microbial biomass measurements in forest soils: Determination of kC values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. *Soil Biol Biochem* 19:689–696. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90050-2)
- Wu J, Brookes PC, Jenkinson DS (1993) Formation and destruction of microbial biomass during the decomposition of glucose and ryegrass in soil. *Soil Biol Biochem* 25:1435–1441. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90058-J](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90058-J)
- Xiang S-R, Doyle A, Holden PA, Schimel JP (2008) Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils. *Soil Biol Biochem* 40:2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.004>
- Zechmeister-Boltenstern S, Keiblinger KM, Mooshammer M, Peñuelas J, Richter A, Sardans J, Wanek W (2015) The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecol Monogr* 85:133–155. <https://doi.org/10.1890/14-0777.1>
- Zhao Y, Liang C, Shao S, Chen J, Qin H, Xu Q (2021) Linkages of litter and soil C:N:P stoichiometry with soil microbial resource limitation and community structure in a subtropical broadleaf forest invaded by Moso bamboo. *Plant Soil* 465:473–490. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05028-2>

Supplementary Data**Supplementary Table IV-4** Effects of the soil layer, treatment and their interaction on several variables.

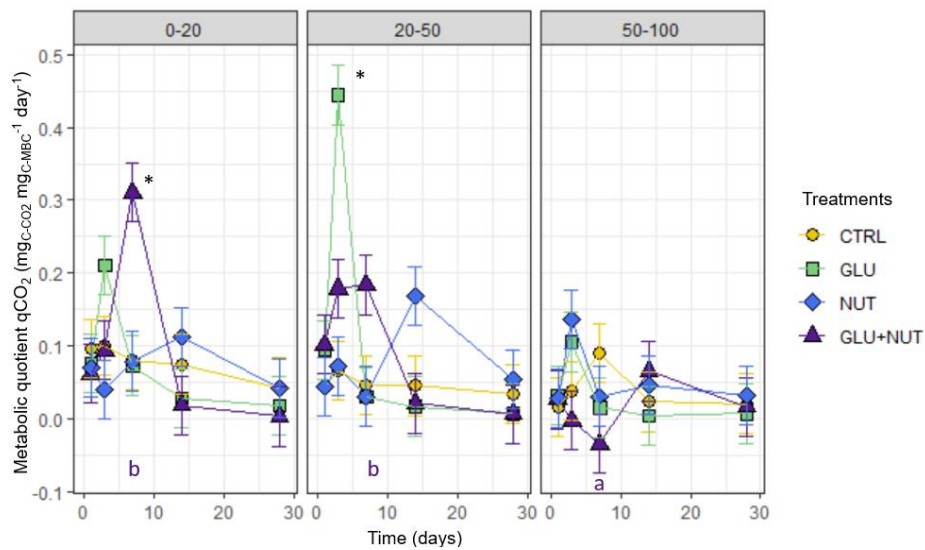
	Soil layer	Treatment	Soil layer × Treatment
Cumulated CO ₂ emissions (mgC kg _{soil} ⁻¹)	8.62 × 10⁻⁸	1.63 × 10⁻⁶	0.14
Cumulated CO ₂ emission (mgC.CO ₂ g ⁻¹ _{soilC})	2.38 × 10⁻⁵	8.47 × 10⁻⁷	0.27
Mineralisation rate at day 1 (mgC kg _{soil} ⁻¹ day ⁻¹)	1.43 × 10 ⁻⁶	1.79 × 10 ⁻⁷	1.77 × 10⁻²
Mineral N net mineralization (mgN kg _{soil} ⁻¹)	1.30 × 10⁻³	<2.2 × 10 ⁻¹⁶	0.14
Olsen P net mineralization (mgP kg _{soil} ⁻¹)	2.87 × 10 ⁻²	0.28	1.56 × 10⁻²
Microbial biomass C in the controls at day 1 (mgC kg _{soil} ⁻¹)	0.34	7.61 × 10⁻³	0.94
Newly formed microbial biomass C from added C at day 1 (mgC kg _{soil} ⁻¹)	0.09	0.57	0.86
Newly formed microbial biomass C from PE at day 1 (mgC kg _{soil} ⁻¹)	2.48 × 10⁻³	1.39 × 10⁻²	0.44
C use efficiency	0.19	0.13	0.92
Microbial biomass N (mgN kg _{soil} ⁻¹)	1.29 × 10⁻⁹	5.89 × 10⁻⁴	0.88
Microbial C:N ratio	1.42 × 10⁻⁷	4.81 × 10⁻²	0.37
Cumulated PE at day 28 (mgC kg _{soil} ⁻¹)	0.21	0.52	0.43
Cumulated PE normalized by soil organic C at day 28 (% soil C)	0.65	0.82	0.22
C-enzyme specific activity (μmol min ⁻¹ g _{MBC} ⁻¹)	1.42 × 10⁻⁹	0.31	0.94
N-enzyme specific activity (μmol min ⁻¹ g _{MBC} ⁻¹)	4.26 × 10⁻²	0.47	0.99
P-enzyme specific activity (μmol min ⁻¹ g _{MBC} ⁻¹)	0.14	0.75	1.00
Angle (radian)	0.94	0.47	0.99
Length	5.04 × 10 ⁻⁹	<2.2 × 10 ⁻¹⁶	3.50 × 10⁻⁵

Supplementary Table IV-5 Effects of the soil layer, treatment, date and their interactions on several variables. In the column interactions, only significant interactions are shown, if any.

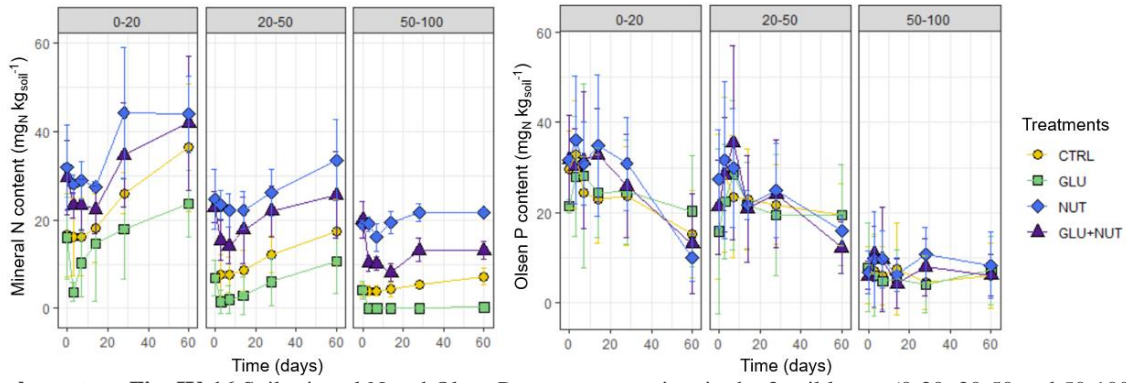
	Soil layer	Treatment	Date	Interactions
Imbalance	1.29×10^{-2}	1.95×10^{-11}	2.43×10^{-8}	Soil layer × Treatment × Date 7.22×10^{-6}
Metabolic quotient qCO ₂ (mg _{C-CO2} mg _{MBC} ⁻¹ day ⁻¹)	3.62×10^{-4}	0.52	2.33×10^{-5}	Soil layer × Treatment × Date 8.82×10^{-3}
Total dissolved organic C (mg _C kg _{soil} ⁻¹)	$<2.2 \times 10^{-16}$	6.27×10^{-6}	$<2.2 \times 10^{-16}$	Soil layer × Treatment × Date 9.25×10^{-4}
Added dissolved organic C (mg _C kg _{soil} ⁻¹)	<i>Hypotheses could not be verified for application of the mixed effect model</i>			
PE (mg _C kg _{soil} ⁻¹)	3.66×10^{-2}	0.26	$<2.2 \times 10^{-16}$	Treatment × Date 1.60×10^{-2} Soil layer × Date 2.79×10^{-8}



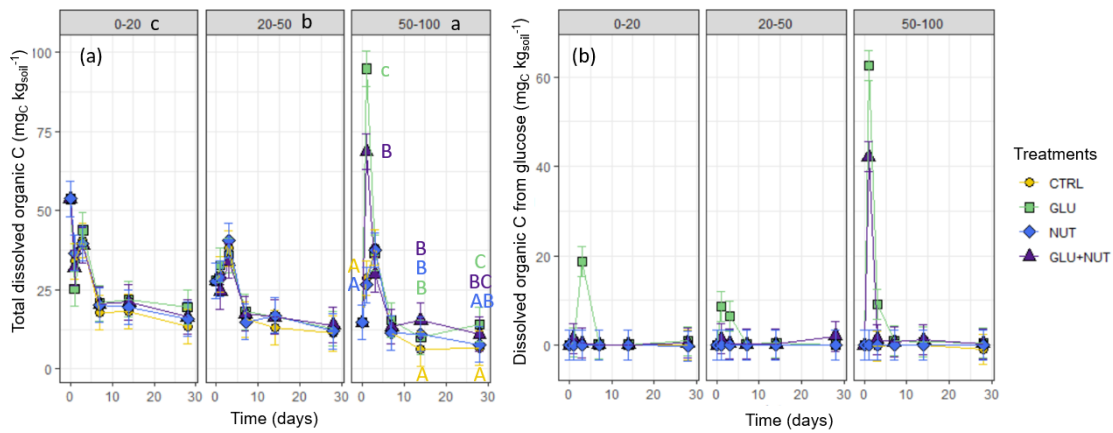
Supplementary Fig. IV-14 Mineralization rate according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrient addition and Nut: nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). Statistical analyses were conducted only for Day 1. Lowercase letters indicate significant differences between the soil layers for all treatments, and uppercase letters indicate significant differences between the treatments within each soil layer.



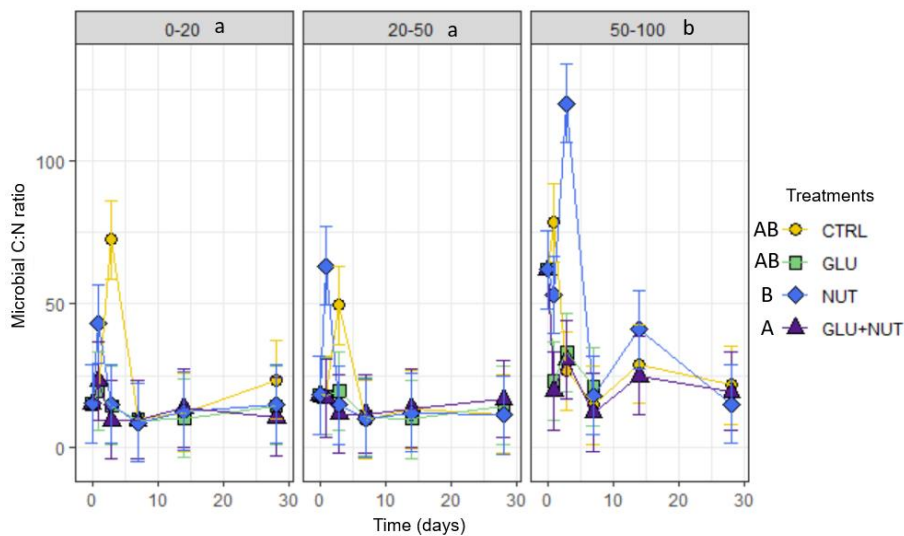
Supplementary Fig. IV-15 Metabolic quotient (qCO₂) according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrient addition and Nut: nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). Lowercase letters indicate significant differences between the soil layers for a given date and treatment (font colour). * indicates a significant difference between treatments for a given depth and date.



Supplementary Fig. IV-16 Soil mineral N and Olsen P contents over time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrient addition and Nut: nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent standard deviations (n = 3).

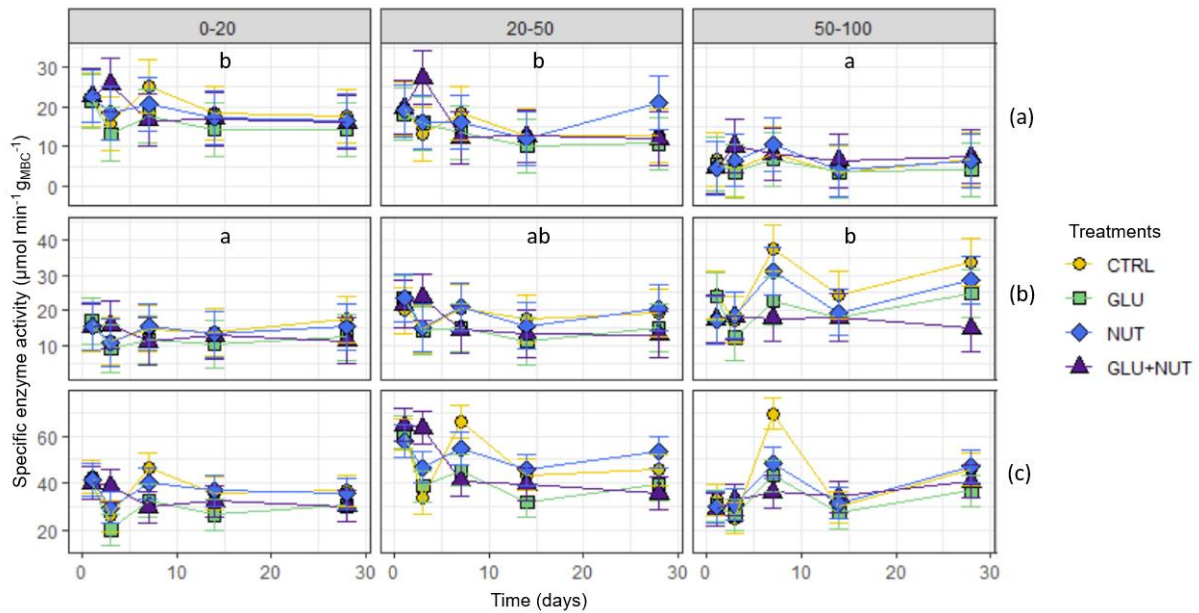


Supplementary Fig. IV-17 Soil dissolved organic C – total (a) and from added glucose (b) according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrients addition and Nut: nutrients addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). In (a), lowercase letters indicate significant differences between the soil layers for all treatments at Day 1, and uppercase letters indicate significant differences between the treatments within each soil layer for a given date.

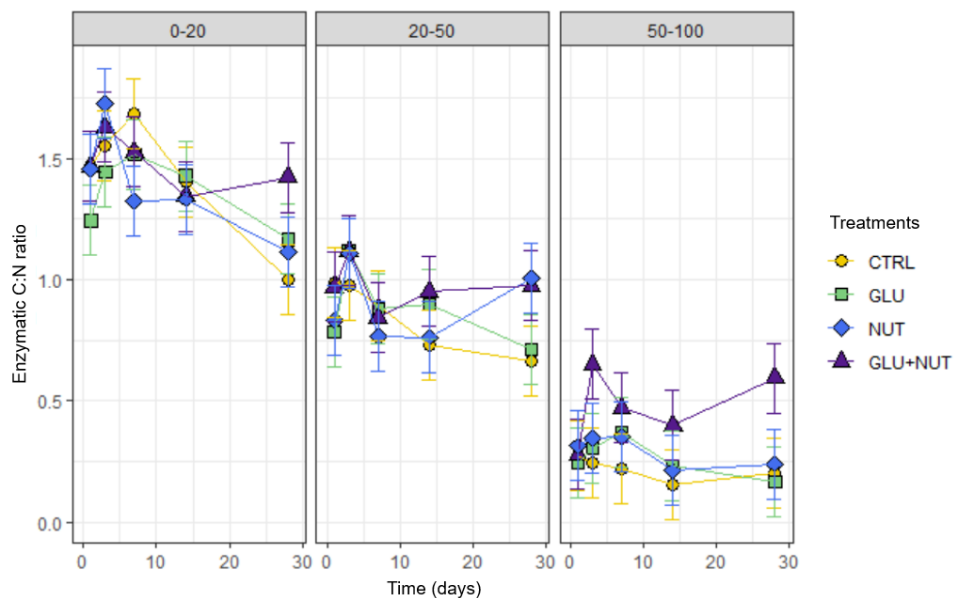


Supplementary Fig. IV-18 Microbial C:N ratio according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrient addition and Nut: nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). Lowercase letters

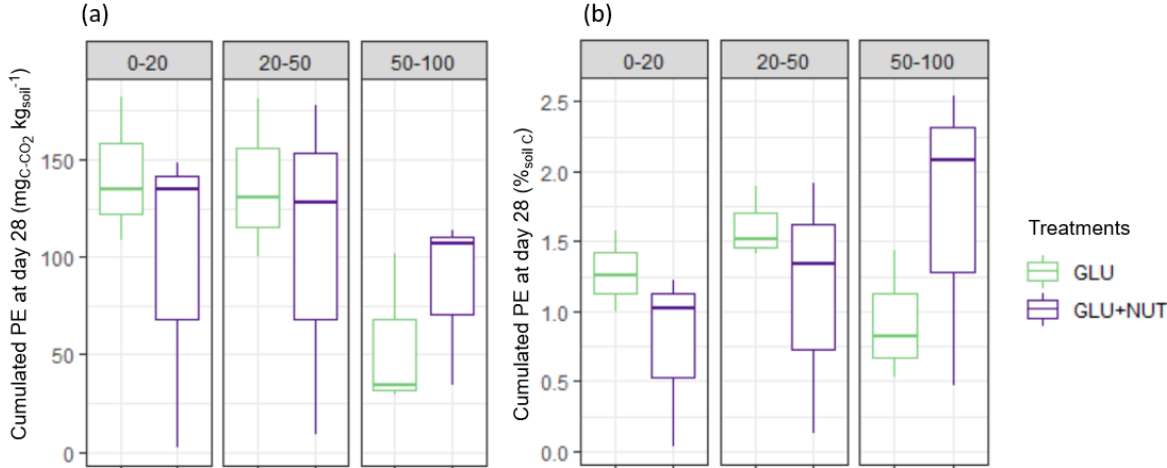
indicate significant differences between the soil layers. Uppercase letters indicate significant differences between the treatments.



Supplementary Fig. IV-19 Specific enzyme activity for C (a), N (b) and P (c) according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrient addition and Nut: nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3). Lowercase letters indicate significant differences between the soil layers for a given enzyme.



Supplementary Fig. IV-20 Enzymatic C:N ratio according to time in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 4 treatments (Ctrl: no addition, Glu: glucose addition, Glu+Nut: glucose and nutrient addition and Nut: nutrient addition). Data are mean values, and error bars represent the estimated standard errors from the mixed effect model (n = 3).



Supplementary Fig. IV-21 Cumulative priming effect at Day 28 (a) and cumulative priming effect at Day 28 reported on a per soil organic C basis (b) in the 3 soil layers (0-20, 20-50 and 50-100 cm) and for the 2 treatments (Glu: glucose addition and Glu+Nut: glucose and nutrient addition).

Conclusions et perspectives

La première hypothèse de ce chapitre concernait l'impact de l'hétérogénéité des systèmes agroforestiers sur la décomposition racinaire (H-2.1.). L'Article 3 sur le site *Faidherbia*-Flux suggère que les éléments contribuant à l'hétérogénéité spatiale des systèmes agroforestiers ne sont pas forcément tous des facteurs de la décomposition racinaire. En effet, les différences de propriétés du sol observées entre les positions sous et loin de l'arbre (teneurs en nutriments dans le sol et ratios stœchiométriques, humidité du sol) n'ont pas suffi à induire des différences sur les coefficients de décomposition sur les 15 mois de décomposition étudiés. Les principaux facteurs de la décomposition étaient la qualité racinaire et la profondeur, et agissaient sur le court terme (1.5 mois de décomposition). En effet, les racines de l'arbre significativement plus riches en lignine (51.9 ± 4.1 %) que les racines des cultures annuelles (20.8 ± 2.1 % pour le mil et 17.3 ± 4.4 % pour le niébé) se sont décomposées plus lentement. De plus, la décomposition racinaire était plus lente à 180 cm qu'à 20 cm de profondeur, en lien avec les mesures d'humidité et de température plus stables et avec l'activité microbienne supposée plus faible qu'en surface. Les hypothèses discutées dans l'Article 3 concernant la dynamique des nutriments en profondeur sont résumées dans la Fig. IV-27, mais des études supplémentaires détaillant les cinétiques temporelles des nutriments, la nature de l'activité microbienne et éventuellement du marquage d'azote permettront de les confirmer. L'Article 4 sur DIAMS trouve une décomposition racinaire plus lente en profondeur (50 et 100 cm) par rapport à 20 cm de profondeur, uniquement pour les racines avec un diamètre initial < 0.3 mm (racines d'absorption), et non pour les racines de transport ; l'absence de différences significatives des conditions de température et humidités dans le sol selon la profondeur, et une sécheresse générale limitant l'activité microbienne, pourrait être un élément d'explication à ces observations.

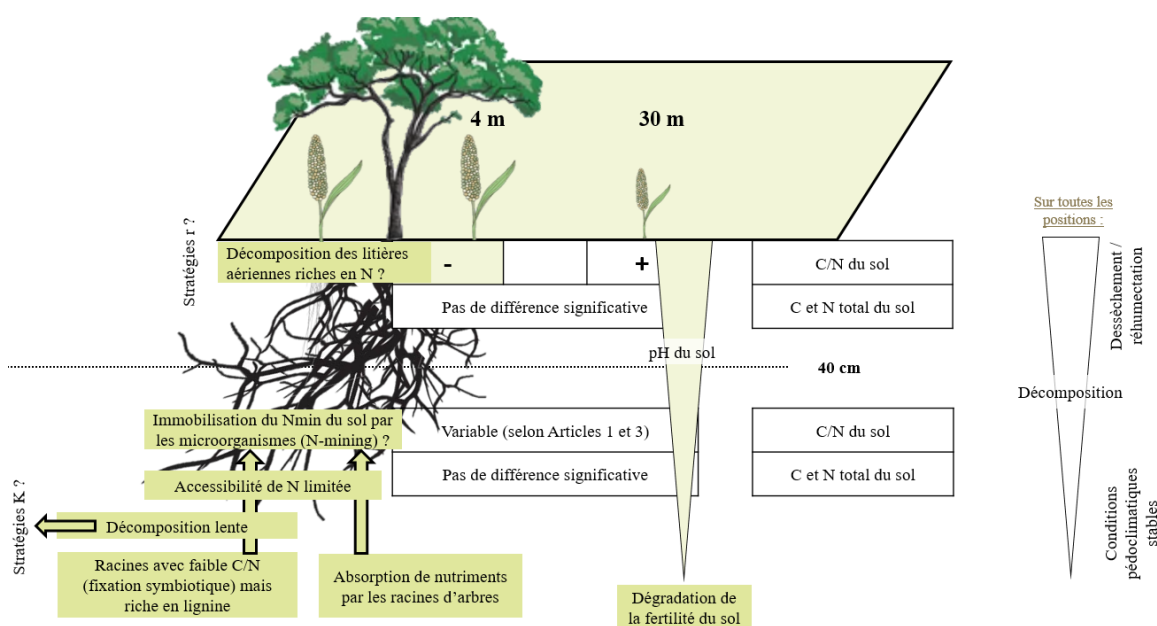


Fig. IV-27. Schéma bilan de la discussion de l'Article 3 sur le site *Faidherbia*-Flux : comparaison des méthodes de suivi de la décomposition racinaire avec les litterbags et les scanners.

L'analyse des images acquises par les scanners enfouis dans le sol de DIAMS a révélé des images inédites de racines en cours de décomposition, avec la disparition progressive du parenchyme cortical, laissant la partie plus récalcitrante de la racine : le cylindre central (Fig. IV-28). Alors que la méthode des litterbags permet de comparer des populations de racines ou des traitements (position et profondeur), la méthode scanner *in situ* est innovante et fournit des informations supplémentaires et complémentaires (Fig. IV-29). Le suivi individuel des racines permet de relier leur décomposition à leurs traits fonctionnels et anatomiques (H-2.2.). En effet, on a pu observer avec les scanners enfouis sur DIAMS de l'Article 4 des différences de cinétiques de décomposition au sein même des racines de la culture annuelle. La décomposition racinaire était significativement plus rapide pour les racines à plus gros diamètre. De plus, l'observation *in situ* de la décomposition a montré qu'elle commençait très tôt dans le cycle de développement de la plante, bien avant la floraison. Cette observation accentue l'importance de la prise en compte de l'état de décomposition des racines lors des échantillonnages pour les mettre en litterbags par exemple, car en effet, à date de floraison, 40-50% du volume racinaire maximal a déjà été perdu.

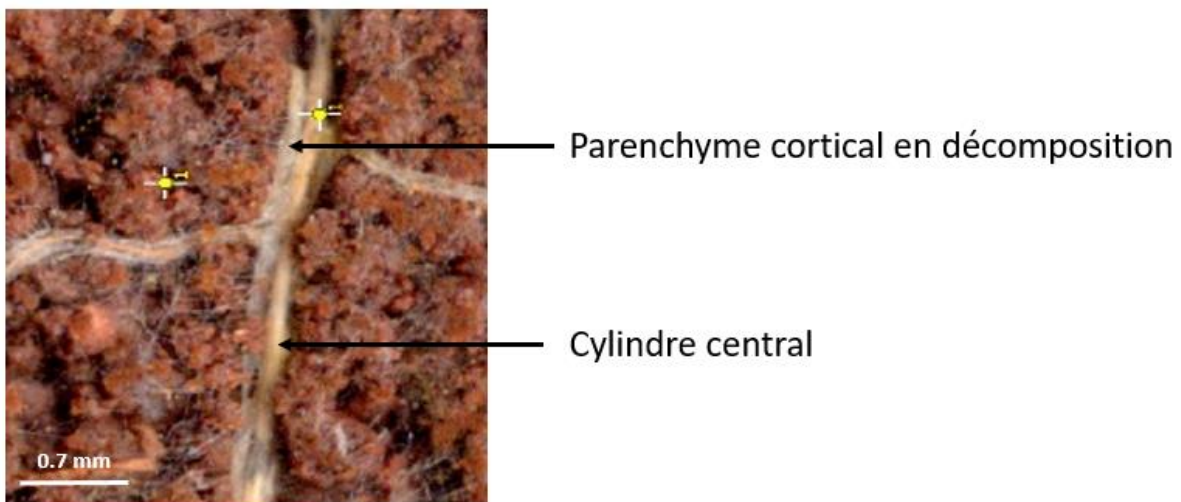


Fig. IV-28. Image inédite observée sur les scanners le 06/06/2021 : identification du parenchyme cortical qui se décompose progressivement et du cylindre central qui est plus récalcitrant à la décomposition. Autour de la racine, des filaments blancs pourraient être des hyphes mycorhiziens.

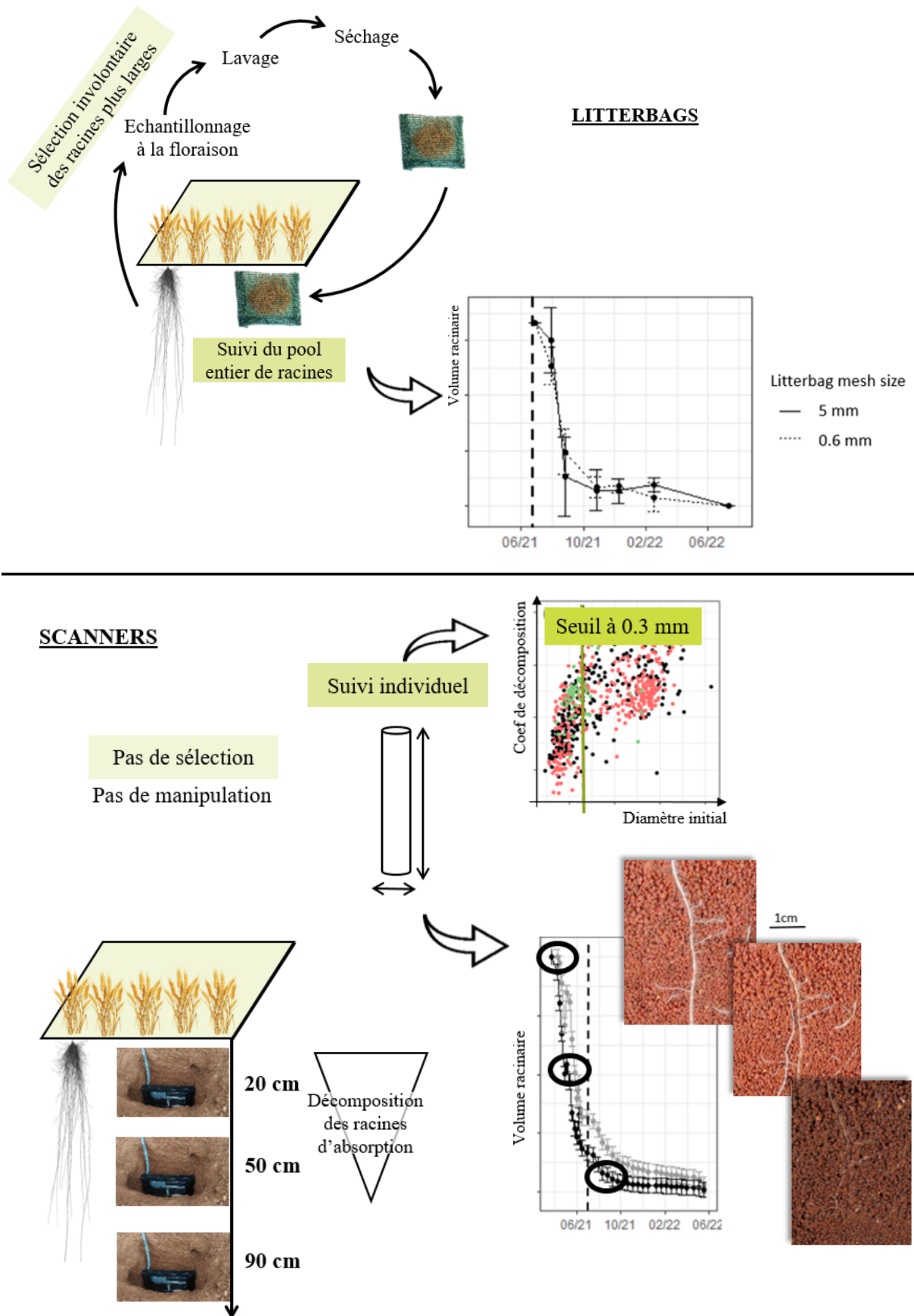
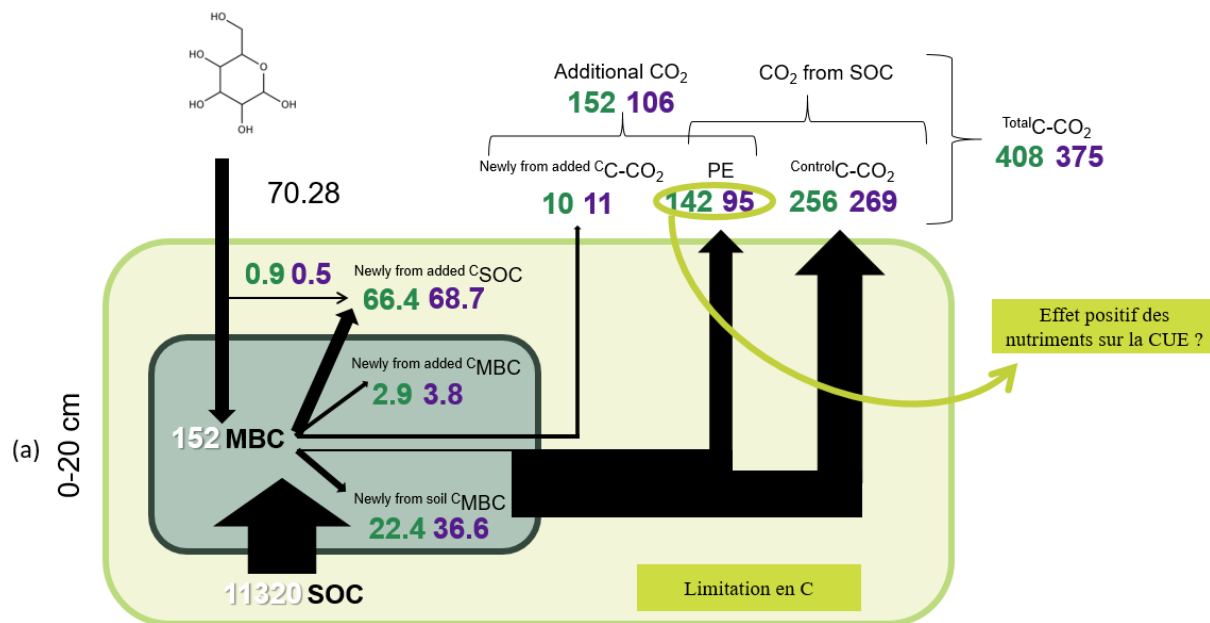


Fig. IV-29. Schéma bilan de la discussion de l'Article 4 sur le site DIAMS : comparaison des méthodes de suivi de la décomposition racinaire avec les litterbags et les scanners.

Selon la dernière hypothèse de ce chapitre, la stœchiométrie des éléments (carbone, azote, phosphore) contrôle la réponse microbienne à l'apport de matière organique fraîche. (H-2.3.). L'Article 5 a confirmé que c'est le rapport de la stœchiométrie de la ressource sur celle des besoins microbiens qui contrôle la réponse microbienne, plutôt que les ratios stœchiométriques du sol (ressource) seul. Sur DIAMS, plusieurs indices suggéraient une limitation microbienne en carbone en surface, et une co-limitation en carbone et nutriments en profondeur. Ces limitations ont eu différentes conséquences sur le devenir du carbone ajouté et le carbone du sol en fonction de la profondeur (Fig. IV-30). A 50-100 cm de profondeur, le *priming effect* représentait seulement 1/3 de celui à 0-20 cm (54.9 ± 40.7 et 141.9 ± 36.6 mgC kg_{soil}⁻¹ respectivement), ce qui contribuait à un bilan carbone positif en profondeur et négatif en surface. En ajoutant des nutriments, le bilan carbone en profondeur devenait négatif, probablement du fait du *priming effect* de la théorie de décomposition stœchiométrique (apport de carbone et nutriments à un sol co-limité par ces deux éléments). Au contraire en surface, l'apport conjoint de carbone et nutriments a réduit le *priming effect* par rapport à l'apport de carbone seul (-46.8 mgC kg_{soil}⁻¹), probablement grâce à un effet positif de l'azote sur la *carbon use efficiency*. Cependant, la réduction du *priming effect* induit par l'apport d'azote en surface n'a pas suffi à rendre le bilan carbone positif. Des études *in situ* sont requises pour évaluer les émissions de carbone du sol, puisque plusieurs facteurs interviennent en conditions au champs. C'est ce qui sera étudié dans le prochain chapitre.



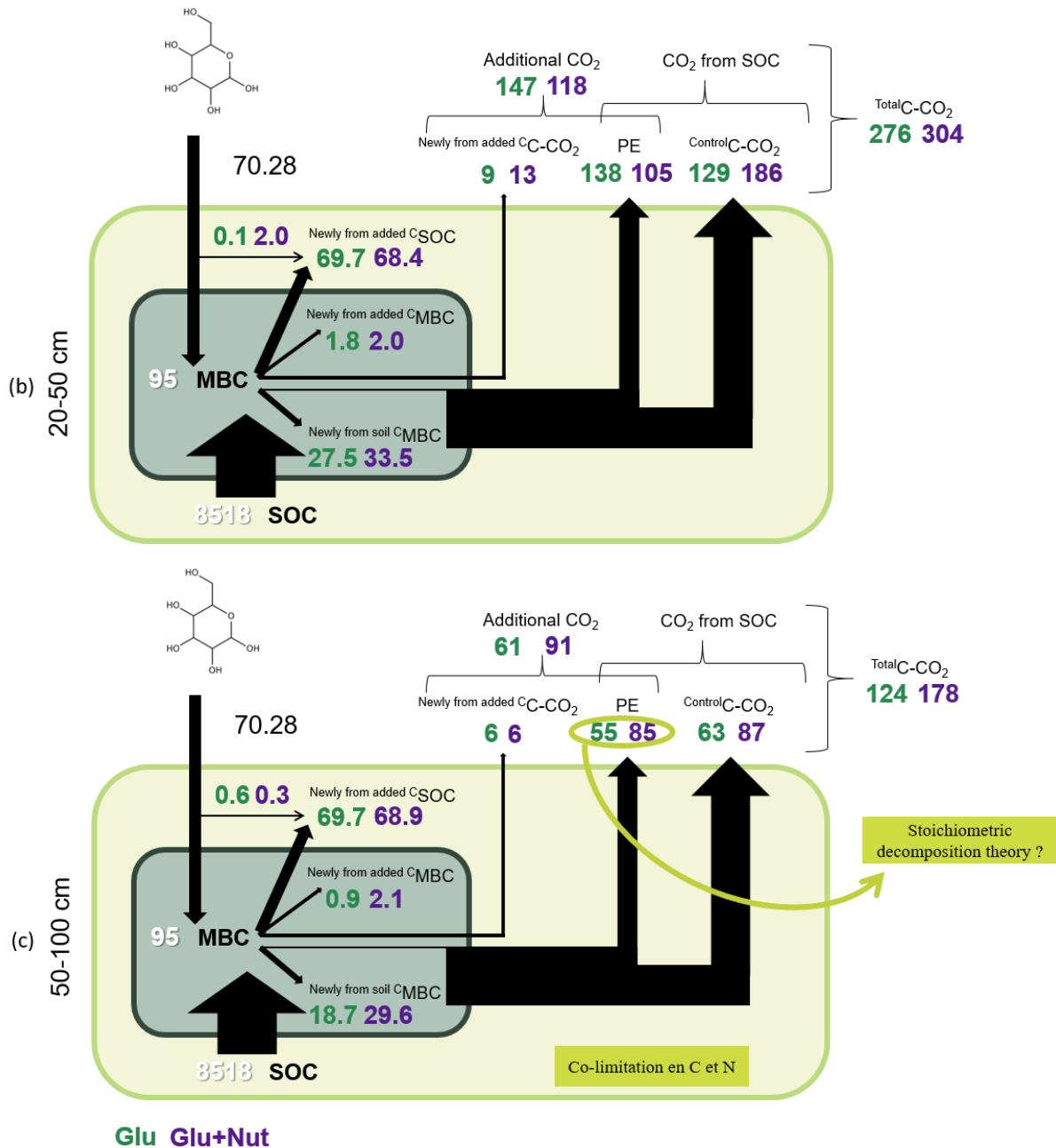


Fig. IV-30 Résumé graphique de l'Article 5 – Bilan carbone après 28 jours d'incubation pour les horizons 0-20 cm (a), 20-50 cm (b) et 50-100 cm (c). Les nombres en blanc ont été mesurés avant l'incubation (MBC : carbone de la biomasse microbienne et SOC : carbone organique du sol). Les nombres en vert et violet sont les cumul au jour 28 dans les traitements Glu (apport de glucose) et Glu+Nut (apport de glucose et nutriments) respectivement. Toutes les données sont des moyennes exprimées en mgC kgsoil⁻¹ (n = 3).

CHAPITRE V

RESPIRATION DU SOL SELON L'OCCUPATION

Rappel des objectifs

Initialement, ce chapitre visait à évaluer l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la respiration des sols agroforestiers, ainsi que la contribution de la respiration racinaire, par rapport aux cultures pures (sans arbres) et aux plantations d'arbres conduites en conditions équivalentes. Pour répondre à l'objectif, 2 hypothèses ont été formulées :

H-3.1. Dans les systèmes agroforestiers, l'hétérogénéité spatiale de la respiration des sols selon la distance à l'arbre s'explique par l'hétérogénéité spatiale de la respiration autotrophe, contrôlée par la biomasse et les traits racinaires, et de la respiration hétérotrophe, contrôlée par la biomasse microbienne et les sources de matière organique, du fait de la différenciation des propriétés physico-chimiques du sol et des pratiques agricoles.

H-3.2. Dans les systèmes agroforestiers, il y a une hétérogénéité temporelle de la respiration des sols en fonction de la distance à l'arbre, car les racines des espèces pérennes sont présentes toute l'année et les racines vivantes des cultures annuelles sont présentes uniquement entre le semis et la récolte. L'écart entre la respiration du sol de la bande enherbée et celle de l'inter-rang cultivé serait plus important hors période cultivée.

Pour cela, des acquisitions de flux de CO₂, de température et d'humidité à la surface du sol ont été menées sur un total de 72 points sur DIAMS pendant 2 années complètes (Fig. V-1). En plus, 4 campagnes d'échantillonnages de racines et de sol ont été réalisées à différents stades phénologiques pour tenter de relier la respiration du sol à la biomasse racinaire et en déduire la respiration hétérotrophe sur le modèle Wanga et al. (2005). Les autres méthodes citées dans le Chapitre I – Synthèse bibliographique auraient difficilement pu être mises en place sur DIAMS vu la teneur importante en cailloux et en argile du sol. Ainsi, au vu des nombreuses données acquises pour cette expérimentation et de leur originalité, l'objectif a été modifié. Un bilan carbone du sol de DIAMS a donc été établi, évaluant les quantités de carbone entrantes et sortantes annuellement.

Ce travail correspond à l'Article 6. Il est encore en révision avec les co-auteurs.

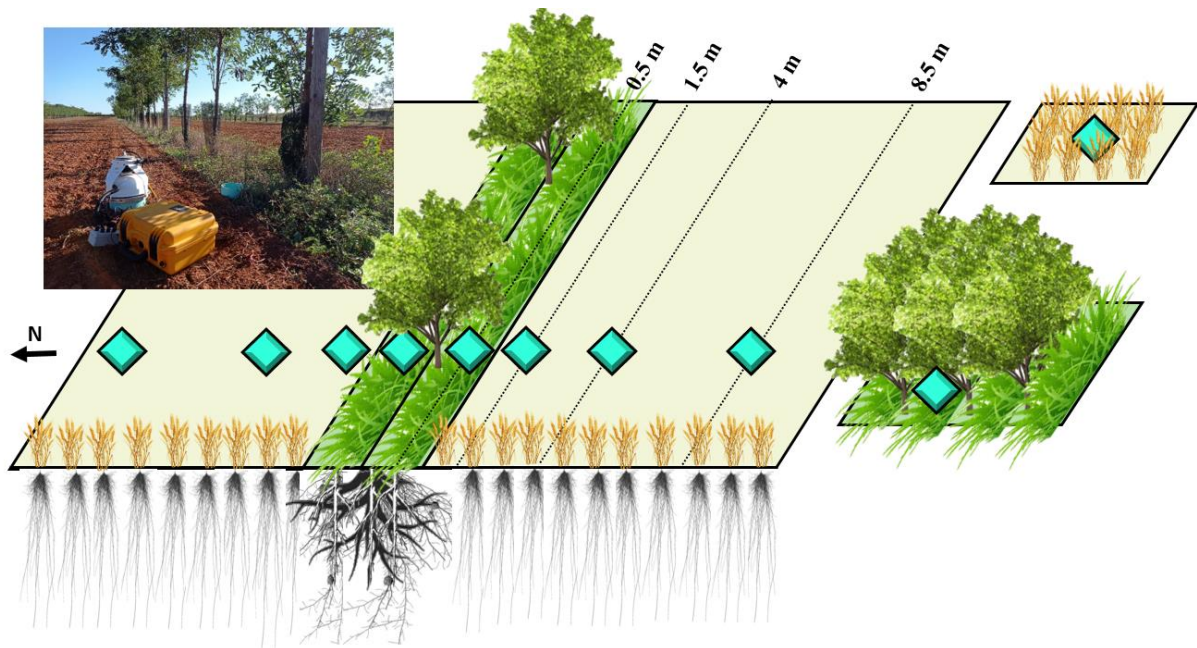


Fig. V-1 Schéma récapitulatif du dispositif expérimental mis en place sur le site DIAMS pour répondre à la question 3 traitée dans le chapitre V. Les losanges représentent les points d'échantillonnages de sol et racines et de mesures de gaz.

Article 6

Soil C balance in a young Mediterranean agroforestry system compared with pure crop and tree plantations

Siegwart Lorène¹, Duthoit Maxime^{1,2}, Dugué Rémi¹, Forest Marion¹, Hergoualc'h Kristelle^{2,3}, Jourdan Christophe^{1,2}, Marsden Claire¹, Ngao Jérôme¹, Bertrand Isabelle¹

¹ UMR Eco&Sols, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, IRD, InstitutAgro Montpellier, Montpellier, France

² CIRAD, UMR Eco&Sols, F-34398 Montpellier, France

³ Center for International Forestry Research (CIFOR), Bogor, Indonesia



Abstract

Despite an increasing number of studies on agroforestry systems and their potential relevance as alternative agroecological systems, little is known on the soil carbon balance in these spatially heterogeneous systems associating perennial species and annual crops. We aimed to evaluate the spatial and seasonal heterogeneity of soil respiration and other components of the soil carbon balance in a Mediterranean agroforestry system. First, we measured soil CO₂ efflux in situ for 2-years on 3 systems under a Mediterranean climate: a young alley cropping agroforestry system, conventional pure crop and a young tree plantation with equivalent management. A total of 40 acquisition campaigns on 72 collars distributed throughout the experimental site were conducted. Second, soil organic C stocks, and annual aerial and root litter-derived C inputs were evaluated. The temporal variations of soil respiration were identical in all systems and in all distances from the tree row within agroforestry. Less than 30% of the temporal variability of soil respiration was explained by that of soil temperature and we discuss the potential contributions of root and microbial biomass according to the systems. Pure crops showed fast development and turnover while tree plantations were more stable across the year. Agroforestry systems, as a combination of perennial species and annual crops, allowed a spatial and seasonal heterogeneity of soil C dynamics, with higher soil C inputs but equivalent soil C losses compared to pure crops, thus validating their potential to increase soil C sequestration, at least 3-5 years after tree plantation.

1. Introduction

Agroforestry is now widely recognized for contributing to soil C sequestration and maintaining soil fertility (Lorenz and Lal 2014; Cardinael 2015). Indeed, the presence of perennial species such as trees, and herbaceous strips if applicable, increases organic matter inputs to the soil through aerial litter fall and fine root turnover (Vanlauwe et al. 1996; Duarte et al. 2013). In parallel to inputs from perennial species, agroforestry systems might induce a decrease in crop root biomass and thus in crop root-derived C inputs from root litter and rhizodeposition (Swinnen 1994; Gale et al. 2000; Pausch and Kuzyakov 2018), in the topsoils in the vicinity of the trees (Siegwart et al. 2022), inducing a heterogeneity within the intercrop.

Not only does the introduction of trees in cropping systems have a direct impact on soil C sequestration through spatial heterogeneity of C inputs, but it can also have an indirect impact by modifying the soil functioning and more precisely soil C losses, compared to a conventional pure crop. In temperate alley-cropping systems, the spatial heterogeneity and more precisely the horizontal gradient with distance from tree lines of soil physico-chemical and biological properties have been widely assessed (Guillot 2018; D'Hervilly 2021). For example, microbial biomass, enzymatic activity and nutrient recycling are higher near the tree row than far from it (Lee and Jose 2003; Pardon et al. 2017; Guillot et al. 2021). In addition, pedoclimatic conditions are modified near the trees compared to the middle of crop alleys, with lower radiation (Dufour et al. 2013), lower wind speeds (Mume and Workalemahu 2021) and water stress avoidance especially under (semi-)arid climates (Temani et al. 2021).

Soil respiration, or the total soil CO₂ emissions resulting from heterotrophic and autotrophic respiration (Bond-Lamberty et al. 2004), represents an important component of the carbon cycle in agroecosystems. Soil respiration mainly depends on microbial and root biomass (Wanga et al. 2005) and can be strongly impacted by environmental factors such as soil temperature and water content (Janssens et al. 2001), with varying relationships across seasons, as found in several studies (Tedeschi et al. 2006; Rey et al. 2011). In alley-cropping agroforestry systems, both microbial and root biomass, and environmental factors vary spatially according to the distance from the tree line, and seasonally according to crop development, and could thus contribute to a spatial and seasonal heterogeneity of soil respiration and thereby soil C losses via heterotrophic respiration.

A review quoted 13 publications studying soil C sequestration in inter-cropping agroforestry and still highlighted the lack of identification of optimum configurations of agroforestry systems (Kim et al. 2016). To our knowledge, only rare studies have taken into account spatial heterogeneity of the soil respiration on the horizontal gradient according to the distance from the tree row while assessing a soil C balance in agroforestry systems, including soil C losses. Furthermore, studies of agroforestry systems under Mediterranean climate are missing in the literature. Consequently, the objective of this study was (i) to evaluate the spatial and seasonal heterogeneity of the soil respiration in a young agroforestry

system of type alley-cropping under Mediterranean climate, and (ii) to compare the soil C balance with pure crops and tree plantations conducted under equivalent conditions.

We hypothesized that (i) soil respiration would strongly depend on soil temperature and water content; (ii) due to strong relation to root biomass density and microbial biomass, soil respiration would be higher in the herbaceous strip than in the middle of the intercrop, especially when the intercrop soil is bare between two successive crops. As a result, (iii) the annual soil respiration of the agroforestry system would be higher than the pure crop and lower than the tree plantation. (iv) Due to higher annual C inputs to the soil, the agroforestry system would allow soil C sequestration, such as the (recent) tree plantation, while the pure crop could have a negative soil C balance.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The study was conducted at the “Dispositif Instrumenté en Agroforesterie Méditerranéenne sous contrainte hydrique” (DIAMs), in Mauguio, France (43.612°N; 3.976°E). The soils in this area are characterized by a high stone content and are classified as Skeletic Rhodic Luvisols (IUSS Working group WRB 2014). Soil physical and chemical properties are mentioned in Siegwart et al. (2022). The Mediterranean climate is characterized by dry and hot summers and mild winters, with a mean annual temperature of 15.6 °C and 650 mm of annual precipitation (Fertahi et al. 2022).

This site of 5 ha is divided into 3 blocks representing independent replicates. Each block is divided into 3 systems: agroforestry, conventional pure crop and tree plantation (Fig. V-2). The alley-cropping agroforestry system is an association of black locust trees (*Robinia pseudoacacia*) planted in 2017 and 2018 at a density of 295 trees ha⁻¹ and a succession of cereal (wheat, barley) and legume (pea, chick pea) crops. In each replicated block, 5 tree rows are spaced 17 m apart and oriented according to a North-East / South-West axis (Fig. V-2). Trees are planted every 2m on each row. A herbaceous strip completes the tree row with a width of 1 m on each side of the tree line, meaning that crop alleys are 15 m wide. The herbaceous strip was sown in 2019 with a mixture of *Lolium arundinaceum*, *Dactylis glomerata*, *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*, but the main species identified in 2022 were *Anacyclus clavatus*, *Festuca arundinacea*, *Malva sylvestris*, *Lolium perenne*, *Bromus sp*, *Medicago sativa* and *Sonchus oleraceus*. The conventional pure crop had the same crop succession as in the agroforestry system. In the tree plantation black locust trees were planted in 2017 and 2018 at a density of 1250 trees ha⁻¹.

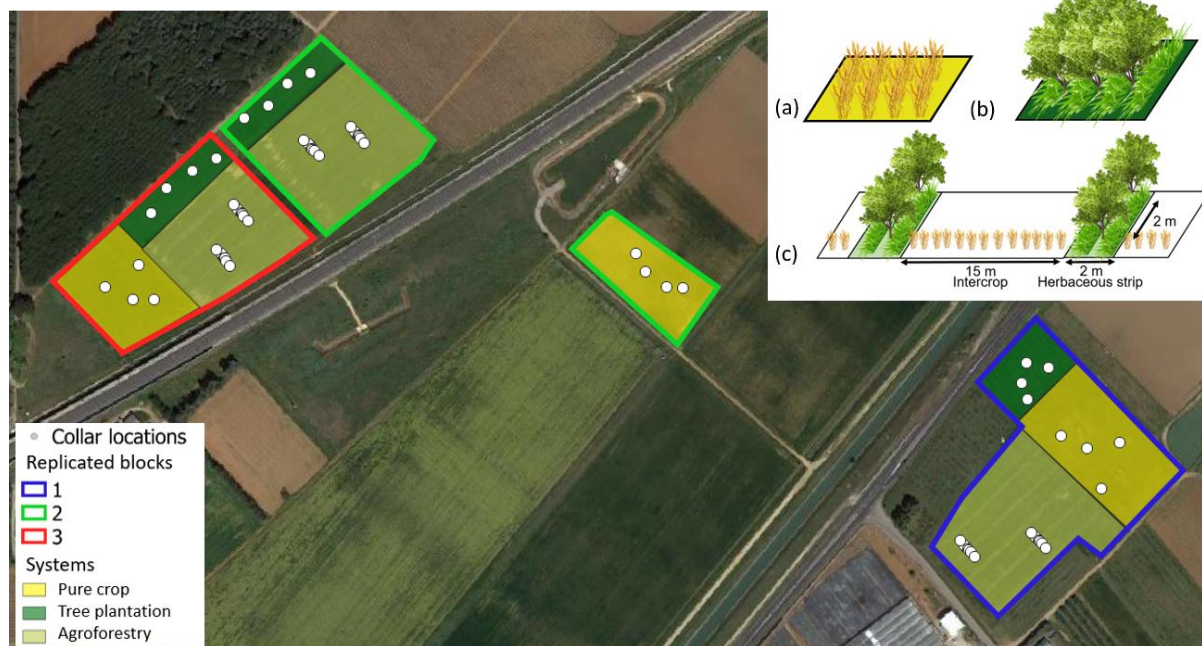


Fig. V-2 Aerial view of the experimental set-up comprising 3 replicated blocks each with the 3 systems (conventional pure crop, tree plantation and agroforestry). Locations of the 72 sampling positions are represented with the grey circles.

Crop management was identical in the agroforestry and pure crop systems. In early September 2020, winter rapeseed (*Brassica napus subsp. napus*) was sown as a break crop. However, crop failure due to lack of rain led to a combination of rapeseed and ray-grass during autumn and winter. As a consequence, the vegetation was destroyed by plowing in December 2020 before sowing malting barley (*Hordeum vulgare*) as a spring crop in January 2021. Fertilization campaigns with Smart N 46 fertilizer (urea) were conducted on March 4, 2021 ($40.0 \text{ kg N ha}^{-1}$) and on April 26, 2021 ($58.4 \text{ kg N ha}^{-1}$). The crop was harvested in late June 2021 and straw was left on site, mulched and incorporated to the first 10 cm of soil. Thereafter, a pea crop (*Pisum sativum*) was sown in December 2021. A phytosanitary treatment (Kerb Flo) was applied on February 11, 2022. Crop harvest occurred on June 02, 2022, and crop residues were mulched and incorporated to the first 10 cm of soil.

2.2. Experimental design

In each of the 3 replicated agroforestry blocks, a pair of transects was established around 2 randomly chosen trees, one transect towards the southern sunny side, the other towards the northern shaded side. Each transect comprised 4 positions, representing 4 distances from the tree row at 0.5 (in the herbaceous strip), 1.5 (in the crop alley), 3.5 (in the crop alley) and 8.5 m (middle of the crop alley). The design in the agroforestry system thus included 4 distances \times 2 transects \times 2 trees (pseudo-replicates) \times 3 replicated blocks. In the plantation and pure crop, 4 pseudo-replicates were randomly chosen within each block (4 pseudo-replicates \times 3 replicated blocks). In total 72 positions were thus sampled in 6

different land types (pure crop, tree plantation, and 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row in agroforestry).

2.3. Soil CO₂ emission measurements

In total, 40 CO₂ efflux measurement campaigns were conducted over 2 years to evaluate soil respiration, from October 15th, 2020 to October 14th, 2022, to capture temporal variability related to climatic conditions and crop development and management. Measurements were carried out with a dynamic closed chamber (LI-8100, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) placed on permanent polyvinyl chloride (PVC) collars of 20 cm diameter. The collars were embedded approx. 2 cm into the soil surface on October 27th, 2020 at each sampling location (Fig. V-2). Before each agricultural intervention, the collars were removed from the soil and subsequently replaced at the exact same location throughout the study. No measurement was carried out for a minimum of 48 hours after each replacement of collars. For each new installation of the collars, the height of the emerged part of the collar (the “off-set”) was measured at four different places of each collar in order to estimate the air volume. During the whole experiment, all emergent vegetation was cut and removed from inside the collars. The plant litter that was deposited naturally inside the collars was left where it was. The sequence of analysed collars was randomized at each campaign to avoid diurnal fluctuation effects (Huérffano et al. 2015; Chang et al. 2016) and all measurements were always taken between 8 AM and 3 PM. For each measurement, the dynamic closed chamber was placed on the collar. The increase of CO₂ concentration in the accumulation chamber was recorded during 1 min 40 s by an infrared CO₂ gas analyser (IRGA). The CO₂ efflux was calculated by the LI-8100 System analyser, using an exponential fit according to LI-COR (2010):

$$\frac{dC}{dt} = a(C_x - C_0)e^{-at}$$

where C is the dilution-corrected CO₂ concentration inside the chamber ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), C_x is the asymptote parameter from exponential fit ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), C_0 is the initial dilution-corrected CO₂ concentration ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), a is the rate constant exponential coefficient (s^{-1}) and t is the time (s). Only regression with a R^2 exceeding 0.97 were selected for the dataset. Soil CO₂ emissions were expressed in $\text{kg}_{\text{C-CO}_2} \text{ha}^{-1} \text{year}^{-1}$. Soil temperature and moisture were systematically measured with a PT100 probe (AA model, TC S. A.) and a ECH20 EC-5 (Meter) probe, respectively, between 0 and 10 cm depth near the collar. The voltage measured by the EC-5 probe was used to estimate soil volumetric water content following the inbuilt LI-8100 equation:

$$VWC = -3.14 \cdot 10^{-7} \times V^2 + 1.16 \cdot 10^{-3} \times V - 0.61$$

with VWC the soil volumetric water content ($\text{cm}_{\text{H}_2\text{O}}^3 \text{cm}_{\text{soil}}^{-3}$) and V the voltage measured by the probe (mV).

2.4. Soil and plant analyses

Soils were sampled on four dates: In October 2020 (autumn season), in May 2021 (barley flowering stage), in late June 2021 (barley maturity stage) and in May 2022 (pea flowering stage). Samples were taken in the vicinity of the 72 collars in the first 10 cm of soil with a trowel, always maintaining an equivalent diameter of excavation, immediately sieved at 2 mm and stored at 4°C to retain field moisture prior to analyses. From dry subsamples (at 65°C for 72 hours), total N content was measured using dry combustion (Matejovic 1997) and other subsamples were decarbonated with a solution 5.67% H₃PO₄ (0.98 M) and 3% FeSO₄·7H₂O before dry combustion to determine organic C content with an automatic elemental analyser (Flash 2000, ThermoFischer Scientific). The soil water content was determined with a gravimetric method after drying subsamples at 105°C for 72 hours. From wet subsamples, mineral N was extracted with a 1:4 soil- 1 M KCl solution. NO₃⁻ and NH₄⁺ contents were determined using continuous flow colorimetry (Continuous Flow Analyzer, Skalar, The Netherlands), and their sum represented the mineral soil N content. The soil MBC (microbial biomass C) and MBN (microbial biomass N) were quantified with the chloroform fumigation extraction technique (Vance et al. 1987), including a correction factor of 0.45. On the same four occasions, one soil core per sampling position was sampled with a sampling auger of 9 cm of diameter in the first 10 cm of soil and stored at 4°C prior to root extraction. Roots were manually sorted from the soil and washed on a 0.5 mm sieve.

In February 2022, soil bulk density was measured in the topsoil (0-10 cm) for half of the 72 collars (transects located North of tree rows in agroforestry plots and randomized half in pure crop and tree plantation plots) within 50 cm of the collars. A water method was used as it is suitable for stony soils (Jolivet et al. 2018) with an excavation of approx. 10 cm of diameter from 0 to 10 cm of depth. The excavated soil was passed through a 2 mm sieve, dried at 105 °C for 72 hours and weighed. The volume of the excavation was determined by placing a plastic bag in the excavation hole and measuring the volume of water that filled the bag. The coarse fraction (> 2 mm) was washed with water, dried and weighed to obtain the mass of stones. The stone volume was measured by water immersion in a burette.

Herbaceous aerial biomass and necromass were sampled once per season (Autumn 2021, Winter 2022, Spring 2022 and Summer 2022) in a surface of 1 m² in the tree plantation and in the herbaceous strip of the agroforestry systems of each of the 3 blocks.

Tree leaf litterfall was estimated by sampling fallen leaves from three contiguous trees using a plastic net (7 x 2 mm mesh size) supported by a metallic cage. One cage was installed per block of agroforestry and tree plantation systems. The leaves were collected every 10 days from July 2021 to December 2021. The collected leaves were immediately dried at 55°C at the laboratory and weighed.

In August 2021 after harvest, barley crop residues were sampled in each replicated block a surface of 1 m² at 0.5 and 3.5 m from the tree row in agroforestry. Samples found at 3.5 m accounted for the distance 8.5 m in agroforestry and the pure crop. In July 2022 after harvest, pea crop residues were sampled in

each replicated block a surface 0.0625 m² at 0.5 m, 8.5 m in agroforestry and the pure crop. Samples found at 8.5 m accounted for the distance 3.5 m in agroforestry.

For vegetation samples (roots, tree leaf litter, herbaceous biomass, herbaceous necromass and pea crop residues), dry mass was determined after drying at 50°C for 72 hours. Samples were ground and analysed for C and N contents with an automatic elemental analyser (Flash 2000, ThermoFischer Scientific). Only barley residues and tree leaf litter were not analysed and C contents of 39.9% (Cookson et al. 1998) and 48% (Rahmonov 2009) respectively were assumed for further calculations.

2.5. Soil C balance estimation

To establish the soil C balance of the 0-10 cm soil layer, C inputs and losses were estimated. First, C stocks in living roots were calculated by multiplying root biomass density by root C content. Both variables were measured at the crop flowering stage (May 2021 and May 2022), when we assumed that root biomass would be maximal. For the crops (barley in 2021 and pea in 2022), we assumed that all roots entered the soil compartment at harvest. Thus, 100% of the C stock in living roots was considered as an annual root litter-derived C input. In contrast, the annual root litter-derived C of the perennial herbaceous species in the herbaceous strip of the agroforestry system and in the tree plantation was considered 53% of the C stock in living roots, based on an annual root turnover rate of 53% in grasslands (Gill and Jackson 2000). Here, the release of C through rhizodeposition was not taken into account. For the herbaceous strip of the agroforestry system and the tree plantation, aerial C inputs were estimated as the sum of all four necromasses (from the four seasons). For the crops, the aerial C inputs were calculated by multiplying crop residue mass and the corresponding C content and the estimated annual aerial C input was the average input of both crops (barley in 2021 and pea in 2022). For the trees, the aerial C inputs from leaf litterfall were calculated by summing all the seasonally collected leaves of a given cage. Total annual leaf dry weight was divided by the cumulative diameter of the three trees. This ratio was used to estimate in each block and each system the litterfall of each tree from its diameter.

Second, annual cumulative soil respiration was estimated for each land type as the average over replicated positions, considering the measurement in the morning as representative of the average flux in the entire day. For each position the annual flux was calculated as the sum of the daily fluxes obtained by linear interpolation between measurement dates. This gap filling method is the standard practice for deriving an emission estimate over a specified time period (Dorich et al. 2020). Soil heterotrophic respiration was assumed to represent 50% of the total soil respiration, according to estimations available in the literature under equivalent climates (Bond-Lamberty et al. 2004; Morell et al. 2012; Lai et al. 2017). Cumulative annual soil losses (through estimated heterotrophic respiration) and cumulative annual soil C inputs of the agroforestry system was computed based on the surface proportion represented by each position on a transect (11.76%, 11.76%, 35.29% and 41.18% for the 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m

distances from the tree line, respectively; no distinction was made between transects located to the north or the south of a tree row, Supplementary Fig. V-1).

Last, soil organic C stocks were calculated by taking into account the high stones content, as the product of soil organic C content, bulk density of the fine fraction, layer depth and a coefficient (1- stone volumetric fraction).

2.6. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with the R statistical software 4.0.5 (R Core Team 2020). P-values below the threshold of 0.05 were considered as significant. To analyse the effect of distance, orientation, date and their interaction as fixed factors and the 2 pseudo-replicated trees within the 3 replicated blocks as random factors on the CO₂ efflux, soil temperature, water content, N content, microbial biomass C, microbial biomass N, root density, root C content, root N content, and soil C stocks, a first set of linear mixed models were investigated on a dataset restricted to the agroforestry system (distances 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row) (Supplementary Table V-1). Then, for variables that were not significantly impacted by the orientation, a second set of linear mixed models were investigated on the entire dataset with land type, date (when appropriate) and their interactions as fixed factors and the 3 replicated blocks as random factors (Supplementary Table V-2).

Soil respiration during the period of active crop root decomposition was calculated with the linear interpolation method only during the period of active root decomposition i.e. from April, 01st to August, 01st (Siegwart, unpublished data) of each year (2021 and 2022). Out of the period of root decomposition, root might not affect soil respiration. Consequently, to relate soil respiration to potential explaining factors including root biomass, soil respiration during the period of active crop root decomposition was preferred to annual soil respiration. To do so, simple ordinations of some selected variables i.e. root biomass density, soil respiration during root decomposition, microbial biomass C, soil organic C content, soil total N content, soil bulk density and stone content were conducted using a Principal Component Analysis (PCA) with the *vegan* and *factoextra* packages.

According to the results of the PCA, correlations between soil respiration during root decomposition, soil microbial biomass C and root biomass density were investigated using a set of covariance analysis (ANCOVA) mixed effect models. Changes in correlations according to the land types were tested using a model comparison approach (Siegwart et al. 2022). The percentage of soil respiration variance explained by the fixed and the random effects were evaluated by calculating marginal and conditional R² respectively (Nakagawa and Schielzeth 2013; Johnson 2014).

We used the *lme4* and *car* packages for all the linear mixed models and analyses of variance, and post hoc Tukey tests were used to assess differences between factors. The normality of the residues and the homogeneity of the variances were verified with respectively the Shapiro–Wilk and Bartlett tests. When

necessary (p -values $< 5\%$), logarithmic or square root transformations were applied to warrant a normal distribution.

3. Results

For all static (measured once) and dynamic (measured at 4 dates) variables, data from different orientations (north and south) in agroforestry were merged in Table V-1 as the orientation had no significant effect on these variables. Soil organic C, total N, stone contents and bulk density were considered as static variables during the whole experimentation (2 years). Soil C and N contents were globally low in this Mediterranean soil and only the tree plantation soils had to have higher values of C content ($1.3 \pm 0.5\%$) compared to the other land types (around 1.0% , p -value = 3.19×10^{-2}). The stone volumetric content was more than 11.3% in all land types.

Dynamic soil variables such as microbial C and N biomass and mineral N content were significantly impacted by the interaction of land types and sampling period (p -value = 2.51×10^{-12} , 6.42×10^{-9} and 5.63×10^{-15} respectively, Supplementary Table V-2). In the intercrop and pure crop, soil mineral N content was higher and microbial biomass C was lower at barley flowering and maturity than at pea flowering and autumn. During the barley crop, and due to fertilization in the cropped soil only (Siegwart et al. 2022), the soil mineral N content was lower in the herbaceous strip of the agroforestry system and in the tree plantation than in the crop alleys of the agroforestry system and in the pure crop. The crop alleys in the vicinity of the herbaceous strip (1.5 m from the tree row) showed lower mineral N content than the other cropped soils. Soil microbial biomass N was constant in the cropped soils across seasons and distances from the tree row, and presented higher values in the herbaceous strip and the tree plantation, especially at barley flowering.

Root variables such as root biomass density, root C and N contents were also significantly impacted by the interaction of land types and sampling period (p -value = 2.34×10^{-4} , 2.97×10^{-2} and 7.39×10^{-10} respectively, Supplementary Table V-2). Root biomass density was always higher in the herbaceous strip and tree plantation than in the cropped soils, especially at pea flowering ($2.0 \pm 1.3 \text{ g dm}^{-3}$), when the cropped roots also reached higher values than at the other sampling periods (up to $0.5 \pm 0.9 \text{ g dm}^{-3}$). Root C and N contents showed no clear difference between land types. At pea flowering, roots (including those of the herbaceous species) were poorer in C (maximum $40.9 \pm 3.0\%$ in the pure crop) and N ($1.6 \pm 0.6\%$ at 1.5 and 3.5 m from the tree row) than roots from other sampling periods.

Table V-1 Static soil variables and root and dynamic soil variables across the studied periods (A: autumn, BF: barley flowering, PF: pea flowering and BM: barley maturity) for each land type (pure crop, tree plantation and distances 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row in agroforestry). All variables were measured in the first 10 cm of soil. Data are mean \pm standard deviations (n=12). Data from different orientations (north and south) in agroforestry were merged. Uppercase letters indicate significant differences between periods within each land type. Lowercase letters indicate significant differences between land types within each period.

Systems		Agroforestry				Pure crop	Tree plantation
Distances from the tree row (m)		0.5	1.5	3.5	8.5	n.a.	n.a.
Static soil variables							
Organic C content %		1.0 \pm 0.3 ab	1.0 \pm 0.3 ab	0.9 \pm 0.2 a	1.0 \pm 0.2 ab	1.0 \pm 0.2 ab	1.3 \pm 0.5 b
Total N content %		0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0
Bulk density including stones g cm ⁻³		1.2 \pm 0.1 a	1.5 \pm 0.3 c	1.5 \pm 0.3 bc	1.3 \pm 0.3 abc	1.3 \pm 0.1 ab	1.4 \pm 0.1 abc
Stone volumetric content %		11.3 \pm 9.1	14.4 \pm 9.7	12.6 \pm 7.4	13.1 \pm 9.2	12.0 \pm 8.5	12.6 \pm 6.9
Dynamic soil variables across periods							
Microbial C mg kg ⁻¹	A	265.7 \pm 90.9 Aa	294.7 \pm 118.4 Aa	259.8 \pm 106.9 Ba	241.7 \pm 57.6 Ba	266.7 \pm 71.3 Ba	381.2 \pm 304.7 Aa
	BF	392.2 \pm 124.4 Bb	210.4 \pm 43.6 Aa	154.0 \pm 24.9 Aa	150.2 \pm 39.0 Aa	183.3 \pm 51.1 Aa	715.4 \pm 350.9 Bc
	PF	463.6 \pm 150.5 Bbc	317.2 \pm 89.0 Aab	253.5 \pm 64.1 Ba	246.3 \pm 65.4 Ba	346.3 \pm 60.6 Bab	609.6 \pm 339.3 Bc
	BM	412.0 \pm 230.6 ABb	224.0 \pm 145.8 Aab	165.8 \pm 50.1 ABa	222.6 \pm 80.6 ABab	159.9 \pm 66.1 Aa	815.7 \pm 540.8 Bc
Microbial N mg kg ⁻¹	A	27.8 \pm 13.7 Aa	25.5 \pm 14.3 Aa	24.2 \pm 10.9 Aa	21.9 \pm 10.6 Aa	24.7 \pm 11.0 Aa	42.8 \pm 37.0 Aa
	BF	64.2 \pm 27.6 Bb	20.0 \pm 12.3 Aa	13.5 \pm 7.3 Aa	13.2 \pm 7.1 Aa	20.6 \pm 10.8 Aa	121.1 \pm 64.8 Cc
	PF	55.3 \pm 22.6 Bb	26.2 \pm 8.6 Aa	17.0 \pm 5.8 Aa	17.4 \pm 6.9 Aa	16.2 \pm 4.0 Aa	59.5 \pm 56.2 ABb
	BM	34.0 \pm 18.8 ABa	14.5 \pm 10.4 Aa	12.4 \pm 11.8 Aa	15.7 \pm 7.5 Aa	12.3 \pm 9.4 Aa	83.1 \pm 60.8 Bb
Mineral N mg kg ⁻¹	A	3.9 \pm 1.8 ABa	2.4 \pm 1.7 Aa	3.2 \pm 1.7 Ba	2.9 \pm 1.3 Aa	4.3 \pm 2.3 Aa	14.2 \pm 15.4 Bb
	BF	2.8 \pm 1.3 Aa	11.4 \pm 10.7 Bbc	15.8 \pm 9.0 Cc	18.0 \pm 10.6 Bc	13.0 \pm 9.6 Bc	4.7 \pm 3.4 Aab
	PF	2.2 \pm 1.0 Abc	1.3 \pm 0.8 Aa	1.5 \pm 0.9 Aa	2.1 \pm 0.9 Aab	3.1 \pm 1.4 Ab	3.3 \pm 1.7 Ab
	BM	6.4 \pm 2.4 Ba	8.8 \pm 3.8 Bab	35.3 \pm 28.9 Cbc	29.0 \pm 11.0 Bc	19.8 \pm 12.8 Bbc	12.4 \pm 10.3 Bab
Root variables across periods							
Root biomass density g dm ⁻³	A	0.2 \pm 0.1 Ab	0.1 \pm 0.1 Ab	0.1 \pm 0.1 Aab	0.1 \pm 0.1 Aab	0.0 \pm 0.0 Aa	0.1 \pm 0.1 Aab
	BF	0.4 \pm 0.3 Bb	0.2 \pm 0.1 BCab	0.2 \pm 0.1 Bab	0.2 \pm 0.1 Bab	0.1 \pm 0.1 Ba	0.3 \pm 0.2 Bab
	PF	2.0 \pm 1.3 Cb	0.5 \pm 0.4 Ca	0.5 \pm 0.9 Ba	0.3 \pm 0.2 Ba	0.2 \pm 0.2 Ba	2.5 \pm 1.3 Cb
	BM	0.2 \pm 0.1 ABa	0.1 \pm 0.1 ABa	0.1 \pm 0.0 ABa	0.1 \pm 0.0 ABa	0.1 \pm 0.1 Ba	0.2 \pm 0.1 Ba
Root C %	A	41.8 \pm 0.47 Ba	42.9 \pm 1.2 Ba	42.9 \pm 1.2 Ba	42.9 \pm 1.2 Ba	41.5 \pm 5.3 Aa	42.4 \pm 4.0 Ba
	BF	47.2 \pm 3.1 Ca	46.5 \pm 6.2 Ba	44.6 \pm 6.9 Ba	47.6 \pm 6.7 Ca	44.8 \pm 2.5 Aa	45.7 \pm 3.7 BCa
	PF	33.0 \pm 4.8 Aa	35.2 \pm 4.8 Aab	34.8 \pm 5.9 Aa	36.4 \pm 7.1 Aab	40.9 \pm 3.0 Ab	30.9 \pm 4.0 Aa

	BM	47.8±1.3 Ca	46.1±0.4 Ba	45.6±0.5 Ba	45.5±0.7 BCa	45.3±1.9 Aa	46.9±0.6 Ca
Root N %	A	2.4±0.6 Bb	1.2±0.3 Aa	1.2±0.3 Aa	1.2±0.3 Aa	2.0±0.7 Ab	2.1±0.3 Bb
	BF	1.9±0.8 ABab	1.9±0.5 Bab	2.1±0.4 Cab	2.4±0.8 Bb	2.1±0.5 Ab	1.5±0.3 Aa
	PF	1.6±0.3 Aa	1.6±0.5 ABa	1.6±0.6 ABa	1.9±1.2 Ba	2.2±0.6 Aa	1.6±0.5 ABa
	BM	2.4±0.6 Ba	1.7±0.1 ABa	1.9±0.2 BCa	1.8±0.1 Ba	1.8±0.3 Aa	1.7±0.2 ABa

The herbaceous bio- and necromass showed reversed dynamics across seasons in the tree plantation and in the agroforestry system (Fig. V-3, p -value = 6.16×10^{-3}). The biomass was significantly higher in spring compared to the rest of the year. The necromass was the highest in summer and in autumn, with higher values in the agroforestry strip than in the tree plantation, and presented lower values for both systems in winter and spring.

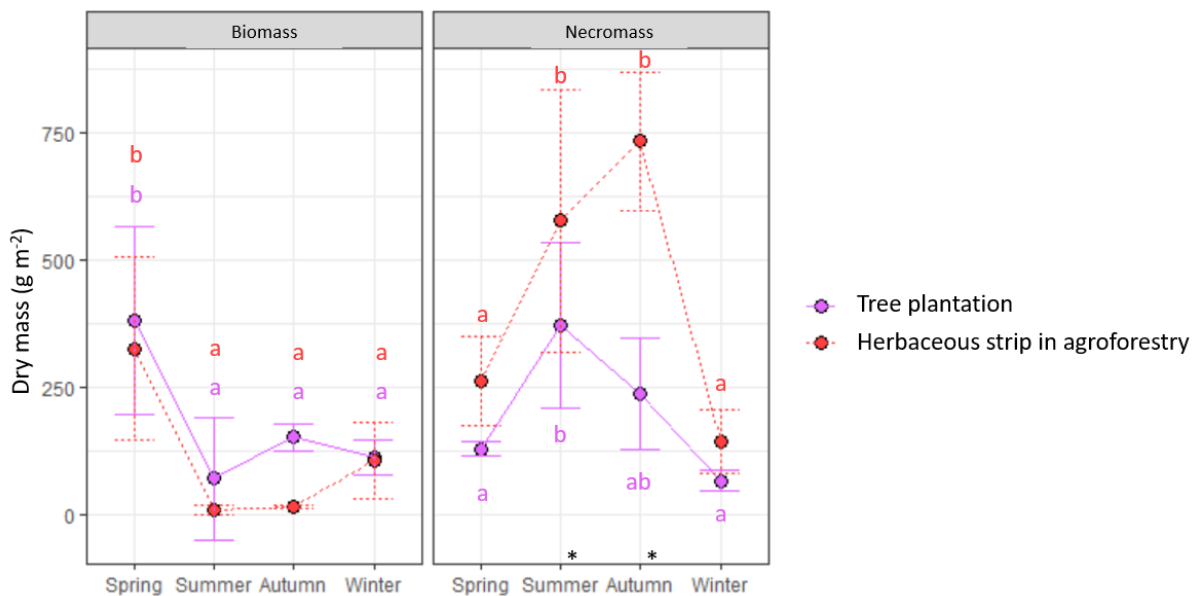
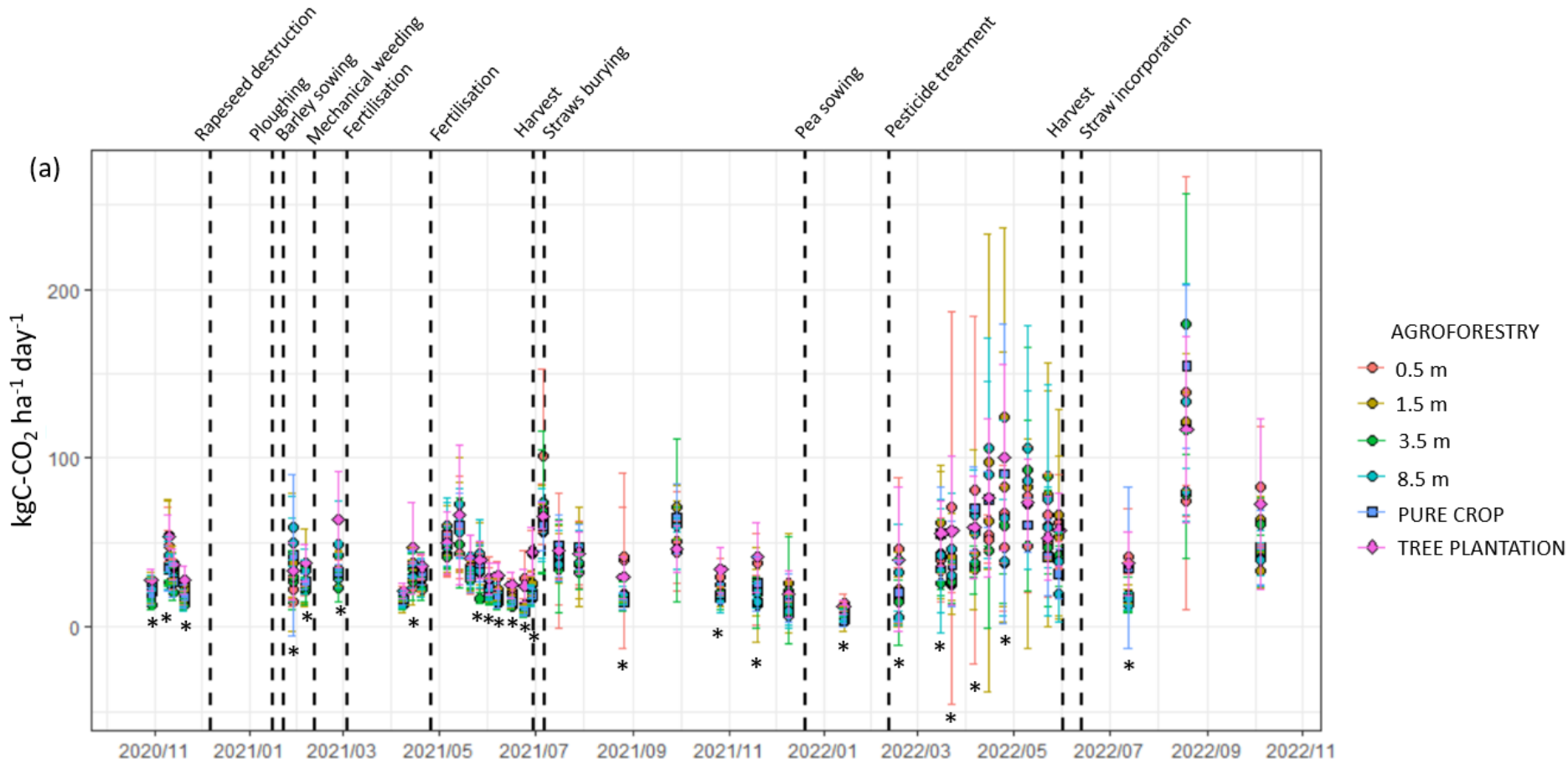


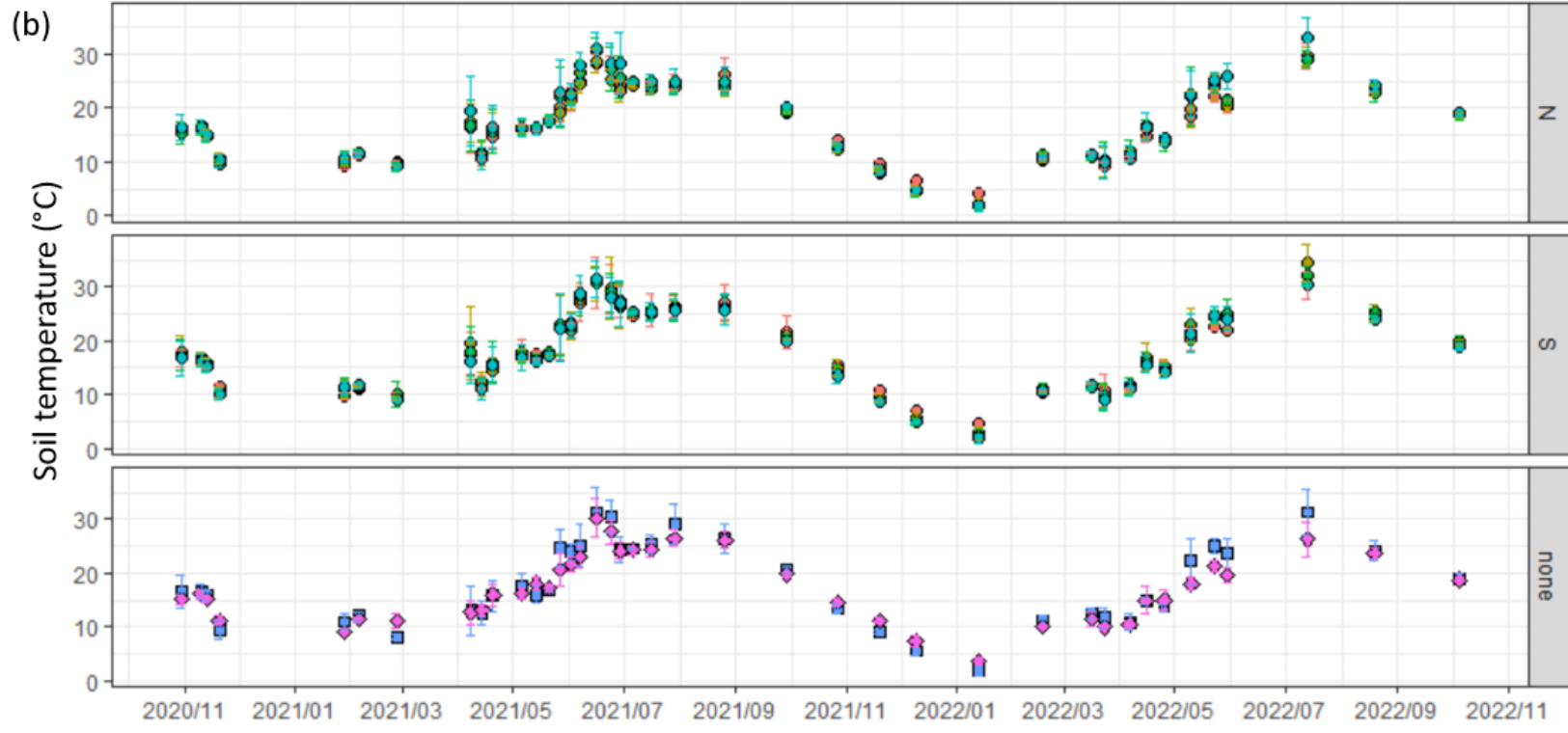
Fig. V-3 Herbaceous aerial biomass and necromass in the herbaceous strip of the agroforestry system and the tree plantation across seasons (spring, summer, autumn and winter, $n=3$). * indicates significant differences among land types within a season. Lowercase letters indicate significant differences between seasons within a land type.

Soil respiration showed equivalent seasonal dynamics across land types, with several peaks, reaching $80 \text{ kgC-CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ day}^{-1}$ at barley flowering and again at harvest and in October 2021, more than $100 \text{ kgC-CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ day}^{-1}$ at pea flowering and again in mid-August 2022 (Fig. V-4a). For several acquisition campaigns, the soil respiration in the tree plantation was higher than in the other land types, and the herbaceous strip in the agroforestry system tended to show similar values. During annual crops growing periods, soil temperature and soil respiration were increasing.

Soil temperature and water content varied significantly according to land type, orientation and time (p -value = 1.56×10^{-5} and 8.10×10^{-9} , respectively, Supplementary Table V-3). Soil temperature ranged from 2 (January) to more than 30 °C (July, Fig. V-4b) and soil water content ranged from 0 to $0.3 \text{ m}_{\text{H}_2\text{O}}^3 \text{ m}_{\text{soil}}^{-3}$ (Fig. V-4c). The tree plantation system presented higher water content and more stable temperatures across seasons than the pure crop system.

Less than 30% of soil respiration was explained by soil temperature (Supplementary Fig. V-2). Below 21.4°C, soil respiration increased with soil temperature, while it decreased after this threshold. No significant relationship could be found between soil respiration and soil water content (data not shown).





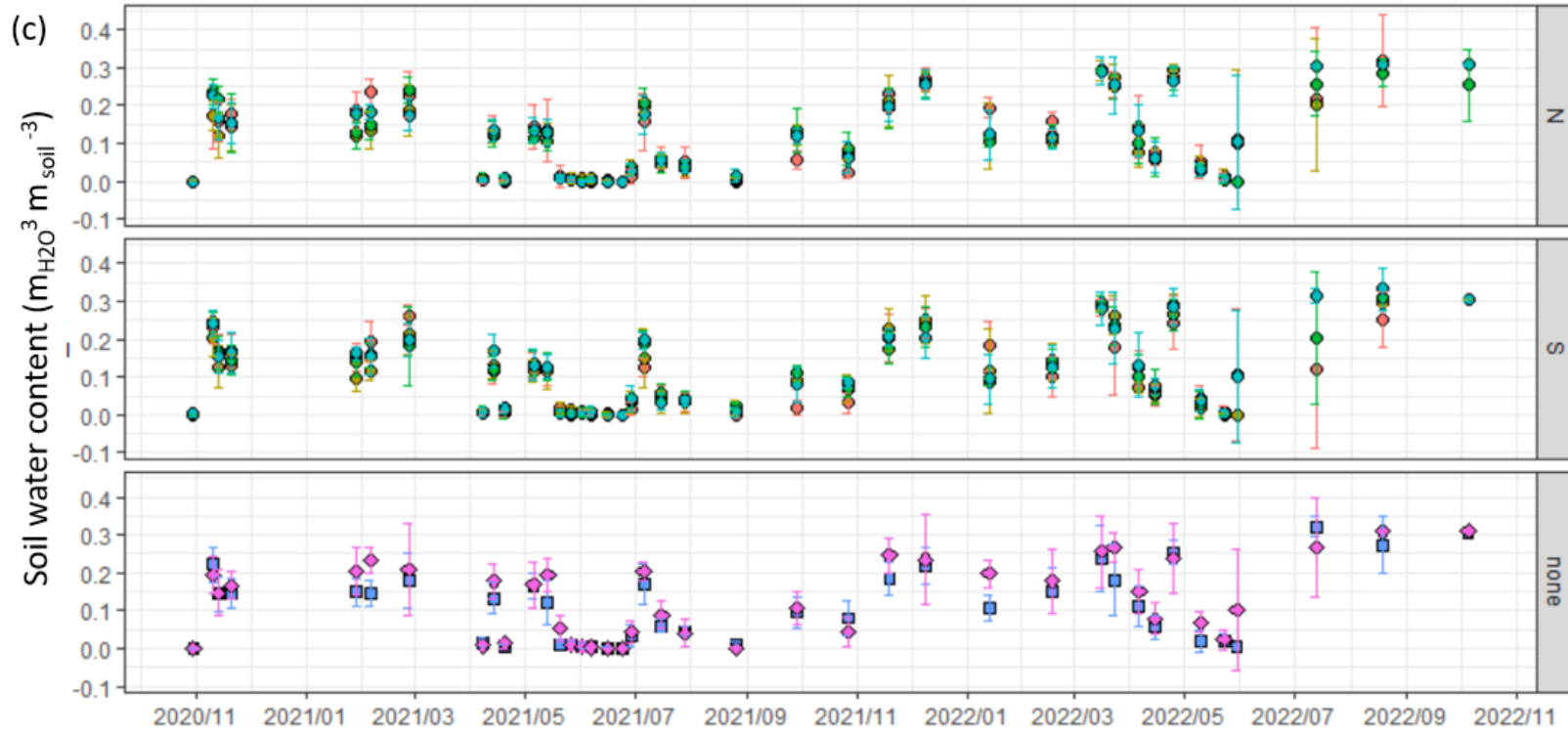


Fig. V-4 Soil respiration (a, n=12), soil temperature (b) and soil water content (c, n=12 in pure crop and tree plantations and n=6 in agroforestry) for each land type (pure crop, tree plantation and distances 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row in agroforestry) and each orientation (N: north, S: south in agroforestry and none: no orientation (pure crop and tree plantation) in (b) and (c)).

The first axis of the PCA captured 36.7% of the variations and was represented by soil C, N and stone content (Fig. V-5). The second axis (24.1% of the variations) showed a gradient of soil respiration, root and microbial biomass with increasing values from the pure crop and middle of the crop alley in agroforestry, to the herbaceous strip and tree plantation.

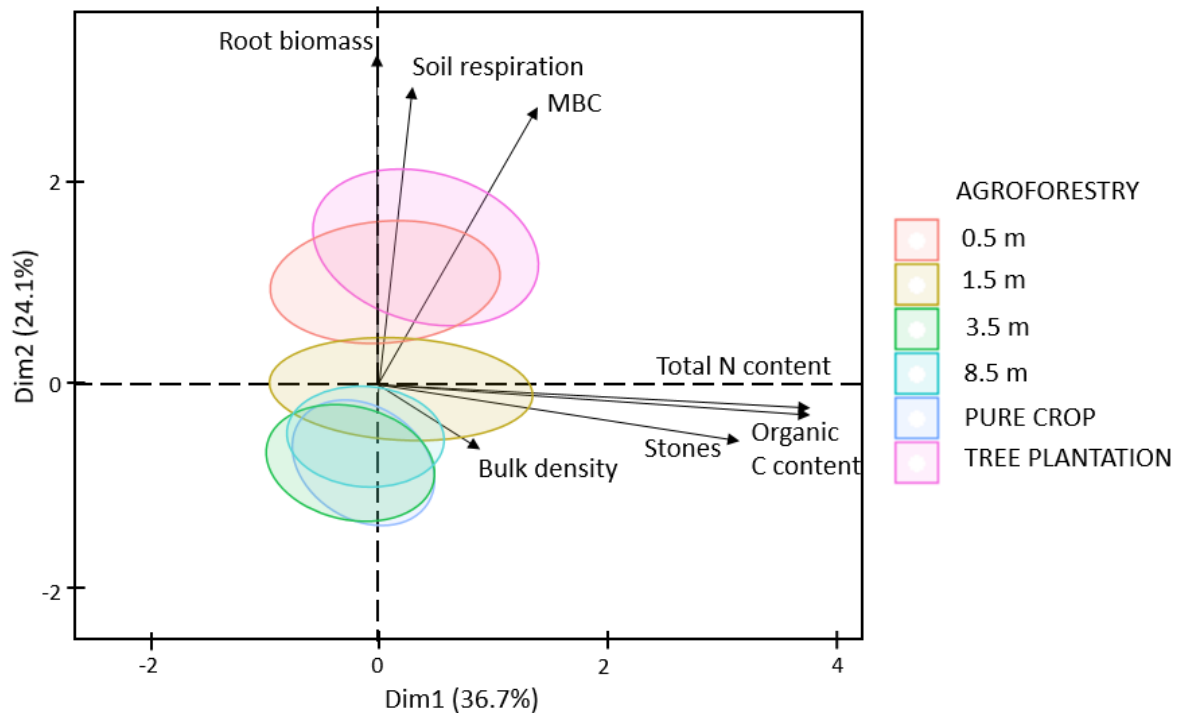


Fig. V-5 Principal component analysis of some selected variables (soil respiration during the period of active crop root decomposition, root biomass density, microbial biomass C, bulk density, stones content, soil organic C content, soil total N content) according to land types (pure crop, tree plantation and distances 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row in agroforestry)

Microbial biomass C ($p\text{-value} = 6.06 \times 10^{-3}$) and root biomass density ($p\text{-value} = 3.11 \times 10^{-5}$) both explained a part of the soil respiration during active root decomposition that is not explained by the land type; thus the correlations showed equivalent regression coefficients between land types (Fig. V-6). Marginal R^2 (variation explained by the fixed effect i.e. land type) and conditional R^2 (variation explained by the random effect i.e. blocks) were quite low (below 20%).

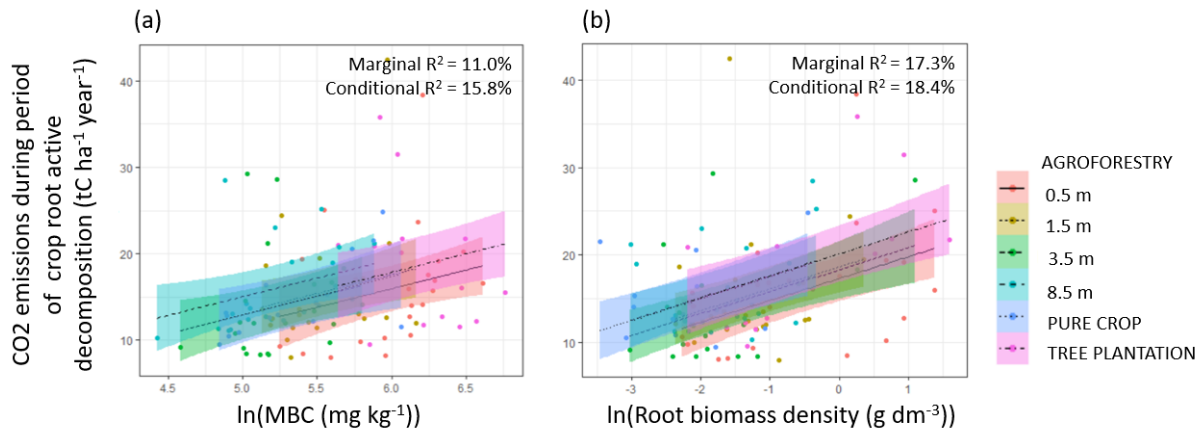


Fig. V-6 Soil respiration (tC ha⁻¹ year⁻¹) – during the period of active crop root decomposition according to ln(MBC) with MBC: microbial biomass C (a) and ln(root biomass density) (b) for each land type (pure crop, tree plantation and distances 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row in agroforestry) (n=24).

The soil C stocks in the 10 first cm of soil were significantly impacted by the land type (p-value = 2.58×10^{-4}) with higher values in the tree plantation (13.4 ± 3.9 tC ha⁻¹) than in the other locations (ranging between 8.8 and 12.1 tC ha⁻¹, Fig. V-7).

At this stage of agroforestry (4-5 years age), the aerial and root C inputs were equivalent in the agroforestry crop alleys (all distances from the tree line) and in the pure crop, with a total of about 1.7 tC ha⁻¹ year⁻¹ (Fig. V-7). The herbaceous strip increased the C inputs (total of 7.17 tC ha⁻¹ year⁻¹). Indeed, the aerial C inputs from the herbaceous necromass in agroforestry were 4 times higher than the C inputs from crop residues after harvest. In addition, C inputs came from the tree litter fall and were higher in the tree plantation than in agroforestry. In the 10 first cm of soil, the root litter-derived C inputs estimated from the turnover of herbaceous species in the tree plantation and the agroforestry system were slightly but significantly higher (0.19 ± 0.10 and 0.16 ± 0.11 tC ha⁻¹ year⁻¹, respectively) than those estimated from crop root mortality (maximum 0.14 ± 0.09 tC ha⁻¹ year⁻¹ at 1.5 m from the tree row and even lower when further). As a result, when interpolating the C inputs at the scale of the agroforestry system (Supplementary Fig. V-1), total aerial C inputs (from herbaceous aerial necromass, tree litterfall and crop residues) were estimated at 2.2 tC ha⁻¹ year⁻¹ and root C inputs at around 0.11 tC ha⁻¹ year⁻¹. The C inputs in the tree plantation (total of 4.63 tC ha⁻¹ year⁻¹) were significantly higher (p-value = 2.63×10^{-6} and 1.58×10^{-3} for the aerial and root inputs respectively) than those of all other land types.

The cumulative annual soil C losses (heterotrophic respiration) were not significantly impacted by the system (p-value = 0.09), however tended to be higher and with higher variations in the tree plantation (8.7 ± 1.4 tC ha⁻¹ year⁻¹) than in the agroforestry system (6.7 ± 0.6 tC ha⁻¹ year⁻¹) and in the pure crop (7.3 ± 0.5 tC ha⁻¹ year⁻¹, Fig. V-7).

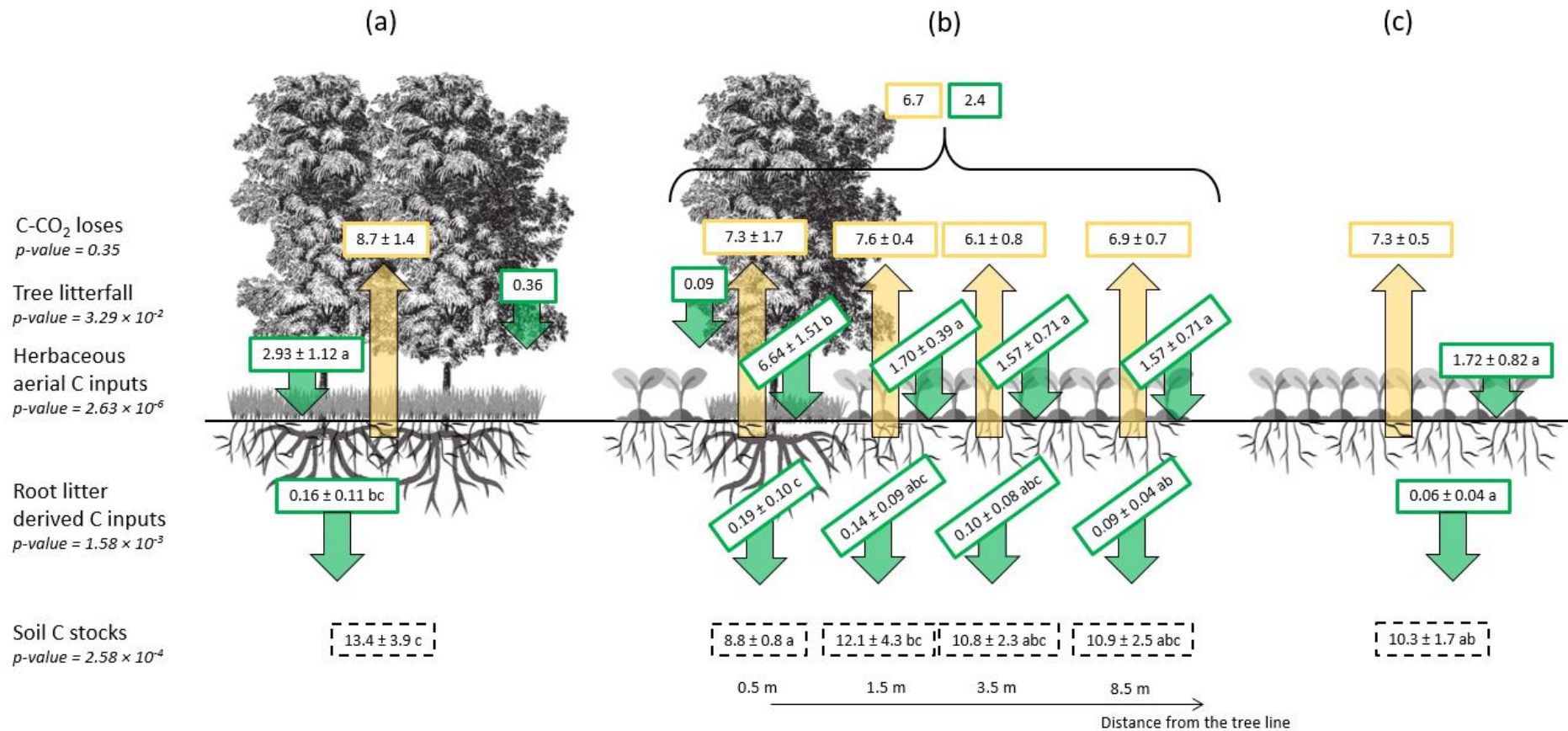


Fig. V-7 Soil C balance in the tree plantation (a), the agroforestry system (b) and the pure crop (c). Yellow arrows correspond to the annual C losses from the soil (heterotrophic respiration). Green arrows correspond to the annual root litter and aerial plant parts derived C inputs. Soil and root C measurements were conducted in the 10 first cm of soil. Plain boxes are C fluxes in $\text{tC ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ and dotted boxes are soil C stocks in tC ha^{-1} . Values are expressed per hectare of each land type (pure crop, tree plantation and distances 0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree row in agroforestry). To get the values per hectare of agroforestry, data from the alley and tree row were weighted by their respective surface area (Supplementary Fig. V-1) and then added up. Within each flux or stock, lowercase letters indicated significant differences between the locations and p-values were indicated for each variable.

4. Discussion

4.1. Spatial and seasonal heterogeneity of soil respiration

The first hypotheses were that soil respiration would mainly depend on pedoclimatic conditions such as soil temperature and water content across seasons in these Mediterranean systems, and that variations between distances from the tree row within the agroforestry system would be explained by differences in root and microbial biomass. As expected, the temporal dynamics of soil respiration during the 2 years of experimentation were coherent across the land types, as they are all under equivalent climatic conditions. And yet, less than 30% of soil respiration variance was explained by soil temperature, which is relatively low compared to the literature (Carey et al. 2016). Soil moisture could possibly explain a higher part of soil respiration as expected under a Mediterranean climate (González-Ubierna and Lai 2019), but no relationship could be established on our data, possibly because of a lack of precision in measured soil moisture due to the high stone content, that increases spatial variability and can also have affected probe contact with the fine soil. Soil respiration was correlated to root and microbial biomass ($R^2 = 18.4$ and 15.8% , respectively, during the root active decomposition period) but not to soil organic C as already found in other studies (Bae et al. 2013). The effect of soil organic C content on soil respiration may be more apparent when comparing different ecosystems with a wider range of values than our collars from the same site (Lohila et al. 2003).

For both years (2020 with barley and 2021 with pea), soil respiration increased with crop growth and increasing soil temperatures, and showed a peak at crop flowering, which also approximately corresponded to the flowering of trees and herbaceous species, while other studies found a peak of soil respiration several weeks after crop residue burial (Buyanovsky et al. 1986). During this period, soil respiration tended to be higher in the herbaceous strip in agroforestry and the tree plantation than in the collars occupied by the crop. This was constant with the observation of decreasing soil respiration after croppicing (Tedeschi et al. 2006). Under the perennial vegetation (herbaceous strip in agroforestry and tree plantation), higher organic matter inputs such as aerial necromass from the herbaceous species (vs. none from the crop) and higher root biomass density compared to barley and pea could probably induce higher heterotrophic respiration through rhizodeposition and turnover, and autotrophic respiration, thus justifying the observed high respiration (Dilly and Munch 1998; Mukerji et al. 2006).

After the flowering peak, we could not determine if the decrease of soil respiration until harvest was because of a decrease of root respiration activity between plant flowering and maturity, because the temperatures exceeded the threshold of 21.4°C (determined by the correlation of soil respiration and soil temperature with our data) or because water content became limiting for plant or microbial activity. After harvest, the crop alley in the agroforestry system and the pure crop soils were kept bare, while the herbaceous species in the agroforestry tree rows and the tree plantation were still present. Even if their aerial biomass during this period was half that measured in Spring, suggesting low root respiration and

probably turnover, their aerial necromass was very high and the microbial biomass thus as well. As a consequence, the soil respiration measured in the collars occupied by herbaceous species (herbaceous strip in agroforestry and tree plantation) tended to be higher than those occupied by the crop (crop alleys in agroforestry and pure crop) across all seasons.

4.2. Soil C balance in agroforestry compared to tree plantation and pure crop

Our second objective was to assess the soil C balance, i.e. inputs and losses, in all land uses in order to compare the 3 studied systems. The soil C losses through heterotrophic respiration were very high in all studied systems (for example in the agroforestry system $6.7 \text{ tC ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) compared to the total C inputs ($2.4 \text{ tC ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$) and the soil C stocks in the 10 first cm (around 11 tC ha^{-1}). Even if Mediterranean soil have been recognized as highly susceptible to soil degradation (Ferreira et al. 2022) and thus to soil C losses, it is not realistic to interpret that half of the existing stock is lost per year. There were various uncertainties on all of the component fluxes. First, to verify the annual C losses estimated with a linear interpolation assuming linear variations between 2 campaigns, a gap filling method using temperature as covariate was conducted. With this method, the estimated annual soil respiration was even higher, reaching approx. 12.2 tC ha^{-1} in the agroforestry system (data not shown), which could support our estimations with the linear interpolation. However, the low correlation between soil respiration and temperature (Supplementary Fig. V-2) used as covariates for the gapfilling could in fact over-estimate the fluxes as well. In addition, the much higher values of soil respiration in summer 2022 compared to summer 2021 remained unexplained and could participate to the overestimation of the soil C losses. Second, the root-derived C inputs were no doubt largely under-estimated. Indeed, by contrast to the CO₂ efflux measurements at the soil surface reflecting CO₂ emissions originating from the whole soil profile (Davidson et al. 2006), we could only consider the 10 first cm of soil for the soil C inputs, due to sampling difficulties (stoniness, extremely hard soils when dry and sludgy conditions when wet). This under-estimation would concern trees, which are deep rooted, especially in agroforestry systems (Cardinael et al. 2015) but also crop roots, which were exploring deep soils up to 100 cm (Siegwart et al. 2022). Furthermore, we did not estimate the root exudates, which surely play an important role in the heterotrophic respiration as labile organic matter (Pausch and Kuzyakov 2018; Vives-Peris et al. 2020). By contrast, the aerial C inputs through necromass were probably over-estimated with our calculation method, because between 2 sampling campaigns all previous necromass might not be completely decomposed (Incerti et al. 2011). This study illustrates the need of further studies to (i) better interpolate manual soil respiration measurements (automatic chambers are nice but costly and limited in spatial coverage), and (ii) to prospect the autotrophic and heterotrophic fluxes and processes occurring in the deeper soil horizons in order to establish unbiased soil C balances. And yet, despite strong uncertainties, we could compare the estimated soil C balance between the 3 studied systems (agroforestry, tree plantation and pure crop).

While the soil C losses were not significantly different between the 3 studied systems, the soil C inputs were higher in the tree plantation than in the agroforestry system, itself presenting higher values than the pure crop. Unsurprisingly, perennial species contributed more to annual C inputs than crops. Indeed, aerial inputs in the crop alley and pure crop were only due to a small part of the leaves falling randomly in the crop alley, and to crop residues, which were much lower than the herbaceous aerial necromass. In addition, the belowground inputs in the crop alley and pure crop were lower than those in the herbaceous strip and the tree plantation. Despite lower turnover considered for the calculations (53% for the perennial species vs. 100% for the annual crops), the fine root biomass density was more than 2 times higher under the perennial vegetation than under the cropped soils. As a result, the tree plantation was possibly gaining more soil C compared to the pure crop, in agreement with the higher soil C stocks after only 5 years of land type differentiation. The soil C balance of the agroforestry system was situated between those of the tree plantation and of the pure crop, which was not enough to differentiate its soil C stocks from the pure crop. In the next years, the development of the tree plantation and of the herbaceous strip in agroforestry would stabilize (slow biomass turnover across the year of the perennial species), while pure crops would continue to have a fast development (crop growing in a short period before harvest).

5. Conclusions

In these 3 Mediterranean systems (agroforestry, pure crop and tree plantation), soil respiration varied homogeneously during the 2 years experimentation, suggesting that it was mainly controlled by pedoclimatic conditions. Agroforestry systems, by combining perennial species and annual crops, induce a heterogeneity of the temporal dynamics of the aerial and root C inputs to the soil, and thus offer an uninterrupted source of organic matter for soil organisms throughout the year, at least in certain patches of the system/in the vicinity of tree rows. In addition, higher aerial and root C inputs were quantified in the agroforestry system than in the pure crop, without generating higher soil C losses, at least 3-5 years after tree plantation. This is especially beneficial under a Mediterranean climate, where crop biomass production is relatively low and soils are particularly inclined to soil C depletion.

References

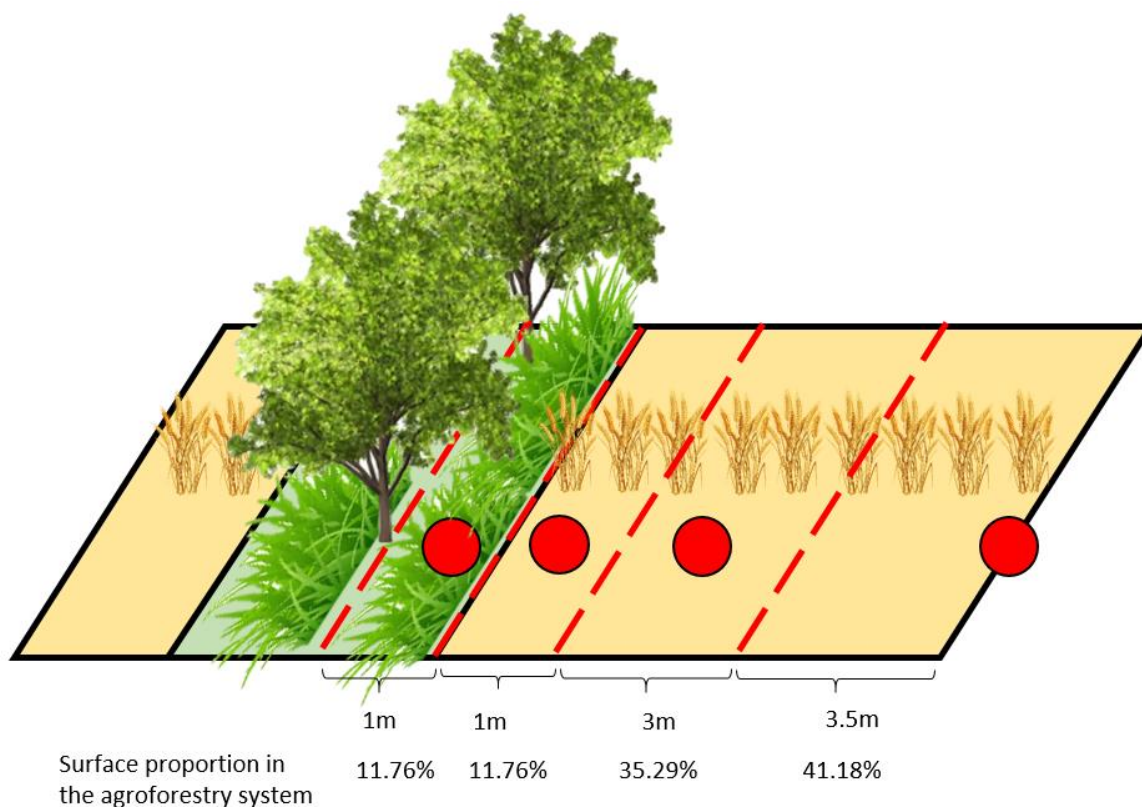
- Bae K, Lee DK, Fahey TJ, Woo SY, Quaye AK, Lee Y-K (2013) Seasonal variation of soil respiration rates in a secondary forest and agroforestry systems. *Agroforest Syst* 87:131–139. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9530-8>
- Bond-Lamberty B, Wang C, Gower ST (2004) A global relationship between the heterotrophic and autotrophic components of soil respiration? *Global Change Biology* 10:1756–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00816.x>
- Buyanovsky GA, Wagner GH, Gantzer CJ (1986) Soil Respiration in a Winter Wheat Ecosystem. *Soil Science Society of America Journal* 50:338–344. <https://doi.org/10.2136/sssaj1986.03615995005000020017x>
- Cardinael R (2015) Stockage de carbone et dynamique des matières organiques des sols en agroforesterie sous climat méditerranéen et tempéré. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE)
- Cardinael R, Mao Z, Prieto I, Stokes A, Dupraz C, Kim JH, Jourdan C (2015) Competition with winter crops induces deeper rooting of walnut trees in a Mediterranean alley cropping agroforestry system. *Plant Soil* 391:219–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2422-8>
- Carey JC, Tang J, Templer PH, Kroeger KD, Crowther TW, Burton AJ, Dukes JS, Emmett B, Frey SD, Heskell MA, Jiang L, Machmuller MB, Mohan J, Panetta AM, Reich PB, Reinsch S, Wang X, Allison SD, Bamminger C, Bridgman S, Collins SL, de Dato G, Eddy WC, Enquist BJ, Estiarte M, Harte J, Henderson A, Johnson BR, Larsen KS, Luo Y, Marhan S, Melillo JM, Peñuelas J, Pfeifer-Meister L, Poll C, Rastetter E, Reinmann AB, Reynolds LL, Schmidt IK, Shaver GR, Strong AL, Suseela V, Tietema A (2016) Temperature response of soil respiration largely unaltered with experimental warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:13797–13802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605365113>
- Chang SX, Shi Z, Thomas BR (2016) Soil respiration and its temperature sensitivity in agricultural and afforested poplar plantation systems in northern Alberta. *Biol Fertil Soils* 52:629–641. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1104-x>
- Cookson WR, Beare MH, Wilson PE (1998) Effects of prior crop residue management on microbial properties and crop residue decomposition. *Applied Soil Ecology* 7:179–188. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(97\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(97)00032-2)
- Davidson EA, Savage KE, Trumbore SE, Borken W (2006) Vertical partitioning of CO₂ production within a temperate forest soil. *Global Change Biology* 12:944–956. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01142.x>
- D'Hervilly C (2021) Impact du linéaire sous arboré sur les organismes et la fertilité du sol en système agroforestier tempéré. Montpellier, SupAgro
- Dilly O, Munch J-C (1998) Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils. *Biol Fertil Soils* 27:374–379. <https://doi.org/10.1007/s003740050446>
- Dorich CD, De Rosa D, Barton L, Grace P, Rowlings D, Migliorati MDA, Wagner-Riddle C, Key C, Wang D, Fehr B, Conant RT (2020) Global Research Alliance N₂O chamber methodology guidelines: Guidelines for gap-filling missing measurements. *J environ qual* 49:1186–1202. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20138>
- Duarte EMG, Cardoso IM, Stijnen T, Mendonça MAFC, Coelho MS, Cantarutti RB, Kuyper TW, Villani EMA, Mendonça ES (2013) Decomposition and nutrient release in leaves of Atlantic Rainforest tree species used in agroforestry systems. *Agroforest Syst* 87:835–847. <https://doi.org/10.1007/s10457-013-9600-6>
- Dufour L, Metay A, Talbot G, Dupraz C (2013) Assessing Light Competition for Cereal Production in Temperate Agroforestry Systems using Experimentation and Crop Modelling. *Journal of Agronomy and Crop Science* 199:217–227. <https://doi.org/10.1111/jac.12008>

- Ferreira CSS, Seifollahi-Aghmiuni S, Destouni G, Ghajarnia N, Kalantari Z (2022) Soil degradation in the European Mediterranean region: Processes, status and consequences. *Science of The Total Environment* 805:150106. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150106>
- Fertahi S, Pistocchi C, Daudin G, Amjoud M, Oukarroum A, Zeroual Y, Barakat A, Bertrand I (2022) Experimental dissolution of biopolymer-coated phosphorus fertilizers applied to a soil surface: Impact on soil pH and P dynamics. *Annals of Agricultural Sciences* 67:189–195. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2022.12.004>
- Gale WJ, Cambardella CA, Bailey TB (2000) Root-Derived Carbon and the Formation and Stabilization of Aggregates. *Soil Science Society of America Journal* 64:201–207. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.641201x>
- Gill RA, Jackson RB (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems: RESEARCH Root turnover in terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 147:13–31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00681.x>
- González-Ubierna S, Lai R (2019) Modelling the effects of climate factors on soil respiration across Mediterranean ecosystems. *Journal of Arid Environments* 165:46–54. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.02.008>
- Guillot E (2018) Gradient spatial de fonctionnement et de stabilité écologique d' un sol en système agroforestier Méditerranéen. These, Montpellier, SupAgro
- Guillot E, Bertrand I, Rumpel C, Gomez C, Arnal D, Abadie J, Hinsinger P (2021) Spatial heterogeneity of soil quality within a Mediterranean alley cropping agroforestry system: Comparison with a monocropping system. *European Journal of Soil Biology* 105:103330. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103330>
- Huérffano X, Fuertes-Mendizábal T, Duñabeitia MK, González-Murua C, Estavillo JM, Menéndez S (2015) Splitting the application of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP): Influence on greenhouse gases emissions and wheat yield and quality under humid Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 64:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.11.008>
- Incerti G, Bonanomi G, Giannino F, Rutigliano FA, Piermatteo D, Castaldi S, De Marco A, Fierro A, Fioretto A, Maggi O, Papa S, Persiani AM, Feoli E, De Santo AV, Mazzoleni S (2011) Litter decomposition in Mediterranean ecosystems: Modelling the controlling role of climatic conditions and litter quality. *Applied Soil Ecology* 49:148–157. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.06.004>
- IUSS Working group WRB (2014) World reference base for soil resources 2014: international soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome
- Janssens IA, Kowalski AS, Ceulemans R (2001) Forest floor CO₂ fluxes estimated by eddy covariance and chamber-based model. *Agricultural and Forest Meteorology* 106:61–69. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(00\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(00)00177-5)
- Johnson PCD (2014) Extension of Nakagawa & Schielzeth's R^2_{GLMM} to random slopes models. *Methods Ecol Evol* 5:944–946. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12225>
- Jolivet C, Falcon J-LA, Berche P, Boulonne L, Fontaine M, Gouny L, Lehmann S, Maitre B, Ratié C, Schellenberger E, Soler-Dominguez N (2018) Manuel du Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS)
- Kim D-G, Kirschbaum MUF, Beedy TL (2016) Carbon sequestration and net emissions of CH₄ and N₂O under agroforestry: Synthesizing available data and suggestions for future studies. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 226:65–78. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.04.011>
- Lai R, Arca P, Lagomarsino A, Cappai C, Seddaiu G, Demurtas CE, Roggero PP (2017) Manure fertilization increases soil respiration and creates a negative carbon budget in a Mediterranean maize (*Zea mays* L.)-based cropping system. *CATENA* 151:202–212. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.12.013>
- Lee K-H, Jose S (2003) Soil respiration and microbial biomass in a pecan — cotton alley cropping system in Southern USA. *Agroforestry Systems* 58:45–54. <https://doi.org/10.1023/A:1025404019211>

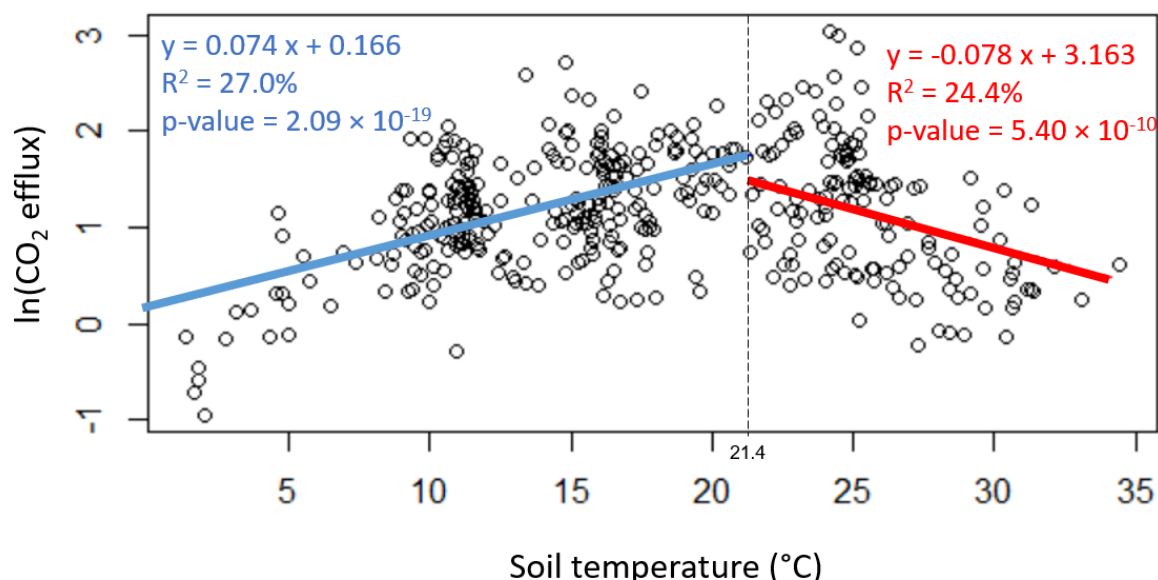
- LI-COR (2010) Using the 8100A soil gas flux system
- Lohila A, Aurela M, Regina K, Laurila T (2003) Soil and total ecosystem respiration in agricultural fields: effect of soil and crop type. *Plant and Soil* 251:303–317. <https://doi.org/10.1023/A:1023004205844>
- Lorenz K, Lal R (2014) Soil organic carbon sequestration in agroforestry systems. A review. *Agron Sustain Dev* 34:443–454. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0212-y>
- Matejovic I (1997) Determination of carbon and nitrogen in samples of various soils by the dry combustion. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28:1499–1511. <https://doi.org/10.1080/00103629709369892>
- Morell FJ, Whitmore AP, Álvaro-Fuentes J, Lampurlanés J, Cantero-Martínez C (2012) Root respiration of barley in a semiarid Mediterranean agroecosystem: field and modelling approaches. *Plant Soil* 351:135–147. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0938-0>
- Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (2006) *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer
- Mume ID, Workalemahu S (2021) Review on Windbreaks Agroforestry as a Climate Smart Agriculture Practices. *AJAF* 9:342. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20210906.12>
- Nakagawa S, Schielzeth H (2013) A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol* 4:133–142. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x>
- Pardon P, Reubens B, Reheul D, Mertens J, De Frenne P, Coussement T, Janssens P, Verheyen K (2017) Trees increase soil organic carbon and nutrient availability in temperate agroforestry systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 247:98–111. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.018>
- Pausch J, Kuzyakov Y (2018) Carbon input by roots into the soil: Quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology* 24:1–12. <https://doi.org/10.1111/gcb.13850>
- R Core Team (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*
- Rahmonov O (2009) The chemical composition of plant litter of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) and its ecological role in sandy ecosystems. *Acta Ecologica Sinica* 29:237–243. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.08.006>
- Rey A, Pegoraro E, Oyonarte C, Were A, Escribano P, Raimundo J (2011) Impact of land degradation on soil respiration in a steppe (*Stipa tenacissima* L.) semi-arid ecosystem in the SE of Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 43:393–403. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.007>
- Siegwart L, Jourdan C, Piton G, Sugihara S, Van den Meersche K, Bertrand I (2022) Root distribution and properties of a young alley-cropping system: effects on soil carbon storage and microbial activity. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05714-9>
- Swinnen J (1994) Rhizodeposition and turnover of root-derived organic material in barley and wheat under conventional and integrated management. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 51:115–128. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90038-8)
- Tedeschi V, Rey A, Manca G, Valentini R, Jarvis PG, Borghetti M (2006) Soil respiration in a Mediterranean oak forest at different developmental stages after coppicing. *Global Change Biology* 12:110–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01081.x>
- Temani F, Bouaziz A, Daoui K, Wery J, Barkaoui K (2021) Olive agroforestry can improve land productivity even under low water availability in the South Mediterranean. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 307:107234. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107234>
- Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS (1987) An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19:703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)

- Vanlauwe B, Nwoke OC, Sanginga N, Merckx R (1996) Impact of residue quality on the C and N mineralization of leaf and root residues of three agroforestry species. *Plant Soil* 183:221–231. <https://doi.org/10.1007/BF00011437>
- Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM (2020) Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Rep* 39:3–17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Wanga W, Ohse K, Liu J, Mo W, Oikawab T (2005) Contribution of root respiration to soil respiration in a C3/C4 mixed grassland. *J Biosci* 30:507–514. <https://doi.org/10.1007/BF02703725>

Supplementary Data



Supplementary Fig. V-1 Surface proportion occupied by each land type studied in the agroforestry system i.e. distances from the tree line. Red circles represent the collars.



Supplementary Fig. V-2 Relationship between soil temperature and soil respiration using average values for each land type, distance from the tree line within agroforestry, orientation and acquisition date.

Supplementary Table V-1 Statistics on the dataset restricted to the agroforestry plots to analyse the effect of distances from the tree line, orientation, date and their interactions on several variables.

	Distances (0.5, 1.5, 3.5 and 8.5 m from the tree line)	Orientation (north and south)	Date or period	Interactions
CO2 efflux	2.28×10^{-3}	0.37	$< 2.2 \times 10^{-16}$	None
Soil temperature	0.37	5.16×10^{-9}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	Distances -Orientation 4.23×10^{-5}
Soil volumetric water content	2.17×10^{-2}	1.10×10^{-2}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	Distances -Orientation 2.72×10^{-2} Orientation-Date 5.64×10^{-9}
Soil organic C content	0.35	0.22		0.86
Soil total N content	0.70	0.65		0.68
Stones content	0.40	0.32		0.17
Mineral N content	5.07×10^{-7}	0.69	$< 2.2 \times 10^{-16}$	Distances - Period 4.11×10^{-8}
Microbial biomass C	$< 2.2 \times 10^{-16}$	0.70	1.19×10^{-8}	Distances - Period 4.08×10^{-6}
Microbial biomass N	$< 2.2 \times 10^{-16}$	0.72	9.65×10^{-3}	Distances - Period 4.62×10^{-9}
Root biomass density	1.17×10^{-7}	0.78	$< 2.2 \times 10^{-16}$	None
Root C content	0.76	0.79	$< 2.2 \times 10^{-16}$	None
Root N content	7.48×10^{-4}	0.84	$< 2.2 \times 10^{-16}$	Distances - Period 1.08×10^{-5}
Soil C stocks	1.99×10^{-3}	0.33		0.98

Supplementary Table V-2 Statistics on the entire dataset for variables presenting no significant effect of orientation within the agroforestry to analyse the effect of land type, date and their interactions on several variables.

	Land type (including distance from the tree line)	Date or period	Interactions
CO2 Flux	6.84×10^{-13}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	$< 2.2 \times 10^{-16}$
Annual CO2 emission (linear interpolation)	0.35		
Soil C content	3.19×10^{-2}		
Soil N content	0.05		
Stones content	0.77		
Bulk density	1.10×10^{-3}		
Mineral N	3.59×10^{-8}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	5.63×10^{-15}
Microbial C	$< 2.2 \times 10^{-16}$	9.17×10^{-7}	2.51×10^{-12}
Microbial N	$< 2.2 \times 10^{-16}$	1.66×10^{-3}	6.42×10^{-9}
Root density	8.24×10^{-14}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	2.34×10^{-4}
Root C content	0.46	$< 2.2 \times 10^{-16}$	2.97×10^{-2}
Root N content	6.42×10^{-5}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	7.39×10^{-10}

Supplementary Table V-3 Statistics on the entire dataset for variables presenting a significant effect of orientation within the agroforestry to analyse the effect of land type, date and their interactions on several variables.

	Land type (including distance from the tree line and orientation)	Date	Interactions
Temperature	1.73×10^{-7}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	1.56×10^{-5}
VWC	4.92×10^{-6}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	8.10×10^{-9}

Supplementary Table V-4 Statistics to analyse the effect of land type, season, type of vegetation and their interactions on the dry mass.

	Land type (herbaceous strip in agroforestry and tree plantation)	Season (spring, summer, autumn and winter)	Type (biomass and necromass)	Interactions
Dry mass	4.41×10^{-3}	1.07×10^{-4}	5.21×10^{-7}	Land type – Season – Type 6.16×10^{-3}

Supplementary Table V-5 Results of the ANCOVA: effects of some soil and root variables (explicative variable), location and their interaction on the CO₂ emissions (response variable). Data are p-values. Column ANOVA (lm1, lm2) answers the hypothesis: “the effect of the explicative variable on the CO₂ emissions varies according to the location”. Column anova (lm2, lm3) answers the hypothesis: “the explicative variable explains a part of the CO₂ emissions that is not explained by the location”.

Response variable	Explicative variable	anova (lm1, lm2)	anova (lm2, lm3)	n
CO ₂ emissions during the period of root active decomposition	ln (Root biomass density)	0.71	3.11×10^{-5}	24
	ln (Microbial biomass C)	0.13	6.06×10^{-3}	

Conclusions et perspectives

L'Article 6 constituant intégralement ce chapitre est le seul comparant 3 systèmes entre eux : agroforesterie, culture pure et plantation d'arbres. Le flux de respiration du sol variait de façon homogène entre les 3 systèmes au cours des 2 ans d'expérimentation jusqu'à $200 \text{ kgC-CO}_2 \text{ ha}^{-1} \text{ jour}^{-1}$, suggérant un contrôle principal par les conditions pédoclimatiques. Dans tous les systèmes, les pertes annuelles de carbone du sol par la respiration hétérotrophe (estimée comme la moitié de la respiration du sol) étaient très élevées ($6.7 \text{ tC ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ en agroforesterie et $8.7 \text{ tC ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ en plantation d'arbre) comparé aux entrées de carbone dans le sol et aux stocks de carbone du sol (Fig. V-7). Cette différence pourrait être expliquée par nos échantillonnages sur les 10 premiers cm de sol uniquement alors que la respiration du sol provient certainement d'horizons plus profonds et que les racines explorent jusque 100 cm de profondeur d'après le Chapitre III. Cet article illustre la nécessité d'études supplémentaires pour mieux interpoler les mesures manuelles de respiration du sol et les méthodes de *gap filling* pour combler les données manquantes, ainsi que de mieux prospecter les flux de respiration dans les horizons profonds du sol pour établir des bilans plus justes.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

Rappel des objectifs et du travail réalisé

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer la contribution des racines d'espèces pérennes et de graminées/légumineuses annuelles aux stocks de carbone dans les sols agroforestiers, en étudiant leurs biomasses, distributions et propriétés, ainsi que leur vitesse de décomposition et l'impact sur l'activité microbienne. Le travail réalisé vise à répondre à cette question en intégrant les horizons profonds de sol, en considérant l'importance de la stœchiométrie des éléments mais sans tenir compte des processus de rhizodéposition.

Pour répondre à cet objectif, un bilan quantitatif et qualitatif des systèmes racinaires des espèces pérennes et annuelles a d'abord été réalisé sur chacun des sites pour évaluer la contribution racinaire aux entrées de carbone dans le sol en fonction de la profondeur et de la distance à l'arbre. Ensuite, les cinétiques de décomposition des litières racinaires ont été évaluées avec la méthode classique des *litterbags* sur Faidherbia-Flux sur les deux gradients spatiaux d'intérêt. Sur le dispositif DIAMS, une méthode innovante a été utilisée pour observer les mécanismes de la décomposition racinaire *in situ*. La réponse microbienne à l'apport de carbone et/ou de nutriments a également été testée sur les sols de DIAMS, notamment pour répondre à des hypothèses sur le *priming effect* en profondeur. Enfin, l'étude des émissions des gaz à effet de serre a permis d'établir un bilan carbone des sols des systèmes étudiés.

Ce présent et dernier chapitre reprend les questions énoncées au début de ce manuscrit (*cf.* Chapitre 2 – Stratégie de recherche) et tente de répondre aux hypothèses formulées en les discutant en référence à la littérature. Ces hypothèses étaient communes aux deux sites choisis pour la thèse, malgré leurs nombreuses différences (types de sol, conditions climatiques, pratiques agricoles, présence/absence d'une bande enherbée...). La discussion croise les résultats des 6 articles scientifiques présentés dans les chapitres antérieurs de ce document, et identifie les limites du travail réalisé. Le lecteur peut se référer aux deux schémas de synthèse des résultats apparaissant en fin de discussion et cités à plusieurs reprises (Fig. Bilan 1 et Fig. Bilan 2).

Question 1 – Quelle est la distribution spatiale (horizontale et verticale) des systèmes racinaires (biomasses et traits) des différentes espèces dans les systèmes agroforestiers étudiés ?

1. Diversité et distribution des systèmes racinaires dans les parcelles agroforestières

1.1. Association plurispécifique

Par définition, plusieurs espèces de végétaux sont présentes sur les parcelles agroforestières. Sur le dispositif DIAMS, les arbres sont jeunes (plantés en novembre 2017) et aucune racine d'arbre n'a été identifiée dans les trois fosses situées à 50 cm des arbres et creusées en mai 2020 soit 2 ans et demi après la plantation en ligne (Limite n°1). De plus, le grand nombre d'espèces dans la bande enherbée aurait complexifié l'étude si l'on avait réalisé une analyse par espèce (Picon-Cochard et al. 2012). Par conséquent, une analyse à l'échelle des communautés a été conduite. Trois communautés souterraines ont été identifiées : les racines des herbacées constituant la bande enherbée, les racines de la culture à proximité de la bande enherbée (entre 1 et 2 m de la ligne d'arbres) et celles de la culture loin de l'influence des espèces pérennes (entre 3.5 m et 4.5 m de la ligne d'arbre). Sur *Faidherbia-Flux*, on a identifié l'arbre *F. albida* avec une distribution naturelle dans le parc, le mil cultivé en 2020 et l'arachide + adventices en 2021. Seules les racines fines et moyennes (<10 mm) sont comptabilisées pour l'étude. La question des racines grosses supérieures à 10 mm reste à élucider (Limite n°2).

Limite n°1 – Présence aléatoire de racines d'arbres sur DIAMS. L'absence de racines d'arbres sur DIAMS dans le prélèvement de 2020 est à nuancer puisqu'en Janvier 2021, un labour préparant la culture d'orge a révélé des racines moyennes et grosses de *R. pseudoacacia* en surface dans l'inter-rang cultivé (Fig. VI-1a). Ces racines présentent des signes de réitération (Fig. VI-1b) en réponse à une taille (récurrente) provoquée par les épisodes de labour réalisés avant chaque semis. Ces observations n'ont cependant pas été généralisées sur l'intégralité de la parcelle car les racines de *R. pseudoacacia* dévoilées par le labour restent assez rares, témoignant toutefois de la tentative de colonisation en surface de l'inter-rang cultivé par certains arbres. D'ailleurs, cela pourrait expliquer la variation des stocks de carbone organique du sol entre octobre 2020 ($12.1 \pm 4.3 \text{ kgC m}^{-3}$, Article 6) et mai 2020 ($6.9 \pm 0.8 \text{ kgC m}^{-3}$, Article 2) et avec un fort écart-type dans la zone cultivée avoisinant la bande enherbée ; les points d'échantillonnage d'octobre tombent peut-être sur des sols amendés en carbone par ces grosses racines via le *turnover* et la rhizodéposition des racines fines qui y sont attachées.

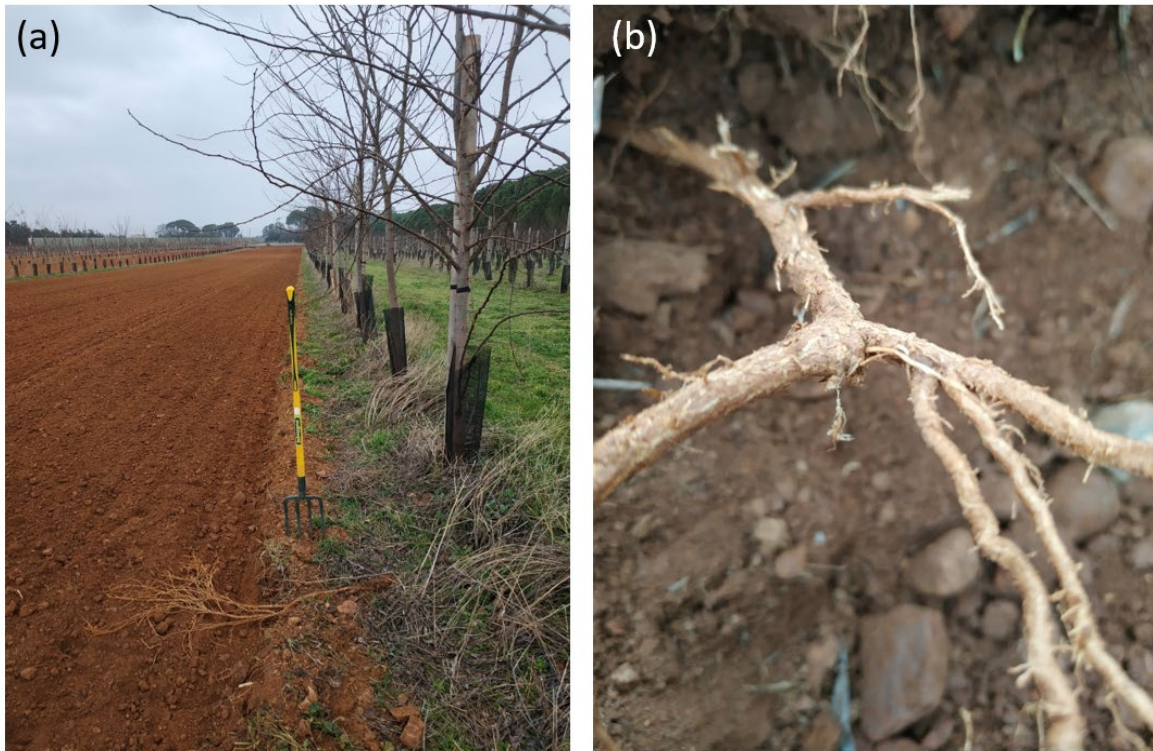


Fig. VI-1 Racines de *R. pseudoacacia* révélées en surface dans l'inter-rang cultivé après le labour de janvier 2021 (a) et réitération des racines en réponse au labour récurrent (b). Source : Lorène Siegart (Janvier 2021).

La présence aussi aléatoire de racines moyennes et grosses de *R. pseudoacacia* sur le site DIAMS contribue à la complexité du système agroforestier récent. En 2022, soit cinq ans après plantation des arbres, une caractérisation du système racinaire du *R. pseudoacacia* a été conduite dans le cadre du projet DSCATT (Post-Doc de Soline Martin-Blangy). Les premières observations montrent une colonisation des racines d'arbres jusqu'à au moins 1.50 m de la ligne d'arbres et jusqu'à 80 cm de profondeur, avec quelques rares racines entre 80 et 130 cm de profondeur. D'après les données d'isotropie, les racines d'arbres ne se dirigent pas vers la profondeur comme à Restinclières (Cardinael et al. 2015) et sur Faidherbia-Flux (Article 1). Un bilan complet des systèmes racinaires de l'arbre, de la bande enherbée et de la culture, sur le même modèle expérimental que cette thèse, pourrait être réalisé 8 ans après plantation (2025). Ainsi, une cinétique temporelle pourrait être tracée et finalement confirmer si les espèces pérennes explorent les horizons profonds sous la zone exploitée par les cultures ou si au contraire elles restent en surface comme dans l'étude menée par Battie-Laclau et al. (2020) dans l'Ariège.

Limite n°2 – Racines grosses de *F. albida*. Seules les racines fines (<2 mm) et moyennes (entre 2 et 10 mm de diamètre) ont pu être quantifiées et analysées dans ce travail. Pourtant, la biomasse des racines grosses (> 10 mm) représente une fraction importante de la biomasse racinaire totale des arbres *F. albida*. Ces racines sont difficiles à échantillonner. Parmi toutes les fosses creusées sur le site Faidherbia-Flux, y compris en dehors du travail de cette thèse, seules des observations et valeurs

ponctuelles ont pu être relevées mais non interprétées puisqu'elles ne prennent pas en compte les racines pivots et les racines proximales (C. Jourdan, communication personnelle). Seule une excavation d'arbres pourrait être réalisée pour avoir accès à ces informations.

Pour caractériser les systèmes racinaires sur les parcelles agroforestières, une étude doit être menée idéalement jusqu'à la profondeur maximum d'enracinement. Sur DIAMS, la profondeur maximum d'enracinement a été observée à 100 cm de profondeur en Mai 2020 (1 ou 2 racines seulement trouvées entre 100 et 150 cm sur l'ensemble des 3 fosses), donc notre étude du profil entre 0 et 100 cm de profondeur intègre la quasi-totalité des racines, quelle que soit la communauté végétale. Sur *Faidherbia-Flux*, les fosses creusées jusqu'à 150 cm de profondeur intègrent tout le système racinaire des cultures annuelles mais pas celui de l'arbre réputé phréatophyte (Limite n°3).

Limite n°3 – Racines profondes de *F. albida*. Lors de travaux extérieurs à la thèse (C. Jourdan, communication personnelle), des racines de *F. albida* ont été observées au niveau du front de la nappe (6 m de profondeur) en grande quantité (Fig. VI-2), du fait de son caractère phréatophyte, *i.e.*, dont les racines sont en contact avec l'eau de la nappe phréatique pour permettre le développement dans les régions sub-désertiques. Malgré tout, le travail d'échantillonnage et de quantification de la biomasse racinaire est laborieux, destructeur et coûteux, et nous nous sommes arrêtés à la profondeur maximum d'enracinement de la culture annuelle, soit 150 cm de profondeur.



Fig. VI-2 Photographie prise dans un puits localisé sous un arbre dans le site expérimental *Faidherbia-Flux*, juste au-dessus du front de la nappe souterraine située à 550 cm de profondeur en août 2020 (a) où le sol a été creusé pour l'installation d'un scanner. (b) Une accumulation de racines fines de *F. albida* a été observée. Source : Christophe Jourdan (17/08/2020).

Dans les sites agroforestiers, la complémentarité des niches écologiques des systèmes racinaires est vérifiée lorsque les racines des espèces de chaque espèce ou communauté explorent des zones qui leur sont propres. Après plusieurs décennies de rotations, le système mature Faidherbia-flux présente des distributions racinaires complémentaires (Article 1) à la fois à proximité de l'arbre et loin de celui-ci. En effet, les racines des cultures se concentrent dans les 10 (voire 30) premiers cm (Fig. VI-3a), et celles des arbres entre 30 et 600 cm (Fig. VI-2) de profondeur. Ce résultat est également observé lorsque les arbres sont introduits en ligne dans des champs cultivés, comme à Restinclières (Cardinael et al. 2015). Dans le système jeune DIAMS, on n'observe pas (encore) de répartition verticale des systèmes racinaires, mais toutefois les trois communautés occupent leur propre zone souterraine (profil) sans empiéter horizontalement sur les autres. Les processus de complémentarité de niche et de facilitation observés sur le profil vertical du sol de Faidherbia-Flux et horizontalement dans le site DIAMS déterminent le fonctionnement des associations végétales et leur efficacité pour l'acquisition des ressources abiotiques (Justes et al. 2014). Ils pourraient aussi réduire les risques de lixiviation vers la profondeur (Avila et al. 2004), diversifier et maximiser les entrées de carbone et de nutriments dans le sol par les litières racinaires.

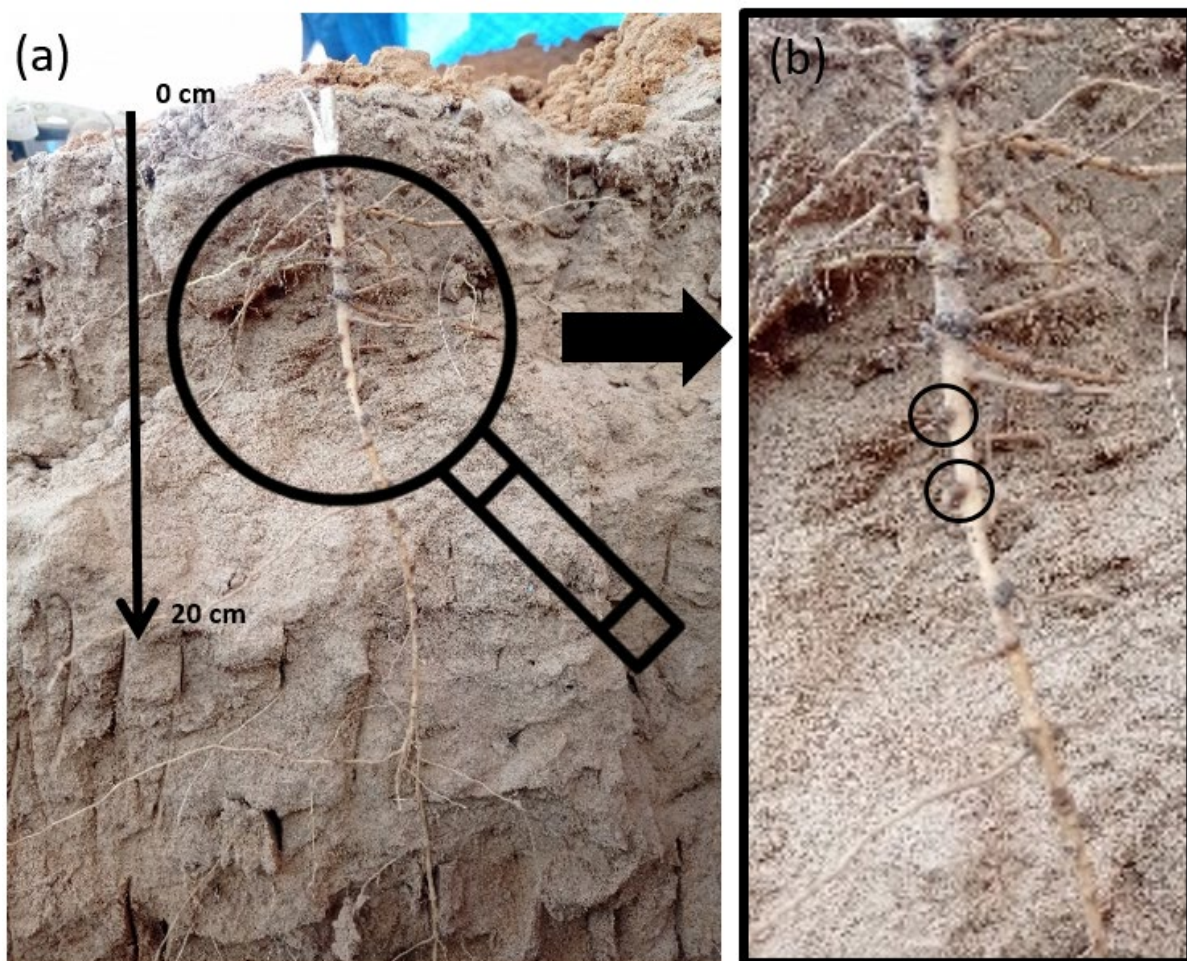


Fig. VI-3 Racine pivot d'arachide mise en évidence lors de la cartographie racinaire. Elle est principalement ramifiée sur les 10 premiers cm de sol (a). Identification des nodules marqueurs de fixation d'azote atmosphérique (b). Source : Lorène Siegwart (octobre 2021).

1.2. Hétérogénéité des propriétés abiotiques du sol

En plus de la diversité des espèces présentes sur les parcelles agroforestières, l'hétérogénéité des propriétés du sol peut impacter le développement des cultures. Sur les deux sites d'étude, le ratio R/S (Root/Shoot) des cultures est plus faible proche de l'arbre que loin. Sur Faidherbia-Flux, les différences observées sur les diamètres moyens racinaires et les ratios R/S entre les cultures aux deux positions étudiées suggèrent une stratégie d'absorption de nutriments sous l'arbre du fait de la demande par la biomasse aérienne plus importante (Fig. VI-4), grâce au microclimat offert par l'arbre (humidité plus importante sous la couronne de l'arbre que loin (Article 3), coupe-vent, mi-ombre *etc.*). Loin de l'arbre, une stratégie d'exploration semble privilégiée, du fait des conditions plus pauvres en nutriments (azote et phosphore) en surface (Article 1 et 3) et du manque d'eau (Fort et al. 2017).



Fig. VI-4 Photographie du site Faidherbia-Flux mettant en évidence la différence de biomasse aérienne de la culture (mil) en fonction de la distance à *F. albida*. Source : Christophe Jourdan.

Les racines fines de *F. albida* sont réparties en quantité équivalente sur la parcelle, que l'on soit sous ou loin de la couronne de l'arbre (puisque aucune différence significative de biomasse racinaire n'est trouvée en fonction des positions étudiées dans les 6 fosses de l'Article 1). En fait, pour compenser les faibles teneurs en nutriments dans les horizons profonds et la faible densité de biomasse racinaire par unité de volume (maximum 15 g m^{-3}), les racines fines de *F. albida* sont distribuées sur de grandes distances (+ de 30 m du tronc), augmentant ainsi la surface d'échange avec le sol. Malgré tout, aucune racine fine d'arbre n'a été trouvée dans l'unique fosse loin du tronc de l'Article 3, interrogeant la répétabilité de nos résultats. De même, les teneurs en nutriments du sol (azote et phosphore) sont variables en profondeur (plus et moins élevés sous que loin des arbres dans les Articles 3 et 1 respectivement) et n'ont pas permis d'identifier une tendance claire. Aucune corrélation entre les nutriments du sol et la biomasse racinaire de *F. albida* n'a pu être établie.

Dans le dispositif DIAMS, les conditions de développement de la culture sont aussi différentes dans l'inter-rang cultivé avoisinant la bande enherbée que plus loin dans l'inter-rang. Premièrement, un effet positif des arbres est l'atténuation, même faible, des variations de température du sol (Fig. VI-5), et probablement aussi des variations d'humidité du sol (Limite n°4). L'importance des modifications du microclimat sur le développement des systèmes racinaires des cultures annuelles n'a pas pu être véritablement testé sur DIAMS (Limite n°5), mais une caractérisation du système racinaire de l'orge l'année suivant la culture du blé a permis d'apporter des éléments de discussion (Annexe A). Deuxièmement, un effet négatif sur la teneur en nutriments dans le sol (Article 2) s'explique par un apport en fertilisant azoté significativement diminué à 1.5 m de la ligne d'arbres par rapport aux autres positions (Annexe B). Ces modifications des conditions pédoclimatiques et nutritives de la culture proche de la bande enherbée n'ont pas de conséquences significatives sur les rendements dans l'inter-rang cultivé agroforestier pour le moment (Annexe C). Cependant, elles impactent les racines de blé avoisinant la bande enherbée. En effet, à 1.5 m de la ligne d'arbres, la biomasse racinaire est réduite de 1/3 en surface par rapport à plus loin dans l'inter-rang cultivé, où elle s'élève à 100-150 g m⁻³. De plus, le SRL (*specific root length*) plus important favorise l'exploration racinaire et un meilleur retour sur investissement par rapport à la culture plus éloignée de la bande enherbée (Article 2).

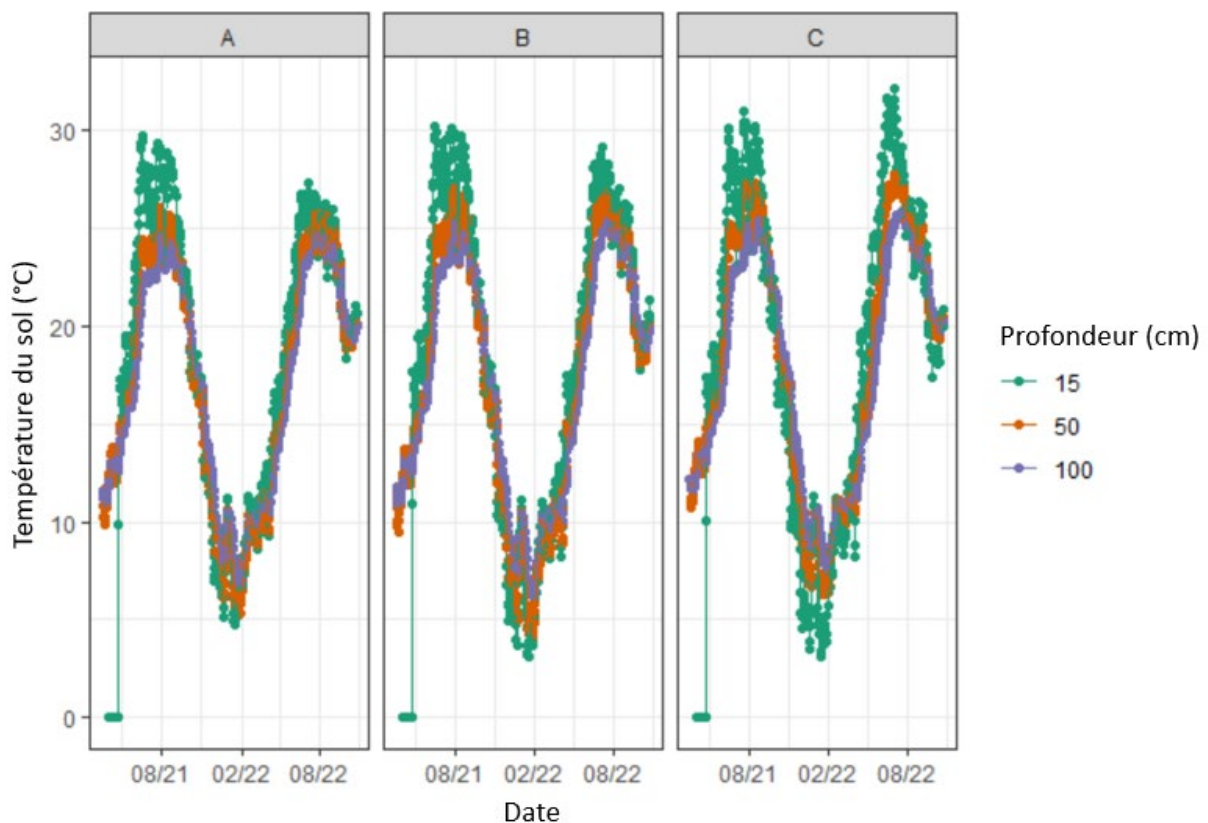


Fig. VI-5 Température du sol selon la profondeur (15, 50 et 100 cm) et la position (dans la bande enherbée, dans la culture à 3.5 m de la ligne d'arbres et dans le milieu de l'inter-rang) entre Avril 2021 et Novembre 2022.

Limite n°4 – Humidité du sol de DIAMS. Les données d'humidité du sol ne sont pas montrées car les résultats sont très variables d'un réplica à l'autre, sûrement à cause de l'hétérogénéité forte du site, en particulier la teneur importante en cailloux. Tout en restant vigilant sur les hypothèses en l'absence de données, nous pouvons toutefois penser que les tendances à l'échelle de la parcelle suivent celles de la température du sol.

Limite n°5 – Effet de l'ombrage des arbres sur DIAMS. Les fosses ont été creusées uniquement du côté Sud de la ligne d'arbres, afin d'être comparées entre elles sans apporter de biais supplémentaires. Ainsi, l'ombre des couronnes d'arbres n'atteint pas la culture avoisinant la bande enherbée (J. Ngao, communication personnelle). La seule explication de l'impact négatif de la ligne d'arbres sur le système racinaire du blé proche par rapport au blé loin de la ligne d'arbre est la moindre disponibilité en azote minéral dans le sol. Doubler l'échantillonnage avec des fosses du côté Nord de la ligne d'arbres aurait permis d'évaluer le rôle de l'ombre sur le développement des biomasses aériennes et souterraines.

Dans cette thèse, les systèmes racinaires des herbacées de la bande enherbée de DIAMS n'ont pas été comparés avec ceux de prairies sans arbres. L'effet des conditions environnementales induites par les arbres sur leur développement n'a pas pu être étudié. Leur caractérisation permet toutefois d'évaluer l'hétérogénéité en termes de biomasse et traits racinaires qu'elles apportent par leur présence dans un champ cultivé, en la comparant avec celle des racines des cultures annuelles. En particulier, la biomasse des racines de la bande enherbée de DIAMS n'était pas significativement plus élevée que celle du blé de l'inter-rang, cependant une tortuosité ou un taux de ramification relativement important a pu être observé. De plus, les racines des herbacées n'ont pas été observées dans la zone sous la culture après 3 ans d'agroforesterie. Ce sera probablement le cas dans les prochaines années (Limite n°1), comme dans l'étude de Battie-Laclau et al. (2020) avec des plantations âgées de 5 et 11 ans. D'autant plus que la corrélation entre la biomasse racinaire et la teneur en azote minéral du sol (*i.e.* la sensibilité aux variations verticales de disponibilité en nutriments) est assez forte (Article 2), et que la teneur en azote est probablement amenée à augmenter en surface et en profondeur du fait de la fixation symbiotique d'azote au niveau de la rhizosphère de *R. pseudoacacia* (Rosenstock et al. 2014; Munroe and Isaac 2014; Paula et al. 2015).

Question 2 – Quelles sont les cinétiques de décomposition des racines dans les systèmes agroforestiers et quelles conséquences sur l'activité microbienne et le carbone de la matière organique des sols ?

2. Devenirs et impacts du carbone dérivé des litières racinaires dans les systèmes agroforestiers

2.1. Cinétiques de décomposition des litières racinaires

Comme supposé, les scanners enfouis dans le sol représentent un système d'imagerie *in situ* permettant d'appréhender la décomposition racinaire sans remaniement du sol, sans manipulation des racines et incluant tous les organismes du sol atteignant la rhizosphère. Cette méthode a permis de détailler en deux dimensions la décomposition (longueur et diamètre) alors que les *litterbags* ne permettent que le suivi de la perte de masse. Un résultat majeur de cette thèse, basé sur l'observation *in situ* de la décomposition des racines d'orge, propose de nuancer la vision traditionnelle selon laquelle la récolte est responsable de la mortalité des racines des cultures, marquant le point de départ de la décomposition des litières racinaires. Nous avons montré que les détériorations des tissus des racines par les organismes du sol (collemboles, larves, microorganismes...) commencent très tôt dans les stades de développement, et non à la date de la récolte. Cette production de nécromasse pourrait augmenter le *turnover* racinaire.

En associant les informations de la littérature avec les observations *in situ* réalisées dans cette thèse sur les scanners, je propose d'identifier deux phases de la décomposition des litières racinaires qui se suivent dans le temps (Fig. VI-6). Dans les deux phases, les acteurs de la décomposition des litières racinaires sont les organismes du sol. Plus précisément, les microorganismes consomment la matière organique disponible en maintenant leur stœchiométrie (Zechmeister-Boltenstern et al. 2015; Bertrand et al. 2019). La méso- et macrofaune du sol participe aussi à la décomposition en fragmentant et ingérant la matière organique (Limite n°6) (Johnson et al. 2016; Sauvadet et al. 2017). Le carbone décomposé est soit restitué sous forme minérale par la respiration hétérotrophe, soit immobilisé par les organismes du sol. Le carbone non décomposé est sous forme particulaire. Il s'agit principalement du cylindre central, bien visible sur les images des scanners enfouis à DIAMS (Article 4).

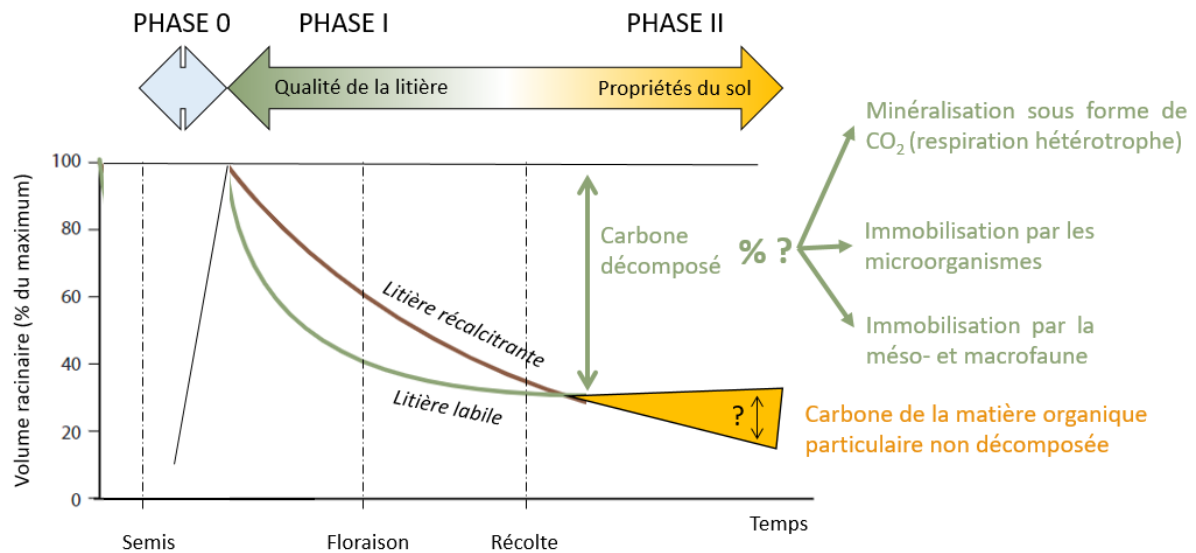


Fig. VI-6 Modèle conceptuel de la décomposition des racines d'espèces cultivées et succession des facteurs impactant la décomposition au cours du temps (figure modifiée d'après Cotrufo et al. (2013)). La phase 0 est une phase de croissance (longueur) et décomposition racinaire (longueur et diamètre) simultanées. Les phases I et II sont des phases de décomposition qui se succèdent dans le temps.

Limite n°6. La méthode d'analyse de la décomposition racinaire par imagerie permet de préciser la cinétique de la perte en longueur et en diamètre racinaire *in situ*. Cependant, elle ne permet pas d'identifier la part du volume racinaire prélevé par les différentes espèces ou communautés. Même si la perte de longueur racinaire peut être causée par la macrofaune, elle pourrait peut-être être causée par les microorganismes après une attaque (piqûre) de la mésofaune (Fig. VI-7). Des études plus précises et spécifiques sont requises pour vérifier ce type d'hypothèses.



Fig. VI-7 Attaque d'une racine vivante d'orge par une collembole (classée dans la mésofaune), image obtenue par un scanner enfoui dans le sol de DIAMS.

On ne peut pas vraiment identifier la date à partir de laquelle la phase I se termine et la phase II commence puisqu'il s'agit de mécanismes progressifs dont l'importance varie au cours du temps. La phase I commence dès l'apparition de la racine et intervient sur le court terme (2-3 mois). La phase II de la décomposition intervient sur le long terme (un an pour les racines fines sur DIAMS, Article 4). Surtout, les processus de stabilisation du carbone dans le sol, comme décrit par Cotrufo et al. (2015), seraient différents entre les deux phases (Limite n°7).

Limite n°7 – Stabilisation du carbone dans le sol après immobilisation par les organismes du sol.

Le suivi de la décomposition racinaire avec les *litterbags* et les scanners sur le court terme ne permet pas de suivre la stabilisation du carbone dérivé des litières racinaires au cours de la décomposition. Le carbone transformé au cours de la phase I est surtout celui des composés labiles. On peut faire l'hypothèse qu'il participe à la stabilisation du carbone dans la fraction MAOM par *entombing effect* (Cotrufo et al. 2013; Liang et al. 2017; Liang 2020). A l'inverse, le carbone non décomposé au cours de la phase II contribuerait à la stabilisation du carbone dans la fraction particulaire (Lavallee et al. 2020). L'utilisation de traceurs isotopiques *in situ* et des expérimentations de fractionnements de la matière organique du sol, éventuellement couplée à des méthodes d'imagerie à échelle nanométrique, permettront de répondre à ces hypothèses sur le long terme.

Sur l'axe vertical du profil de sol, les facteurs de la décomposition (qualité racinaire, type de sol, conditions pédoclimatiques...) peuvent varier fortement. Le facteur profondeur croise donc lui-même différents facteurs de la décomposition et peut intervenir sur différentes temporalités.

2.2. Phase I de la décomposition des litières racinaires

Les expérimentations menées pour cette thèse confirment que la décomposition sur le court terme dépend principalement de la qualité chimique de la racine. Dès les premières semaines, la vitesse de décomposition est plus lente pour les racines dont le diamètre est inférieur à 0.3 mm (racines d'absorption) que pour les racines > 0.3 mm (racines de transport) (Article 4 ; Han et al. 2019). Cette différence pourrait s'expliquer par une plus importante concentration en composés récalcitrants dans les racines d'absorption (Fan and Guo 2010; Lin and Zeng 2017). Par exemple les phénols, composés cycliques récalcitrants, seraient en concentration plus importante dans les racines d'absorption par rapport à celles de transport, du fait de leur implication dans la libérations d'exsudats racinaires (acquisition des nutriments) ou encore dans la conductivité hydraulique (efficacité d'absorption de l'eau du sol) (Wang et al. 2015). De plus, en comparant les racines de différentes espèces dans les *litterbags* au Sénégal, on confirme que les racines fines de *F. albida*, plus riches en lignine (51.9 ± 4.1 %) se décomposent plus lentement sur les 1.5 premiers mois de décomposition (coefficient k_1 , Article 3) que les racines des cultures annuelles (seulement 20.8 ± 2.1 % de lignine dans les racines de mil). Sur DIAMS, la tendance à teneur en lignine plus importante des racines des herbacées de la bande enherbée par rapport au blé (Article 2) suggère que leur litière est plus récalcitrante et donc leur phase I plus lente que celles des racines des cultures annuelles. Même si les racines des espèces pérennes comportent moins de fraction labile que les racines des cultures annuelles, elles sont présentes toute l'année dans le sol. Elles pourraient participer à justifier les effets positifs de la bande enherbée sur les propriétés du sol comme observé dans des parcelles agroforestières matures (Guillot 2018; D'Hervilly 2021). L'hétérogénéité des qualités racinaires présentes dans les systèmes agroforestiers peut impacter à long terme la stabilisation du carbone dans le sol (Fig. Bilan 1 et 2).

Lorsque le diamètre racinaire diminue avec la profondeur, comme c'est le cas du mil cartographié en 2020 (Article 1), la décomposition racinaire pourrait diminuer avec la profondeur sur la phase I. L'expérimentation des *litterbags* sur *Faidherbia-Flux* (Article 3) n'a pas pu vérifier cette hypothèse puisque des pools de litières racinaires ont été suivis sans distinction des diamètres. Une analyse sur des scanners enfouis dans le sol permettrait d'y répondre. Malgré tout, la décomposition racinaire était quand même plus lente entre 40 et 180 cm qu'à 20 cm de profondeur sur les 1.5 premiers mois. En phase I, la variabilité des conditions pédoclimatiques le long du profil vertical peut donc également intervenir sur l'activité des organismes décomposeurs. La comparaison de ces observations avec la littérature n'est pas évidente puisque les expérimentations destinées à comparer la décomposition racinaire selon la profondeur calculent habituellement un coefficient de décomposition sur une régression unique exponentielle décroissante, ne permettant pas de distinguer la vitesse de décomposition de la phase I de celle de la phase II (Gill and Burke 2002; Pries et al. 2018; Han et al. 2019). Le facteur profondeur n'intervient pas seulement sur la cinétique de décomposition mais également sur la stabilité du carbone décomposé, avec la variabilité des propriétés du sol le long du profil vertical.

En fonction des conditions dans le sol (pédoclimat, structure et nature du sol, communautés microbiennes, disponibilité en nutriments et stœchiométries), la décomposition des parties labiles des litières racinaires au cours de la phase I peut induire le phénomène de *priming effect* sur le carbone endogène au sol. Nos résultats sur DIAMS (Article 2) suggèrent que dans les horizons profonds (50-100 cm), l'augmentation de la biomasse racinaire provoquerait une diminution des stocks de carbone du sol (Fig. III-14e). Ces résultats suggèrent un *priming effect* important en profondeur lié à l'entrée de litière racinaire (C/N élevé, *N-mining*). Finalement, les relations entre variables stables (stocks de carbone) et variables dynamiques (biomasses racinaires) doivent être interprétées avec précaution. En effet, les incubations de sols menées dans l'Article 5 (Limite n°8 et Limite n°9) concluent que malgré la co-limitation en carbone et azote dans les sols profonds (50-100 cm), le *priming effect* engendré par l'apport de carbone est moins important que dans les sols de surface (0-20 cm). En profondeur, le manque d'azote permet donc de limiter le *priming effect* plutôt que de le favoriser. On confirme ainsi l'importance de la disponibilité en nutriments sur l'activité microbienne (Abiven et al. 2005); différentes réponses microbiennes aux entrées de matière organique fraîche sont possibles dans un même profil de sol.

Limite n°8 – Complexité des litières racinaires. L'expérience menée avec les incubations de sols de DIAMS en conditions contrôlées a permis de mesurer un potentiel d'émissions de carbone pour comprendre les mécanismes microbiens face aux disponibilités en nutriments dans le sol. Cependant, le glucose ne représente pas la complexité des litières racinaires, ni même celle des exsudats. L'apport de litières racinaires marquées avec des qualités contrastées (mycorhization, traits fonctionnels *etc*) permettrait d'intégrer l'effet de la qualité des racines dans les conclusions stœchiométriques. Cependant, les litières racinaires marquées créées dans des solutions nutritives sont très éloignées des conditions naturelles au champ et n'ont pas la même structure (Gilman and Beeson 1996).

Limite n°9 – Quantités de carbone apporté. Dans l'Article 5, les quantités de carbone apportées dans les différents horizons de sol de DIAMS sont très faibles par rapport à la bibliographie (Fig. VI-8). Les trois seuls articles cités par la revue de Blagodatskaya and Kuzyakov (2008) apportant des quantités de carbone plus faible que notre expérimentation (Article 5) considèrent que ce sont des 'traces de substrats' (De Nobili et al. 2001; Mondini et al. 2006; Blagodatskaya et al. 2007). Mais pourtant, les quantités apportées dans nos incubations sont équivalentes aux entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires d'orge à 0-20 cm de profondeur (Annexe A) et ne peuvent pas être considérés seulement comme des traces. Dans notre étude, la *carbon use efficiency* mesurée au bout de 1 jour d'incubation était très élevée mais peu d'informations sont disponibles dans la littérature concernant l'impact d'aussi faibles quantités de carbone sur la *carbon use efficiency*. Des études avec des faibles apports de carbone et/ou nutriments sur différents types de sol sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes de réponses à ces quantités, plus cohérentes au regard des entrées annuelles par les litières racinaires.

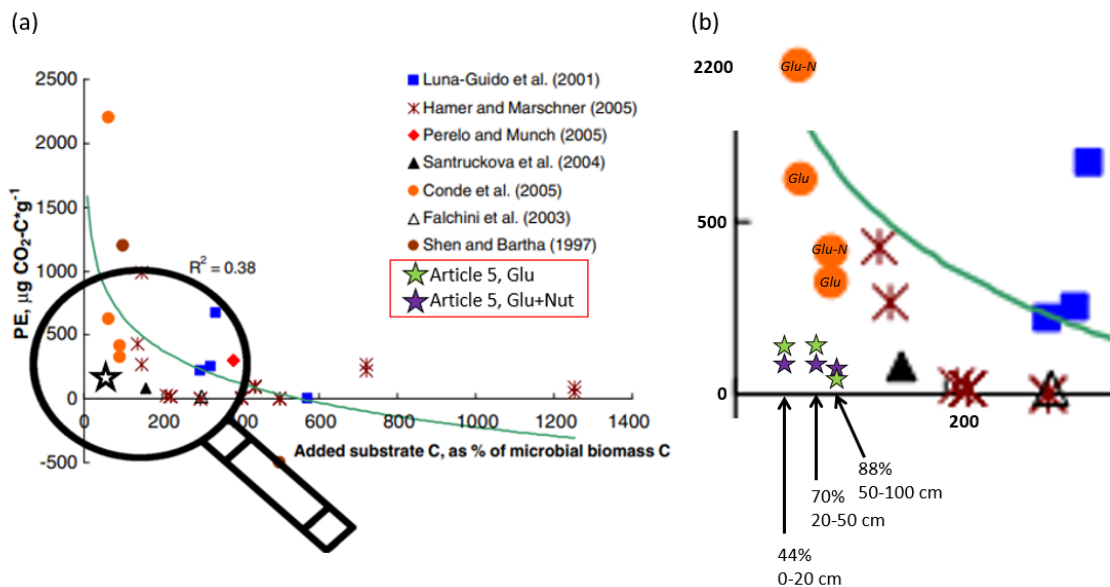


Fig. 8 Carbone émis par PE en fonction du carbone ajouté en % de la biomasse microbienne. Figure modifiée de la revue de littérature de Blagodatskaya and Kuzyakov (2008). (b) est un zoom de (a). Les étoiles vertes et violettes (légende dans l'encadré rouge (a) et situées pour chaque horizon de sol étudié (b)) correspondent aux résultats de PE mesurés dans l'Article 5 de cette thèse, avec apport de glucose seul et avec apport simultanée de glucose et nutriments, respectivement. L'étude de Conde et al. (2005) a également comparé l'apport de glucose seul vs. l'apport de glucose et nutriments dans 2 sols : la légende est directement précisée dans les cercles orange (b).

Au vu de nos observations sur le système agroforestier mature sénégalais (Article 1), nos hypothèses sur le site français (Limite n°1) et d'études précédentes (Cardinael et al. 2015), les racines d'arbres en systèmes agroforestiers sont développées en profondeur. Mais ces horizons ne sont pas ou peu atteints par les racines des cultures qui ne pourront donc pas bénéficier de cette source azotée. De plus, sur certains sols comme celui de DIAMS, la disponibilité en azote en profondeur pourrait même engendrer un *priming effect* plus important qu'en conditions limitantes de nutriments. Le choix des arbres fixateurs d'azote dans les systèmes agroforestiers peut donc être questionné (Limite n°10), d'autant plus lorsque

les campagnes de fertilisations chimiques sont menées, comme dans le dispositif DIAMS, limitant peut-être la fixation symbiotique du N (Pampana et al. 2018).

Limite n°10 – Choix des arbres fixateurs d’azote pour les systèmes agroforestiers. Les études futures sur le système racinaire de *R. pseudoacacia* permettront de savoir si les racines d’arbres restent sous la bande enherbée ou si elles colonisent l’inter-rang (dans ou sous la zone occupée par les racines des cultures). De plus, les cinétiques d’absorption vs. libération de nutriments au cours de la décomposition des racines d’espèces fixatrices d’azote, notamment en profondeur doivent être précisées.

Non seulement les racines d’arbres mais aussi celles des légumineuses cultivées peuvent représenter un apport d’azote à prendre en compte dans les questions de *priming effect*. Sur Faidherbia-Flux, la cartographie de l’arachide, espèce fixatrice d’azote (nodules identifiés sur Fig. VI-3), n’a pas montré de différence de distribution de la biomasse racinaire par rapport au mil cartographié l’année précédente. A l’inverse sur DIAMS, les échantillonnages racinaires sur les 10 premiers cm, dans le cadre de l’Article 6, montrent une biomasse racinaire 2 fois plus importante pour le pois (espèce fixatrice d’azote) que pour l’orge, suggérant que l’architecture en pivot du système racinaire du pois privilégie une biomasse racinaire en surface alors que l’orge explore plus en profondeur. C’est donc en surface principalement que se font les entrées d’azote par les racines fines de pois, ce qui limite la déstabilisation du carbone du sol par *priming effect*, vu le rôle positif de l’azote sur la *carbon use efficiency* des microorganismes (Article 5). Encore faut-il que cet azote ne soit pas lessivé par les pluies intenses (au mois d’octobre en zone Méditerranéenne et à partir de juin jusqu’en septembre au Sénégal) suivant la culture des légumineuses pour rester disponible dans le sol pour la céréale suivante (Limite n°17).

2.3. Phase II de la décomposition des litières racinaires

Sur le long terme, aucune différence n’a été observée entre les coefficients de décomposition k_2 des arbres et des cultures. En effet, la qualité racinaire n’intervient que très peu dans la décomposition sur le long terme. Mais dans ce cas, on attend un effet des propriétés du sol sur la décomposition racinaire sur le long terme (Coppens et al. 2005; Fanin et al. 2020). Cela n’a pas vraiment pu être vérifié au sein de chaque site d’étude. Sur DIAMS, l’effet de la distance à l’arbre n’a pas été étudié du fait du manque de différenciation des propriétés du sol en 2020 (Article 4). Mais finalement, la teneur en lignine plus importante sur les racines du blé avoisinant la bande enherbée par rapport à celles plus éloignées dans l’inter-rang cultivé, pourrait peut-être témoigner d’une décomposition plus avancée des racines proches de la ligne d’arbres (microclimat, activité microbienne et faunique ?) que celles éloignées. Sur ce même site, l’effet de la profondeur sur la décomposition des racines d’orge n’a été vérifié que sur les racines dont le diamètre initial était inférieur à 0.3 mm (racines d’absorption) et pas sur les racines plus épaisses (plutôt spécialisées dans le transport). Peut-être que les micro-agrégats, sur lesquels la matière organique particulière est adsorbée (occlusion, Cotrufo and Lavelle 2022), sont plus stables dans les horizons

profonds qu'en surface, et que les mécanismes de stabilisation diffèrent selon la catégorie de diamètre racinaire. Sur Faidherbia-Flux, le coefficient de décomposition k_2 (phase II) n'était pas significativement impacté par la profondeur ni la distance à l'arbre, malgré les teneurs en nutriments plus faibles dans les horizons profonds et en position loin comparativement à la surface du sol et sous l'arbre respectivement (Articles 1 et 3), ainsi qu'une possible plus grande activité microbienne en surface et sous l'arbre qu'en profondeur et loin de celui-ci (Chapuis-Lardy et al. 2019). L'absence d'implication des facteurs climatiques, comme l'humidité du sol plus importante sous l'arbre que loin de lui et l'atténuation des variations de température et humidité en profondeur par rapport à la surface du sol, peut s'expliquer par des conditions globalement sèches entre février (saison sèche avancée) et les premières pluies de juin-juillet, limitant l'activité des organismes décomposeurs. Ainsi, au sein même d'un site, les variations des propriétés du sol (physiques, chimiques, microbiologiques) ne sont pas toujours assez marquées pour induire une différence significative de la décomposition des litières racinaires. D'ailleurs, les études de Coppens et al. (2005) et Fanin et al. (2020) comparent des sols très différents (prairie, forêts, cultures) mais ce n'est pas l'approche choisie dans cette thèse.

Comme pour les racines fines, le carbone des racines grosses (diamètre > 10 mm) entre dans le sol lors de la décomposition, même si elles sont relativement stables, leur *turnover* n'est pas nul. Cet aspect n'a pas été traité dans le travail de cette thèse, mais des reliquats de racines de diamètres > 10 mm, datant certainement de plusieurs décennies, ont été trouvés dans certaines fosses sur Faidherbia-Flux (Fig. VI-9). De plus, seule l'écorce de ces racines était conservée, d'une couleur noire donc riche en carbone. L'intérieur, anciennement composé des vaisseaux conducteurs des racines, était remplacé par du sol, signe du passage des organismes du sol (termites ?).



Fig. VI-9 Reliquats d'écorce de racines trouvés à différentes profondeurs entre 0 et 150 cm sur Faidherbia-Flux. Source : Lorène Siegwart (Octobre 2021).

Question 3 (initialement posée) – Quelle est l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la contribution racinaire à la respiration des sols agroforestiers par rapport aux cultures pures (sans arbres) et aux plantations d'arbres conduites en conditions équivalentes ?

Redéfinition de l'objectif de l'étude

Vu l'hétérogénéité spatiale des biomasses et traits racinaires observée, et la mise en place de l'hétérogénéité des propriétés du sol et des conditions pédoclimatiques sur DIAMS depuis la plantation des arbres, l'objectif d'évaluer la part de la contribution racinaire à la respiration du sol en fonction de la position dans le système agroforestier n'a pas pu être atteint (Limite n°11). Nous avons donc réorienté notre question de recherche.

Limite n°11 – Evaluation de la contribution de la respiration racinaire à la respiration du sol.

Parmi les méthodes citées dans la synthèse bibliographique, le choix d'établir une relation entre respiration du sol mesurée à la surface et biomasse racinaire, pour déterminer la respiration hétérotrophe des microorganismes à biomasse racinaire nulle (Wanga et al. 2005) n'a pas fonctionné. En effet, malgré la significativité (p -value < 0.05), les relations établies présentaient un mauvais coefficient de corrélation (Article 6). Et pourtant, les autres méthodes existantes dans la bibliographie n'auraient pas pu être aisément mises en place sur DIAMS. (i) Le sol caillouteux de DIAMS est un frein pour exclure les racines d'une zone et mesurer la respiration à la surface du sol (Lee et al. 2003; Heinemeyer et al. 2007). (ii) L'utilisation d'isotopes stables (Baggs 2006) aurait comptabilisé comme respiration autotrophe des molécules marquées exsudées par les racines pourtant décomposées par les organismes du sol et donc participant à la respiration hétérotrophe.

Question 3 (reformulée) – Quelle est l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la respiration du sol (et non de la contribution des racines à cette respiration) dans les parcelles agroforestières de DIAMS en comparaison avec les cultures pures et les plantations d'arbres ?

Dans cette partie de la discussion, on ne peut donc pas répondre aux hypothèses énoncées dans le Chapitre 2 – Stratégie de recherche. On tentera plutôt de répondre à l'objectif général de la thèse avec une vision globale, en reprenant le bilan carbone du sol de chacun des deux sites d'étude à partir de toutes les données mesurées dans la thèse et d'en déduire le rôle des racines dans les sorties et dans les entrées de carbone le long du profil vertical de sol.

3. Rôle des racines dans le bilan carbone des sols des systèmes agroforestiers

3.1. Stocks de carbone des sols des systèmes agroforestiers étudiés

De manière générale dans les parc agroforestiers en zone sub-Sahélienne, la littérature fait référence à une diminution des stocks de carbone du sol (Elberling et al. 2003) malgré l'effet positif joué par les arbres (Rahimi et al. 2021). Sur nos études réalisées sur le site Faidherbia-Flux, les différences de stocks de carbone du sol observées entre les deux positions (sous la couronne de l'arbre et à +30 m du tronc) ne sont pas significatives. Le manque de significativité pourrait venir du manque de réplicas (3 (Article 1) et 1 (Article 3) seulement), mais la répétabilité des résultats sur les deux campagnes (2019 et 2020) écarte cette possibilité. Ce serait plutôt l'absence de différence de biomasse racinaire des cultures selon la position et l'hétérogénéité spatiale des pratiques au sein de ce site (travail du sol non mécanisé, présence occasionnelle de troupeaux de moutons et chèvres d'élevage, association de plusieurs cultures (lignes de plants d'hibiscus aléatoirement répartis dans la culture de l'arachide, remarqués lors de la campagne de 2021)) qui pourraient en fait effacer les différences de stocks de carbone du sol entre les positions loin et sous l'arbre.

A l'inverse, le dispositif français est récent, puisque les arbres ont été plantés en 2017, il est donc en période de transition, en particulier avec la mise en place d'un gradient des propriétés du sol (Guillot 2018; D'Hervilly 2021). Concernant les stocks de carbone du sol de DIAMS, 3 années de pratiques agroforestières n'ont pas suffi à induire une hétérogénéité spatiale significative des stocks de carbone, sur un gradient horizontal perpendiculaire à la ligne d'arbres. Déjà, la comparaison des mesures de stocks de carbone du sol de l'Article 2 (Mai 2020, $7.7 \pm 1.9 \text{ kgC m}^{-3}$ dans la bande enherbée par exemple) et l'Article 6 (Octobre 2020, $8.8 \pm 0.8 \text{ kgC m}^{-3}$) vérifie bien des ordres de grandeurs équivalents mais légèrement plus faibles en Mai qu'en Octobre du fait de la prise en compte de sol un peu plus profonds (20 vs. 10 premiers cm, respectivement). Ensuite, les stocks de carbone organique du sol n'étaient pas significativement différents entre la plantation et l'inter-rang cultivé agroforestier en Octobre 2020 et n'ont pas évolué significativement sur la durée de la thèse (Annexe D). Des études supplémentaires pourraient déterminer si c'est le jeune âge de la parcelle ou l'hétérogénéité spatiale initiale de DIAMS (Bout 2019) qui freine l'installation du gradient des propriétés du sol observé sur des systèmes similaires mais plus anciens (Guillot 2018; D'Hervilly 2021).

3.2. Contribution des racines dans les entrées de carbone dans les sols agroforestiers

Le travail des deux premiers articles de cette thèse a permis de quantifier les stocks de carbone dans les racines fines à date de la floraison dans l'objectif d'évaluer les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires en fonction de la profondeur et de la position dans la parcelle agroforestière. La

quantification des entrées de carbone dérivé des litières racinaires est valable à la date d'échantillonnage (2020-2021 au Sénégal et 2020 en France). Le dispositif sénégalais est considéré comme mature du fait de l'âge avancé des arbres (Diatta 2021) et la quantification des entrées de carbone par les cultures et les arbres sur la rotation complète sur 2 ans et leur contribution annuelle aux stocks de carbone du sol peuvent être considérées comme répétibles pour tous les cycles de culture. Sur DIAMS, la transition en cours concerne non seulement les propriétés du sol, mais aussi le développement des systèmes racinaires des espèces pérennes (herbacées et arbres). Ainsi, les entrées de carbone dans le sol sont amenées à évoluer dans les prochaines années, avec l'accentuation de l'hétérogénéité au sein du système agroforestier. La modélisation peut être un moyen de prédire l'évolution des stocks de carbone des sols agroforestiers et de la contribution des racines (Limite n°12).

Limite n°12 – Modélisation de la contribution des racines aux entrées de carbone dans le sol. La modélisation pourrait permettre de prévoir l'évolution des contributions des racines aux stocks de carbone dans les sols en fonction de la profondeur et de la distance à l'arbre sur DIAMS. Des efforts de séparation des différents types de matière organique entrantes dans le sol sont requis pour prédire les dynamiques de carbone (Abiven et al. 2005). Cependant, les modèles de décomposition de la matière organique existants sont tous basés sur des décompositions de litières aériennes, et très peu sur les racines, donc encore moins intégrant la dimension verticale des différents horizons de sol (Loum et al. 2014). La calibration du modèle RothC, dont le script est disponible sur R dans le *package* 'SoilR', a été tentée en collaboration avec K. Van Den Meersche ; le travail colossal demandé par l'intégration d'horizons profonds dans un modèle qui n'est pas prévu pour, n'a pas pu aboutir dans le cadre de cette thèse. Les difficultés rencontrées concernent notamment le modèle hydrique des différents horizons de sol et les propriétés encore en évolution du système agroforestier récent.

Tout d'abord, les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des cultures ont été estimées sur les 2 sites (Limite n°13). Sur DIAMS, elles représentent 20% des résidus de cultures (le reste correspond aux entrées de carbone par enfouissement des résidus aériens) et sur Faidherbia-Flux, elles représentent 100% des entrées de carbone par les cultures (exportation des résidus aériens pour l'élevage).

Limite n°13 – Calcul des entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des cultures annuelles. Pour les quantifier, nous faisons l'hypothèse que la date de floraison correspond au pic d'activité des plantes et donc avec le maximum de biomasse racinaire. Nos échantillonnages ont donc été réalisés à ce stade de développement. Cependant, l'observation *in situ* de la décomposition racinaire sur les scanners enfouis à DIAMS (Article 4) a montré que la perte en longueur et en diamètre débute dès le mois de mars. Ainsi, à la date de floraison de la culture, 50% du volume racinaire maximum a déjà disparu. D'ailleurs, ceci explique l'hétérogénéité de l'état de décomposition observé sur les racines échantillonnées en mai 2020 et dont l'anatomie a été analysée sur des coupes transversales (Fig. VI-10,

Article 2). Les prochaines études prélevant des racines au champs devront anticiper l'état de décomposition des racines à la date d'échantillonnage. Par conséquent, les quantités de carbone dérivé des litières racinaires entrant annuellement dans le sol (Articles 1 et 2) sont certainement sous-estimées de moitié lorsque l'échantillonnage est réalisé à la floraison. Dans la suite de ce chapitre et dans les Fig. Bilan 1 et Fig. Bilan 2, on estime à nouveau les données de carbone entrant dans le sol en les multipliant par 2 nos quantifications réalisées à la date de la floraison. Nous n'appliquerons cependant pas ce coefficient aux espèces pérennes pour lesquelles nous n'avons pas fait de mesures *in situ* (scanners). L'expérience menée sur les scanners de DIAMS devrait être répétée dans la bande enherbée pour préciser la dynamique de *turnover* et de décomposition pour les espèces pérennes (Limite n°14).

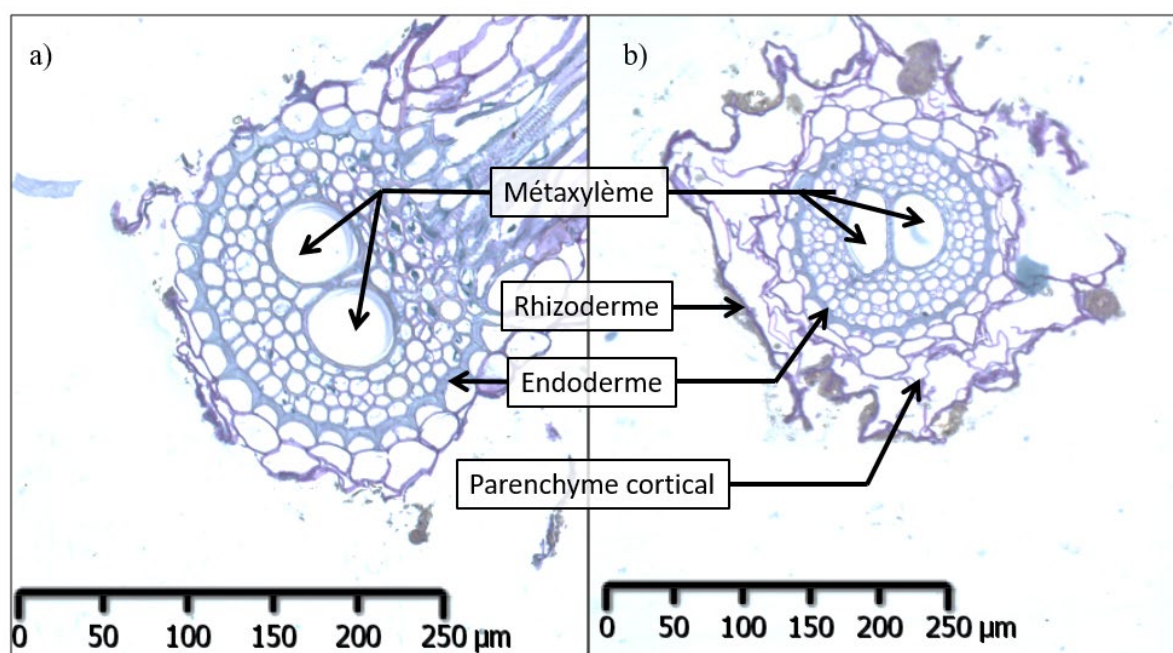


Fig. VI-10 Coupes transversales de racines de blé échantillonnées en mai 2020 à 20 cm de profondeur et différence d'avancement de la décomposition : décomposition avancée avec l'absence du cortex (a) et racine avec un cortex encore presque intact (b).

Dans le premier horizon de sol, les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des cultures ont été estimées à $0.202 \text{ gC dm}^{-3} \text{ an}^{-1}$ et $0.160 \text{ gC dm}^{-3} \text{ an}^{-1}$ dans la culture sous et loin de l'arbre respectivement dans le parc Faidherbia-Flux (Fig. Bilan 2), contre seulement $0.090 \text{ gC dm}^{-3} \text{ an}^{-1}$ et $0.038 \text{ gC dm}^{-3} \text{ an}^{-1}$ dans le milieu de l'inter-rang cultivé et dans la culture avoisinant la bande enherbée respectivement sur DIAMS (Fig. Bilan 1). La différence entre les deux sites s'explique par la densité de biomasse racinaire plus importante au Sénégal, notamment due aux racines de diamètre $> 2\text{mm}$ (pivot de l'arachide par exemple) et de l'horizon considéré moins profond (0-10 au Sénégal contre 0-20 cm en France).

En profondeur, les quantités de racines par unité de volume de sol étaient beaucoup plus minces. Entre 10 et 100 cm de profondeur sur Faidherbia-Flux, les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des cultures varient entre 0.003 et 0.04 gC dm⁻³ an⁻¹ (descendant à 0.001 gC dm⁻³ an⁻¹ dans l'horizon 100-150 cm). Sur DIAMS entre 20 et 100 cm de profondeur les valeurs sont comprises entre 0.02 et 0.04 gC dm⁻³ an⁻¹. Il est vrai que la quantité de carbone dérivé des litières racinaires des cultures calculé dans un volume de sol (gC dm⁻³) chute très rapidement avec la profondeur dès le second horizon (divisé par 2 à 20-50 cm sur DIAMS et divisé jusque par 8 à 10-30 cm sur Faidherbia-Flux). Mais en raisonnant par unité de surface, on trouve que 31.4 et 46.9% des entrées de carbone dérivé des litières racinaires se situent entre 10 et 150 cm de profondeur, sous et loin de l'arbre respectivement, dans le parc Faidherbia-Flux. La différence entre les 2 positions s'explique par le développement des racines moyennes d'arachides en plus grande quantité loin de l'arbre que sous celui-ci. Sur DIAMS, 73.6 et 56.5% des entrées se situent entre 20 et 100 cm de profondeur, proche et loin de la ligne d'arbre respectivement. Donc malgré les faibles quantités de racines en profondeur par unité de volume, notre travail justifie la nécessité de prendre en compte les horizons profonds dans l'évaluation de la contribution des litières racinaires aux entrées de carbone dans le profil de sol, même dans l'étude des cultures et pas seulement des arbres.

Ensuite, les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des arbres, et des herbacées le cas échéant, ont été estimées sur les 2 sites. On a vu que la présence d'espèces pérennes sur les sites agroforestiers apporte de la complexité dans les systèmes racinaires par rapport aux espèces cultivées seules. Même si les calculs sont discutables (Limite n°14), nos quantifications d'entrées de carbone dérivé des litières racinaires des espèces pérennes ont permis d'obtenir un ordre de grandeur manquant dans la littérature et que l'on a pu comparer aux entrées de carbone dans le sol et stocks de carbone dans les biomasses racinaires. Les calculs des entrées de carbone peuvent être fait / ha de la position étudiée (par exemple / ha de bande enherbée) ou ramenés / ha de la parcelle agroforestière, en appliquant une surface occupée par chaque position. Ces valeurs sont rapportées en rouge et noir respectivement dans la Fig. Bilan 1.

Limite n°14 – Calcul des entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des espèces pérennes. Pour quantifier les entrées annuelles de carbone dérivé des litières racinaires des espèces pérennes (bande enherbée sur DIAMS et *F. albida* sur Faidherbia-Flux), nous avons appliqué un coefficient de *turnover* trouvé dans la littérature et que nous n'avons pu vérifier. Nous avons ainsi considéré que 53% des racines des herbacées se renouvelaient et donc entrent dans le sol chaque année (Gill and Jackson 2000) et que ce chiffre s'élève à 56% pour les racines fines de *F. albida* (Jha and Prasad Mohapatra 2010). En utilisant un coefficient de *turnover* identique sur toutes les profondeurs étudiées, nous avons peut-être surestimé les entrées de carbone en profondeur. La littérature manque de références de *turnover*, surtout en profondeur, et plutôt que d'utiliser des moyennes aussi générales, il aurait été plus précis de mesurer des coefficients de *turnover* sur les scanners enfouis à différentes

profondeurs et positions sur nos deux sites d'études. Les futures analyses de la dynamique de croissance et mortalité racinaires viendront préciser très prochainement ces valeurs de *turnover*.

De plus, nos observations sur les scanners (dans l'étude de la décomposition des racines d'orge) montrent que les racines fines sont déjà source de C, *i.e.* la décomposition ayant déjà commencé avec la perte de leur cortex, alors qu'il est probable qu'elles continuent d'assurer leurs fonctions de conduction de l'eau et des nutriments du sol vers les parties aériennes. On peut alors s'interroger si les valeurs de *turnover* trouvées dans la bibliographie prennent en compte ou non ce phénomène.

Sur DIAMS (Fig. Bilan 1), les entrées de carbone dérivé des litières racinaires sont réduites dans la bande enherbée (biomasse racinaire 1.4 fois plus importante mais *turnover* racinaire faible par rapport à la mortalité annuelle des racines des cultures) et dans la culture avoisinant la bande enherbée (biomasse racinaire divisée par 3) par rapport à la culture éloignée (0.038, 0.038 et 0.090 gC dm⁻³ an⁻¹ sur 0-20 cm, respectivement). Ces pertes racinaires sur le premier horizon (-0.02 tC ha⁻¹ an⁻¹) sont largement compensées par l'apport aérien des herbacées avec le renouvellement des parties aériennes (6.64 ± 1.51 tC ha⁻¹ an⁻¹ sur les 2 m de large de la bande enherbée représentant 11.76% de la parcelle (Article 6), soit +0.78 tC ha⁻¹ an⁻¹ ramené à l'échelle de la parcelle) et la chute des feuilles mortes des *R. pseudoacacia* aléatoire dans la parcelle (+0.09 tC ha⁻¹ an⁻¹; Ngao et al. 2022). Alors que les racines d'arbres ne représentent pas une entrée significative de carbone après 3 ans d'agroforesterie, la biomasse aérienne contenue dans le bois des jeunes arbres représente 0.68 tC ha⁻¹ en 2021 (Ngao et al. 2022). Avec une croissance de biomasse aérienne de 0.30 tC ha⁻¹ an⁻¹, la contribution aérienne et souterraine de l'arbre aux entrées de carbone dans le sol est supposée augmenter rapidement dans les prochaines années. Ces quantifications apportent des précisions quant à la répartition des entrées de carbone proche et loin de la bande enherbée, par rapport à celles réalisées par Cardinael et al. (2018). Les 2 études sont difficilement comparables étant donnée l'âge avancé du site Restinclières par rapport au dispositif DIAMS.

Sur Faidherbia-Flux (Fig. Bilan 2), les entrées de carbone par le *turnover* des racines fines des arbres sont faibles par unité de volume (maximum évalué à 0.001 gC dm⁻³ an⁻¹ à 100-150 cm de profondeur) et représentent seulement environ 3.4% des entrées de C dérivé des litières des racines fines (arbre + culture) sur les 150 premiers cm de sol. Mais la mise en évidence de racines fines de *F. albida* en grande quantité au niveau du front de la nappe souterraine (5-6 m, Fig. VI-2) suggère que la part des racines fines de l'arbre serait bien plus importante si l'on considérait le profil entier de sol enraciné. Si on extrapole nos résultats en faisant l'hypothèse que la biomasse de racines fines de l'arbre entre 100 et 150 cm se maintient jusque 600 cm de profondeur, la contribution des racines fines de l'arbre aux entrées de carbone dérivé des litières racinaires (arbre + culture) sur le profil entier enraciné passe à 12 et 17%, respectivement loin et sous l'arbre (0.05 tC ha⁻¹ an⁻¹). En poursuivant la réflexion sur ces extrapolations, sur la totalité des entrées de C dérivé des litières des racines fines de l'arbre (0.04 à 0.06 tC ha⁻¹ an⁻¹),

90% environ se situeraient en dessous de 100 cm de profondeur. Une étude précédente sur le même site d'étude trouvait un stock de C souterrain de l'arbre de 1.5 tC ha^{-1} avec une équation allométrique utilisant la biomasse aérienne mesurée (Dilla et al. 2019) mais une réelle quantification de la biomasse des racines grosses permettrait de vérifier cette évaluation, par exemple avec les méthodes GPR (Ground Penetrating Radar) (Arosio et al. 2020). La biomasse des feuilles tombant au sol est évaluée sur Faidherbia-Flux à $0.17 \text{ t ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ avec des pièges à litières en 2021 (thèse en cours de Khardiatou Sadio) et à $0.22 \text{ t ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ à partir de l'indice de surface foliaire (LAI) mesuré entre 2018 et 2021 (O. Roupsard, communication personnelle)¹. Cela représenterait environ $0.09 \text{ tC ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$, soit le double des racines fines de l'arbre entre 0 et 6 m de profondeur, mais il est difficile de quantifier la part de la litière chutant au sol qui intégrera le pool de matière organique du sol puisqu'une grande partie est dispersée par le vent et le reste est consommé par les animaux de passage, qui peut être restitué au sol après transit dans le système digestif, avec une répartition aléatoire. Enfin, les stocks de C dans la biomasse aérienne de *F. albida* sont estimés à 2.16 tC ha^{-1} (biomasse de 4.49 t ha^{-1}) avec un stockage annuel de $0.084 \text{ tC ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ (Diatta 2021), qui est 3.6 fois plus faible que chez les jeunes *R. pseudoacacia* de DIAMS, du fait de la faible croissance de ces arbres matures et de la faible densité d'arbres à l'hectare sur le parc Faidherbia-Flux.

3.3. Pertes de carbone des sols agroforestiers

Les mesures de respiration du sol réalisées *in situ* sur DIAMS donnent des résultats très élevés (6.7 tC ha^{-1} , Fig. Bilan 1) comparés à d'autres site Méditerranéens ou semi-arides (Tedeschi et al. 2006; Rey et al. 2011; González-Ubierna and Lai 2019). Cependant, nous n'avons aucune indication quant à la profondeur d'où vient le CO_2 émis à la surface du sol (Limite n°15). Une comparaison de la respiration du sol mesurée *in situ* par le LICOR (Article 6) avec la respiration hétérotrophe mesurée dans les incubations de sol (Article 5) a permis de valider les ordres de grandeurs (Annexe E).

Limite n°15 – De quelle profondeur vient le CO_2 émis à la surface du sol ? La mesure de la respiration du sol à la surface a permis d'établir le bilan carbone du sol dans l'Article 6, mais pas de connaître les profondeurs et les proportions correspondantes à chaque horizon du sol du CO_2 mesuré à la surface. Le dégagement de CO_2 à la surface du sol dépend principalement de la respiration du sol (autotrophe + hétérotrophe), la contribution des carbonates (en fonction du pH, précipitation en milieu alcalin et dégagement de CO_2 en milieu acide) et la texture du sol (argile pouvant imperméabiliser et limiter les échanges gazeux). Des mesures de concentration en CO_2 dans le gaz du sol le long du profil de sol (Davidson et al. 2006; Germon 2019) aurait permis de répondre à cette question, avec des calculs de coefficient de diffusion dans le sol.

¹ Données exprimées en tonne de matière sèche par ha et par an.

Pour obtenir des valeurs continues de respiration au cours du temps à partir des mesures ponctuelles (Limite n°16) de flux de CO₂ à la surface du sol du site de DIAMS, la méthode de l'interpolation linéaire a été choisie comme méthode de *Gap filling* dans l'Article 6. Pour vérifier les émissions annuelles ainsi obtenues, une autre méthode de *Gap filling* utilisant la température comme covariable de la respiration du sol, a permis de confirmer les ordres de grandeurs obtenus par l'interpolation linéaire (Annexe F).

Limite n°16 – Impossibilité des mesures continues du CO₂ sur DIAMS. Plutôt que réaliser des campagnes d'acquisition ponctuelles sur les 72 cylindres enfouis à la surface du sol de DIAMS, des mesures permanentes des émissions de gaz à la surface du sol auraient évité un travail chronophage de récolte des données ainsi que de *Gap filling* (Dorich et al. 2020) pour l'estimation des émissions annuelles de chaque traitement (agroforesterie, culture pure et plantation d'arbres). La mise en place d'un dispositif permanent de mesure des gaz à la surface du sol (utilisation d'enceinte et de multiplexer de Licor par exemple) n'est pas possible sur le site de DIAMS car il n'est pas relié au réseau électrique et l'utilisation de panneau solaire n'est pas envisageable par risque de vol ou de vandalisme. L'obligation des mesures ponctuelles associées à une méthode de *Gap filling* était donc incontournable

Sur le site DIAMS, une tentative d'évaluation des émissions de N₂O à la surface du sol visait à avoir un ordre de grandeur de l'émission d'un gaz à effet de serre au pouvoir réchauffant (*global warming potential*) 298 fois plus important que le CO₂ (Huérfano et al. 2015), couplé au cycle du carbone et fortement relié aux pratiques agricoles. Ces mesures sont d'autant plus intéressantes en système agroforestier, où la teneur en azote et l'humidité du sol peuvent être hétérogènes.

A priori, une augmentation des entrées d'azote sur DIAMS (litières des arbres et des herbacées de la bande enherbée riches en azote, fertilisants chimiques) pourrait causer des émissions de N₂O sous réserve qu'il y ait assez d'humidité. Après 4 années d'agroforesterie, l'évaluation des flux de N₂O donne des résultats très faibles (Annexe G), équivalent à 1.8×10^{-2} mgC-CO₂ ha⁻¹ jour⁻¹ (sans différence selon la localisation sur la parcelle). Ces faibles flux pourraient s'expliquer par la présence d'inhibiteur d'uréase amenés avec les engrais, ainsi que par la valeur très faible de la *water field pore space* mesurée à environ 30% (Linn and Doran 1984). On pourrait imaginer un dégagement de N₂O plus tardif, à l'automne, lorsque les pluies sont importantes. Cependant, la diminution très rapide de l'azote minéral dans le sol au cours du temps (Fig. VI-11) dans les jours qui suivent les campagnes de fertilisation du 04/03/2021 et du 24/04/2021 suggère que la teneur en azote dans le sol à l'automne ne sera pas suffisante pour engendrer un dégagement significatif de N₂O. La diminution de l'azote minéral au cours du temps pourrait s'expliquer par une lixiviation importante. Cependant, les transferts verticaux d'éléments sur DIAMS sont peu probables (Annexe H). C'est donc simplement l'utilisation par les racines qui expliquerait la diminution des teneurs en azote dans le sol. Ces hypothèses pourront être vérifiées avec des études supplémentaires et plus centrées sur les dynamiques des nutriments (Limite n°17).

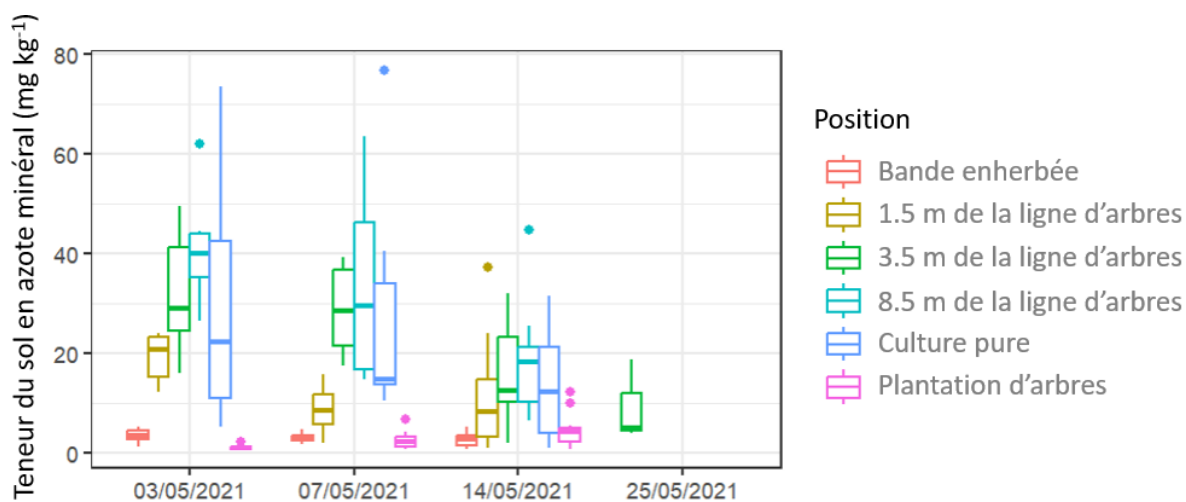


Fig. VI-11 Teneur en azote minéral du sol au cours du temps pour chaque position (dans la bande enherbée, dans la culture à 1.5, 3.5 et 8.5 m de la ligne d'arbres (en agroforesterie), dans la culture pure et dans la plantation d'arbres) sur DIAMS.

Limite n°17. Dans le cadre de cette thèse, les bilans d'azote n'ont pas été réalisés, puisque plusieurs flux annuels non évalués auraient dû être intégrés, comme la lixiviation (transferts verticaux d'azote) et la dénitrification (émissions d'azote sous forme de N₂O). La discussion ne dépasse donc pas certaines hypothèses.

Schéma de synthèse des résultats pour la parcelle agroforestière du dispositif DIAMS

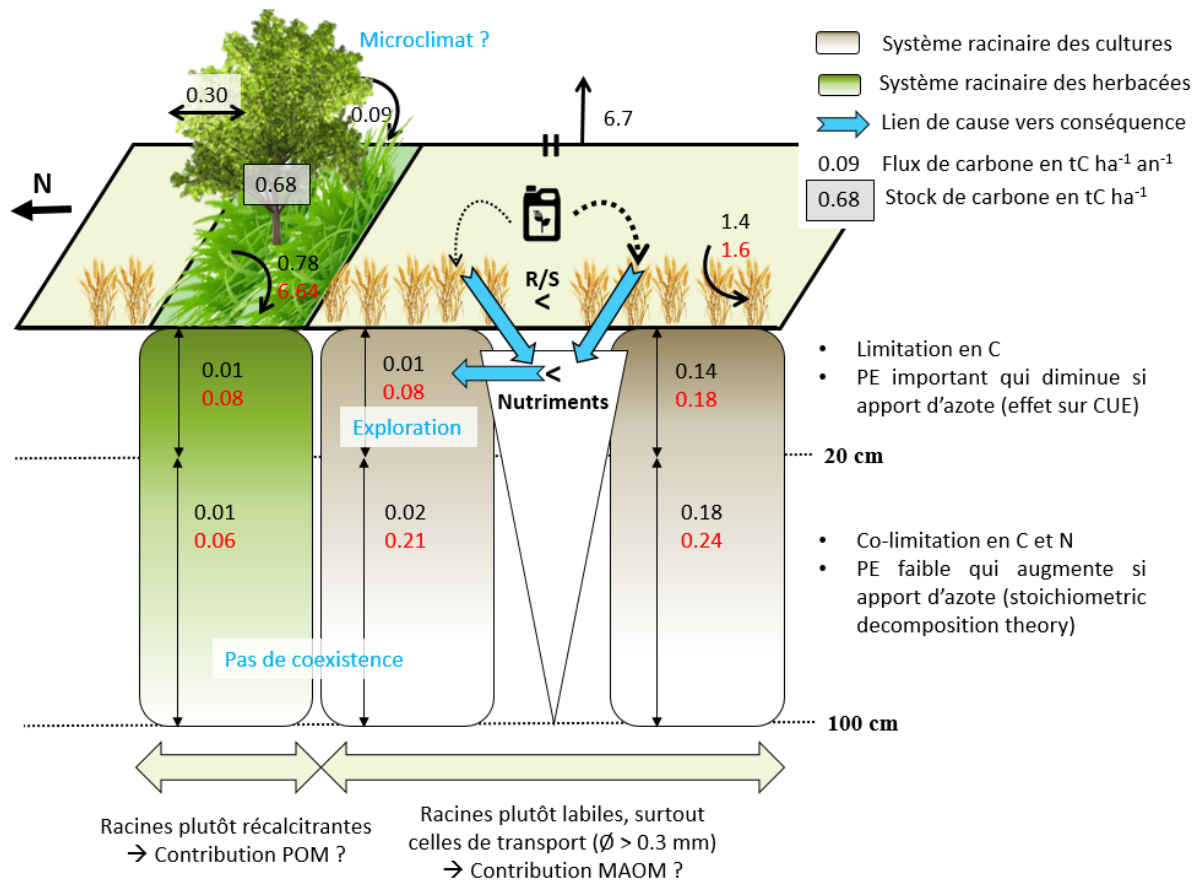


Fig. Bilan 1 Le rôle des racines, y compris profondes, dans les dynamiques de carbone du site agroforestier en arrangement linéaire DIAMS (France). La biomasse aérienne de l'arbre a été mesurée dans le cadre du stage de Ezzeddine Abbessi (Abbessi 2021), les entrées de carbone par la chute des feuilles par Jérôme Ngao (Ngao et al. 2022). Les valeurs indiquent stocks (encadrés) et des flux de C en t ha⁻¹ et t ha⁻¹an⁻¹ respectivement. Les flux écrits en rouge sont ramenés /ha de la surface occupée par leur position (bande enherbée (correspondant à 11,76% de la parcelle agroforestière), culture avoisinant la bande enherbée (11,76%) et culture sans effet (76,48%) selon estimations dans l'Article 6), tandis que les stocks et flux en noir sont ramenés /ha de parcelle agroforestière.

Schéma de synthèse des résultats pour le parc agroforestier *Faidherbia*-Flux

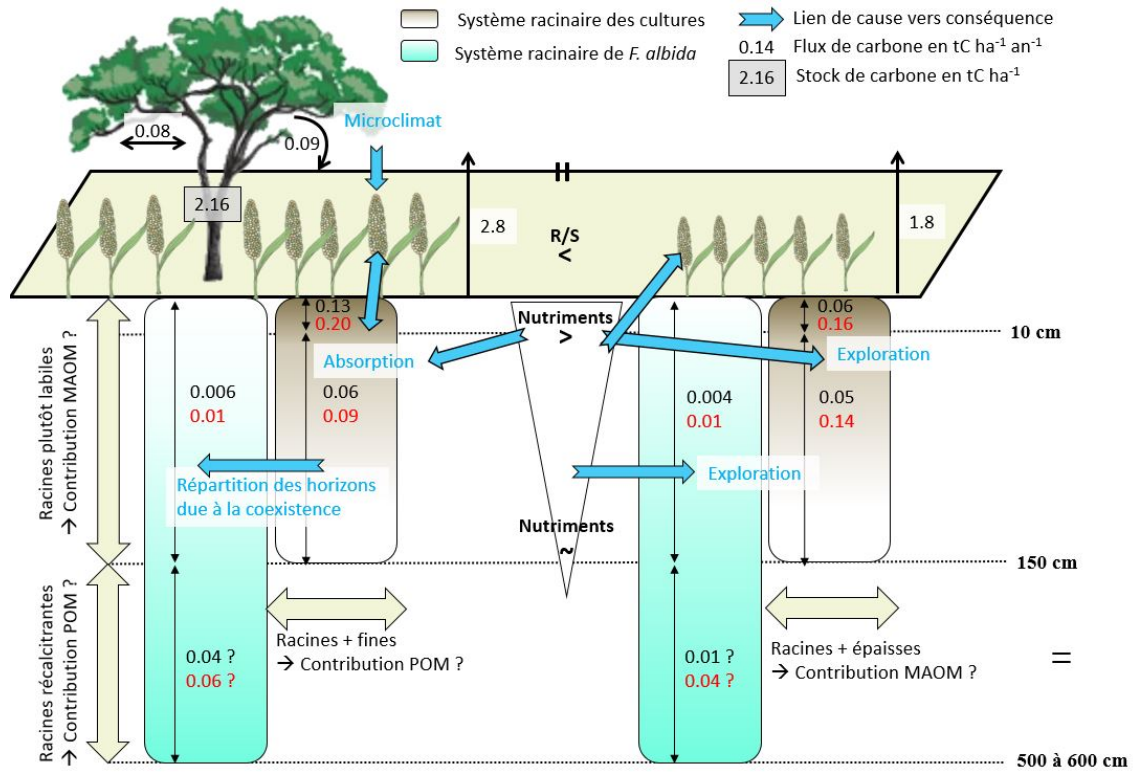


Fig. Bilan 2 Le rôle des racines, y compris profondes, dans les dynamiques de carbone du parc agroforestier *Faidherbia*-Flux (Sénégal). Les flux de sortie de carbone ont été estimés comme la moitié des flux de respiration du sol mesurés dans la thèse de Seydina Ba (en cours), le stock de carbone de la biomasse aérienne de l'arbre dans le cadre du stage de Seydou Diatta (Diatta 2021), les entrées de carbone par la chute des feuilles dans la thèse de Khariatou Sadio (en cours). Les flux écrits en rouge sont ramenés /ha de la surface occupée par leur position (zone influencée par l'arbre (correspondant à 63% du parc agroforestier) et zone non influencée (37%), d'après Annexe I), tandis que les stocks et flux en noir sont ramenés /ha de parcelle agroforestière.

Références

- Abbessi E (2021) Growth and standing biomass of *Robinia pseudoacacia* in Agroforestry: Effect of plantation systems and spatial variability. Master of Sciences, Paris-Saclay
- Abiven S, Recous S, Reyes V, Oliver R (2005) Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residues in soil and role of their biochemical quality. *Biol Fertil Soils* 42:119–128. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0006-0>
- Arosio D, Hojat A, Munda S, Zanzi L (2020) Non-destructive Root Mapping: Exploring the Potential of GPR. *European Association of Geoscientists & Engineers*, pp 1–5
- Avila H, Harmand J-M, Dambrine E, Jimenez F, Beer J, Oliver R (2004) Nitrogen dynamics in a *Coffea arabica* - *Eucalyptus deglupta* agroforestry system in Southern Costa Rica
- Baggs EM (2006) Partitioning the components of soil respiration: a research challenge. *Plant Soil* 284:1–5. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0047-7>
- Battie-Laclau P, Taschen E, Plassard C, Dezette D, Abadie J, Arnal D, Benezech P, Duthoit M, Pablo A-L, Jourdan C, Laclau J-P, Bertrand I, Taudière A, Hinsinger P (2020) Role of trees and herbaceous vegetation beneath trees in maintaining arbuscular mycorrhizal communities in temperate alley cropping systems. *Plant Soil* 453:153–171. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04181-z>
- Bertrand I, Viaud V, Daufresne T, Pellerin S, Recous S (2019) Stoichiometry constraints challenge the potential of agroecological practices for the soil C storage. A review. *Agron Sustain Dev* 39:54. <https://doi.org/10.1007/s13593-019-0599-6>
- Blagodatskaya EV, Blagodatsky SA, Anderson T-H, Kuzyakov Y (2007) Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Applied Soil Ecology* 37:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.05.002>
- Blagodatskaya E, Kuzyakov Y (2008) Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biol Fertil Soils* 45:115–131. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0334-y>
- Bout L (2019) Caractérisation de la qualité du sol et de son hétérogénéité spatiale dans un dispositif expérimental agroforestier à l'état initial. Montpellier SupAgro (France)
- Cardinael R, Guenet B, Chevallier T, Dupraz C, Cozzi T, Chenu C (2018) High organic inputs explain shallow and deep SOC storage in a long-term agroforestry system – combining experimental and modeling approaches. *Biogeosciences* 15:297–317. <https://doi.org/10.5194/bg-15-297-2018>
- Cardinael R, Mao Z, Prieto I, Stokes A, Dupraz C, Kim JH, Jourdan C (2015) Competition with winter crops induces deeper rooting of walnut trees in a Mediterranean alley cropping agroforestry system. *Plant Soil* 391:219–235. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2422-8>
- Chapuis-Lardy L, Badiane Ndour NY, Assigbetse K, Diédhiou I, Balaya R, Cournac L, Founoune Mboup H, Mc Spadden Gardener B, Ghezzehei T, Jourdan C, Bright MB, Bogie N, Debenport S, Delay C, Diakhaté S, Sambou DM, Dick R (2019) Les cultures vivrières associées aux arbustes natifs : un modèle adapté au climat sahélien. In: *Agroforesterie et services écosystémiques en zone tropicale : Recherche de compromis entre services*

- d'approvisionnement et autres services écosystémiques. <https://agritrop.cirad.fr/592701/>. Accessed 27 Jan 2023
- Conde E, Cardenas M, Ponce-Mendoza A, Luna-Guido ML, Cruz-Mondragón C, Dendooven L (2005) The impacts of inorganic nitrogen application on mineralization of ¹⁴C-labelled maize and glucose, and on priming effect in saline alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37:681–691. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.026>
- Coppens F, Merckx R, Recous S, Garnier P (2005) Water, carbon and nitrogen dynamics in soil - Influence of crop residue location and quality
- Cotrufo MF, Soong JL, Horton AJ, Campbell EE, Haddix ML, Wall DH, Parton WJ (2015) Formation of soil organic matter via biochemical and physical pathways of litter mass loss. *Nature Geosci* 8:776–779. <https://doi.org/10.1038/ngeo2520>
- Cotrufo MF, Wallenstein MD, Boot CM, Deneff K, Paul E (2013) The Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Global Change Biology* 19:988–995. <https://doi.org/10.1111/gcb.12113>
- Davidson EA, Richardson AD, Savage KE, Hollinger DY (2006) A distinct seasonal pattern of the ratio of soil respiration to total ecosystem respiration in a spruce-dominated forest. *Global Change Biology* 12:230–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01062.x>
- De Nobili M, Contin M, Mondini C, Brookes PC (2001) Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1163–1170. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00020-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00020-7)
- D'Hervilly C (2021) Impact du linéaire sous arboré sur les organismes et la fertilité du sol en système agroforestier tempéré. Montpellier, SupAgro
- Diatta S (2021) Estimation du stock et du stockage annuel de carbone dans la biomasse aérienne de *Faidherbia albida* du parc agroforestier de Sob (Observatoire de Niakhar, Sénégal) : approches par inventaires et dendrochronologie.
- Dilla AM, Smethurst PJ, Barry K, Parsons D (2019) Preliminary estimate of carbon sequestration potential of *Faidherbia albida* (Delile) A.Chev in an agroforestry parkland in the Central Rift Valley of Ethiopia. *Forests, Trees and Livelihoods* 28:79–89. <https://doi.org/10.1080/14728028.2018.1564146>
- Dorich CD, De Rosa D, Barton L, Grace P, Rowlings D, Migliorati MDA, Wagner-Riddle C, Key C, Wang D, Fehr B, Conant RT (2020) Global Research Alliance N₂O chamber methodology guidelines: Guidelines for gap-filling missing measurements. *J environ qual* 49:1186–1202. <https://doi.org/10.1002/jeq2.20138>
- Elberling B, Touré A, Rasmussen K (2003) Changes in soil organic matter following groundnut–millet cropping at three locations in semi-arid Senegal, West Africa. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 96:37–47. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00010-0)
- Fan P, Guo D (2010) Slow decomposition of lower order roots: a key mechanism of root carbon and nutrient retention in the soil. *Oecologia* 163:509–515. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1541-4>
- Fanin N, Alavoine G, Bertrand I (2020) Temporal dynamics of litter quality, soil properties and microbial strategies as main drivers of the priming effect. *Geoderma* 377:114576. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114576>

- Fort F, Volaire F, Guilioni L, Barkaoui K, Navas M-L, Roumet C (2017) Root traits are related to plant water-use among rangeland Mediterranean species. *Functional Ecology* 31:1700–1709. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12888>
- Germon A (2019) Conséquences de la coupe rase sur la production de racines fines, CO₂, CH₄ et N₂O jusqu'à la nappe phréatique dans une plantation d'*Eucalyptus grandis* menée en taillis sur un dispositif d'exclusion de pluie. Montpellier SupAgro
- Gill RA, Burke IC (2002) Influence of soil depth on the decomposition of *Bouteloua gracilis* roots in the shortgrass steppe. *Plant and Soil* 241:233–242. <https://doi.org/10.1023/A:1016146805542>
- Gill RA, Jackson RB (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *The New Phytologist* 147:13–31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00681.x>
- Gilman EF, Beeson RC Jr (1996) Nursery Production Method Affects Root Growth. *Journal of Environmental Horticulture* 14:88–91. <https://doi.org/10.24266/0738-2898-14.2.88>
- González-Ubierna S, Lai R (2019) Modelling the effects of climate factors on soil respiration across Mediterranean ecosystems. *Journal of Arid Environments* 165:46–54. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.02.008>
- Guillot E (2018) Gradient spatial de fonctionnement et de stabilité écologique d'un sol en système agroforestier Méditerranéen. These, Montpellier, SupAgro
- Han SH, Kim S, Chang H, Kim H-J, Khamzina A, Son Y (2019) Soil depth- and root diameter-related variations affect root decomposition in temperate pine and oak forests. *Journal of Plant Ecology* 12:871–881. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtz023>
- Heinemeyer A, Hartley IP, Evans SP, Carreira De La Fuente JA, Ineson P (2007) Forest soil CO₂ flux: uncovering the contribution and environmental responses of ectomycorrhizas. *Global Change Biol* 13:1786–1797. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01383.x>
- Huérffano X, Fuertes-Mendizábal T, Duñabeitia MK, González-Murua C, Estavillo JM, Menéndez S (2015) Splitting the application of 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP): Influence on greenhouse gases emissions and wheat yield and quality under humid Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 64:47–57. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.11.008>
- Jha P, Prasad Mohapatra K (2010) Leaf litterfall, fine root production and turnover in four major tree species of the semi-arid region of India. *Plant Soil* 326:481–491. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0027-9>
- Johnson SN, Erb M, Hartley SE (2016) Roots under attack: contrasting plant responses to below- and aboveground insect herbivory. *New Phytologist* 210:413–418. <https://doi.org/10.1111/nph.13807>
- Justes E, Bedoussac L, Hellou GC-, Fustec J, Hinsinger P, Jeuffroy M-H, Journet E-P, Louarn G, Naudin C, Pelzer E (2014) Les processus de complémentarité de niche et de facilitation déterminent le fonctionnement des associations végétales et leur efficacité pour l'acquisition des ressources abiotiques. *Innovations Agronomiques* 40:1
- Lavallee JM, Soong JL, Cotrufo MF (2020) Conceptualizing soil organic matter into particulate and mineral-associated forms to address global change in the 21st century. *Global Change Biology* 26:261–273. <https://doi.org/10.1111/gcb.14859>
- Lee M, Nakane K, Nakatsubo T, Koizumi H (2003) Seasonal changes in the contribution of root respiration to total soil respiration in a cool-temperate deciduous forest. In: Abe J (ed) *Roots:*

- The Dynamic Interface between Plants and the Earth: The 6th Symposium of the International Society of Root Research, 11–15 November 2001, Nagoya, Japan. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 311–318
- Liang C (2020) Soil microbial carbon pump: Mechanism and appraisal. *Soil Ecol Lett* 2:241–254. <https://doi.org/10.1007/s42832-020-0052-4>
- Liang C, Schimel JP, Jastrow JD (2017) The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. *Nat Microbiol* 2:1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.105>
- Lin G, Zeng D-H (2017) Heterogeneity in decomposition rates and annual litter inputs within fine-root architecture of tree species: Implications for forest soil carbon accumulation. *Forest Ecology and Management* 389:386–394. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.01.012>
- Linn DM, Doran JW (1984) Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils. *Soil Science Society of America Journal* 48:1267–1272. <https://doi.org/10.2136/sssaj1984.03615995004800060013x>
- Loum M, Viaud V, Fouad Y, Nicolas H, Walter C (2014) Retrospective and prospective dynamics of soil carbon sequestration in Sahelian agrosystems in Senegal. *Journal of Arid Environments* 100–101:100–105. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.10.007>
- Mondini C, Cayuela ML, Sanchez-Monedero MA, Roig A, Brookes PC (2006) Soil microbial biomass activation by trace amounts of readily available substrate. *Biol Fertil Soils* 42:542–549. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0049-2>
- Munroe JW, Isaac ME (2014) N₂-fixing trees and the transfer of fixed-N for sustainable agroforestry: a review. *Agron Sustain Dev* 34:417–427. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0190-5>
- Ngao J, Siegwart L, Jourdan C, Marsden C, Arnal D, Duguet R, Duthoit M, Forest M, Rocheteau A, Trives-Segura C, Bertrand I (2022) Carbon balance components of a black locust-based agroforestry site under Mediterranean climate
- Pampana S, Masoni A, Mariotti M, Ercoli L, Arduini I (2018) Nitrogen fixation of grain legumes differs in response to nitrogen fertilisation. *Experimental Agriculture* 54:66–82. <https://doi.org/10.1017/S0014479716000685>
- Paula RR, Bouillet J-P, Ocheuze Trivelin PC, Zeller B, Leonardo de Moraes Gonçalves J, Nouvellon Y, Bouvet J-M, Plassard C, Laclau J-P (2015) Evidence of short-term belowground transfer of nitrogen from *Acacia mangium* to *Eucalyptus grandis* trees in a tropical planted forest. *Soil Biology and Biochemistry* 91:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.017>
- Picon-Cochard C, Pilon R, Tarroux E, Pagès L, Robertson J, Dawson L (2012) Effect of species, root branching order and season on the root traits of 13 perennial grass species. *Plant Soil* 353:47–57. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1007-4>
- Pries CEH, Sulman BN, West C, O'Neill C, Poppleton E, Porras RC, Castanha C, Zhu B, Wiedemeier DB, Torn MS (2018) Root litter decomposition slows with soil depth. *Soil Biology and Biochemistry* 125:103–114. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.07.002>
- Rahimi J, Ago EE, Ayantunde A, Berger S, Bogaert J, Butterbach-Bahl K, Cappelaere B, Demarty J, Diouf AA, Falk U, Haas E, Hiernaux P, Kraus D, Roupsard O, Scheer C, Srivastava AK, Tagesson T, Grote R (2021) Modelling Gas Exchange and Biomass Production in West African Sahelian and Sudanian Ecological Zones. *Geoscientific Model Development Discussions* 1–39. <https://doi.org/10.5194/gmd-2020-417>

- Rey A, Pegoraro E, Oyonarte C, Were A, Escribano P, Raimundo J (2011) Impact of land degradation on soil respiration in a steppe (*Stipa tenacissima* L.) semi-arid ecosystem in the SE of Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 43:393–403. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.007>
- Rosenstock T, Tully K, Arias-Navarro C, Neufeldt H, Butterbach-Bahl K, Verchot L (2014) Agroforestry with N₂-fixing trees: sustainable development's friend or foe? *Current Opinion in Environmental Sustainability* 6:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.09.001>
- Sauvadet M, Chauvat M, Brunet N, Bertrand I (2017) Can changes in litter quality drive soil fauna structure and functions? *Soil Biology and Biochemistry* 107:94–103. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.018>
- Tedeschi V, Rey A, Manca G, Valentini R, Jarvis PG, Borghetti M (2006) Soil respiration in a Mediterranean oak forest at different developmental stages after coppicing. *Global Change Biology* 12:110–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.01081.x>
- Wang J-J, Tharayil N, Chow AT, Suseela V, Zeng H (2015) Phenolic profile within the fine-root branching orders of an evergreen species highlights a disconnect in root tissue quality predicted by elemental- and molecular-level carbon composition. *New Phytologist* 206:1261–1273. <https://doi.org/10.1111/nph.13385>
- Wanga W, Ohse K, Liu J, Mo W, Oikawab T (2005) Contribution of root respiration to soil respiration in a C₃/C₄ mixed grassland. *J Biosci* 30:507–514. <https://doi.org/10.1007/BF02703725>
- Zechmeister-Boltenstern S, Keiblinger KM, Mooshammer M, Peñuelas J, Richter A, Sardans J, Wanek W (2015) The application of ecological stoichiometry to plant–microbial–soil organic matter transformations. *Ecological Monographs* 85:133–155. <https://doi.org/10.1890/14-0777.1>

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les systèmes agroforestiers sont reconnus pour stocker du carbone dans leurs sols (Cardinael 2015). Les évaluations sont réalisées sur les 36 premiers cm de sol en moyenne (Pellerin et al. 2019). En se concentrant sur les sols de surface, ces études prennent peu en compte le carbone des horizons profonds et les systèmes racinaires qui sont présents en surface mais aussi en profondeur, particulièrement pour les arbres. Avec ce travail de thèse, nous avons voulu investir davantage cette composante souterraine dans les systèmes agroforestiers associant des espèces pérennes et des cultures annuelles, avec l'originalité de prendre en compte les horizons de sols sous la semelle de labour et les racines profondes.

Les deux systèmes agroforestiers étudiés ont des arbres fixateurs d'azote et présentent des stocks de carbone des sols considérés (Gis Sol 2011; Malou 2021) comme faibles (24 tC ha⁻¹ entre 0 et 150 cm de profondeur) sur le site sénégalais et moyens (56 tC ha⁻¹ entre 0 et 100 cm) dans le dispositif français. Ils sont donc deux bons modèles pour prétendre à une augmentation de carbone dans les sols, avec le potentiel de limiter les intrants azotés dans un développement agroécologique. Même si ce travail n'a pas permis de suivre l'évolution des stocks de carbone dans le temps, il démontre l'importance des racines, et notamment profondes, dans les processus de stockage. En effet, dans le dispositif en arrangement linéaire (France), 50 à 75% de la biomasse racinaire des herbacées et du blé cultivé se situe entre 20 et 100 cm de profondeur. Dans le parc à *F. albida* (Sénégal), les horizons sous 30 cm de profondeur sont principalement colonisés par les racines d'arbre, qui atteignent même la nappe (5-6 m). En réponse à la faible concentration en nutriments dans les sols profonds et à la faible densité de biomasse racinaire des arbres (maximum 15 g m⁻³ pour les racines fines entre 0 et 150 cm de profondeur quelle que soit la distance à l'arbre), nous avons déduit que la plasticité des systèmes racinaires des arbres leur permet d'explorer un gros volume de sol, en s'éloignant à + 30 m du tronc.

Grâce à la complémentarité des niches écologiques (répartition des horizons dans le parc agroforestier au Sénégal / restriction de la colonisation racinaire propre à chaque communauté dans le site en arrangement linéaire en France), les racines des espèces pérennes n'interfèrent pas ou peu avec le développement des systèmes racinaires des cultures annuelles. Dans le parc agroforestier mature au Sénégal, les plantes cultivées sous l'arbre ont une meilleure production aérienne que celles situées loin de l'arbre (teneur en nutriments du sol élevée et conditions pédoclimatiques favorables sous l'arbre) mais aucune différence de biomasse racinaire (200 à 300 g m⁻³) n'a été observée entre les deux situations. La stratégie d'exploitation sous l'arbre s'oppose à une stratégie d'exploration du sol loin de l'arbre, en quête d'eau et de nutriments plus rares que sous l'arbre. Après 3 ans d'agroforesterie sur le site en arrangement linéaire en France, l'apport de fertilisant azoté réduit en bordure de bande enherbée par rapport au milieu de l'inter-rang cultivé a eu pour conséquence une diminution de la biomasse racinaire de la céréale (divisée par 3) dans cette zone, mais sans impact sur sa production aérienne.

La présence d'espèces pérennes dans les systèmes agroforestiers, ainsi que la sélection variétale des espèces cultivées, permettent d'atteindre les horizons de sol plus profond, que ceux généralement

colonisés par les racines des cultures annuelles, atteignant maximum 100 à 150 cm. Mais ces sols ont un fonctionnement très différent de ceux de surface (Button et al. 2022). Dans les sols profonds, la teneur plus faible en carbone leur confère une marge d'augmentation importante, la présence de racines plutôt lignifiées (espèces pérennes) et parfois à diamètre moyen plus faible leur fournit des litières récalcitrantes, et l'atténuation des variations de température et humidité du sol tend à y ralentir la décomposition racinaire par rapport aux sols de surface. De plus, les horizons profonds représentent une banque de nutriments difficilement renouvelable. Lorsque les arbres sont fixateurs d'azote atmosphérique, comme *F. albida* et *R. pseudoacacia* dans cette thèse, l'enrichissement en nutriments en profondeur par fixation symbiotique pourrait contrer à l'appauvrissement par l'exploitation des racines. Cependant, un enrichissement en nutriments en profondeur peut aussi être responsable d'une déstabilisation importante du carbone du sol par *priming effect* (plus de 80 mgC kg_{sol}⁻¹ de carbone du sol déstocké lors de l'apport de 70 mgC kg_{sol}⁻¹ sous forme de glucose dans les sols du site français). Des études supplémentaires permettront de mieux appréhender les dynamiques de nutriments dans les systèmes agroforestiers avec arbres fixateurs d'azote (lixiviation, dénitrification, dynamiques d'absorption vs. libération de nutriments par les racines, rôle de rétention et d'absorption des nutriments lessivés par les arbres (*safety-net*) etc).

Dans le parc agroforestier au Sénégal, les racines fines des arbres représentent 12 à 17% des entrées de carbone dérivé de toutes les litières racinaires, sans impacter la biomasse racinaire des cultures. Ainsi, les entrées de carbone dérivé des litières des racines fines dans le sol (arbres + cultures) y représentent 67.3 % des entrées totales. Dans le cas du site récent en France, les entrées de carbone dérivé des litières des racines dans le sol ne représentent que 12.6 % des entrées totales, mais sont destinées à augmenter grâce à la fixation symbiotique et le développement des systèmes racinaires des arbres non observés dans ce travail. A ce stade (3 ans d'agroforesterie), la présence de la ligne d'arbres enherbée est responsable d'une diminution des entrées de carbone dérivé des litières racinaires (-0.02 tC ha⁻¹) par rapport à la culture qui en est éloignée. Ces pertes sont dues à la bande enherbée (biomasse racinaire 1.4 fois plus importante que celle du blé mais avec un *turnover* faible qui limite les entrées de carbone) et à la culture l'avoisinant (réduction de biomasse racinaire). Ces pertes sont cependant largement compensées par les gains liés au *turnover* des parties aériennes des espèces pérennes (+0.87 tC ha⁻¹).

Le carbone dérivé des litières racinaire entre dans le sol par les processus de décomposition. Grâce à l'utilisation d'une méthode innovante d'imagerie *in situ*, nous avons observé une décomposition par diminution du diamètre des racines mais aussi par ingestion par la faune du sol. Nous avons démontré que la décomposition des litières racinaires débute pendant la phase de croissance des céréales, suggérant un *turnover* important. A la date de floraison, 50% du volume racinaire est perdu, laissant le cylindre central bien visible, comme matière particulière plus récalcitrante que le parenchyme cortical. Cette méthode d'observation de la décomposition *in situ* grâce à des scanners enfouis dans le sol est

prometteuse mais demande à être testée plus largement. Pour réduire le temps d'analyse des images, une automatisation du traitement d'image par intelligence artificielle par exemple pourrait être envisagée.

Même si les systèmes agroforestiers ont été et sont encore beaucoup étudiés pour leur potentiel de stockage de carbone dans les sols et d'autres services écosystémiques, il existe peu d'études présentant des données de séquestration de carbone, c'est-à-dire avec une prise en compte des gaz à effet de serre, et intégrant la variabilité spatiale due à la présence d'espèces pérennes. Nous n'avons malheureusement pas pu mesurer l'ensemble des gaz à effet de serre, mais nous avons pu réaliser un bilan carbone en prenant en compte les principaux composants du système agroforestier sur le site français. Après 3 à 5 ans de différenciation de l'usage des terres, le système agroforestier français présente des entrées de carbone ($3.0 \text{ tC ha}^{-1}\text{an}^{-1}$) plus importantes que la culture pure ($2.0 \text{ tC ha}^{-1}\text{an}^{-1}$, estimé par les mesures dans l'inter-rang cultivé éloigné de la bande enherbée) *vs.* des émissions de CO_2 à la surface du sol équivalentes ($6.7 \text{ tC ha}^{-1}\text{an}^{-1}$). Cet effet positif de l'association plurispécifique sur le bilan carbone par rapport à la culture pure est particulièrement intéressant en climat méditerranéen, où la production de biomasse est relativement faible et les sols particulièrement enclins à la dégradation.

Les résultats d'émission de CO_2 sont à consolider avec des mesures de respiration du sol en continu et si possible intégrant l'ensemble de gaz à effet de serre (CH_4 et N_2O). Enfin la question de l'origine des gaz, en particulier de leur profondeur, est importante à considérer pour mieux comprendre le fonctionnement des horizons de sols profonds. Des approches isotopiques seraient utiles pour aborder ces questions.

Dès à présent, il est important d'évaluer la résilience de ces systèmes agroforestiers face aux changements climatiques. Ceci nécessite l'acquisition de données sur le long terme avec des approches diachroniques (évolution sur une même parcelle depuis la plantation des arbres). Il est donc important de réaliser des mesures sur des sites expérimentaux, tels ceux utilisés dans cette thèse, qui, bien que parfois éloignés des pratiques des agriculteurs, sont cruciaux pour l'acquisition de données et la calibration de modèles.

Références

- Button ES, Pett-Ridge J, Murphy DV, Kuzyakov Y, Chadwick DR, Jones DL (2022) Deep-C storage: Biological, chemical and physical strategies to enhance carbon stocks in agricultural subsoils. *Soil Biology and Biochemistry* 170:108697. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108697>
- Cardinael R (2015) Stockage de carbone et dynamique des matières organiques des sols en agroforesterie sous climat méditerranéen et tempéré. Thesis, Université Paris-Saclay (ComUE)
- Gis Sol (2011) Rapport sur l'état des sols de France. <https://www.gissol.fr/publications/rapport-sur-letat-des-sols-de-france-2-849>. Accessed 6 Mar 2023
- Malou OP (2021) Le carbone organique dans les sols cultivés du bassin arachidier du Sénégal : variabilité spatiale et effets des pratiques culturales. Doctorat, Université Cheikh Anta Diop De Dakar
- Pellerin S (ed), Bamiere L (ed), Launay C, Martin R, Schiavo M, Angers D, Augusto L, Balesdent J, Basile-Doelsch I, Bellassen V, Cardinael R, Cécillon L, Ceschia E, Chenu C, Constantin J, Darroussin J, Delacote P, Delame N, Gastal F, Gilbert D, Graux A-I, Guenet B, Houot S, Klumpp K, Letort E, Litrico I, Martin M, Menasseri S, Meziere D, Morvan T, Mosnier C, Roger-Estrade J, Saint-André L, Sierra J, Théron O, Viaud V, Gâteau R, Le Perchec S, Savini I, Réchauchère O (2019) Stocker du carbone dans les sols français. Quel potentiel au regard de l'objectif 4 pour 1000 et à quel coût ? Ed. Quae

ANNEXES

Annexe A

Objectif

Cartographie de l'orge en 2021 dans le milieu de l'inter-rang pour comparer avec celle du blé, et estimer l'effet des conditions climatiques sur le développement racinaire de 2 céréales.

Méthodes

En Mai 2021, une cartographie racinaire a été réalisée sur l'orge dans les mêmes conditions qu'en Mai 2020 (blé), mais en se concentrant uniquement sur la position située dans l'inter-rang cultivé loin de la bande enherbée. Ce travail a permis de vérifier les ordres de grandeurs de la première expérimentation, et ici elle peut servir à discuter le potentiel effet des conditions climatiques sur le développement des systèmes racinaires des céréales (même s'il s'agit de céréales différentes, on fait l'hypothèse qu'en conditions similaires elles se développeraient de manière identique).

Résultats

En 2021, l'orge présente un ratio R/S plus important que le blé de 2020 dû à une biomasse aérienne plus faible (de même que celle de la bande enherbée qui ne représente en 2021 que 27% de celle mesurée en 2020) et une biomasse racinaire équivalente sur le profil entier (Tableau A-1). En regardant en détail, la biomasse racinaire de l'orge est plus importante entre 0 et 50 cm de profondeur et plus faible sur le dernier horizon comparativement au blé (Fig. A-1). La cartographie racinaire confirme que les racines d'orge sont principalement concentrées entre 0 et 30 cm et explorent moins la profondeur que celles du blé (Fig. A-2). Ces différences de biomasses aériennes et donc de ratio R/S et de distribution racinaires peuvent être expliquées par des différences de traits architecturaux (taux de ramifications, diamètre, taux de tallage...) entre les deux espèces de céréales (orge / blé), et/ou par un stress perçu par les racines de l'orge par un manque d'eau suggéré par les conditions plus sèches (Foxx and Fort 2019) observées en 2021 qu'en 2020 (Fig. A-3).

Tableau A-1 Biomasse aérienne, racinaire et ratio R/S en fonction de la position et de la céréale. Les données présentées sont les moyennes \pm l'écart-type (n=3). Les lettres minuscules indiquent les différences significatives entre les positions étudiées (p-value < 0.05).

	Bande enherbé e	Blé proche	Blé loin	Bande enherbé e	Orge proche	Orge loin	P-value
Biomasse aérienne (g m ⁻²)	991 \pm 327 bc	1045 \pm 150 bc	1107 \pm 120 c	266 \pm 30 a	651 \pm 65 ab	876 \pm 254 bc	2.32 x 10 ⁻³
Biomasse racinaire entre 0 et 100 cm de profondeur (g m ⁻²)	59 \pm 15	32 \pm 16	50 \pm 17	-	-	51 \pm 14	0.18
Ratio R/S	0.065 \pm 0.025	0.032 \pm 0.021	0.045 \pm 0.016	-	-	0.063 \pm 0.025	0.20

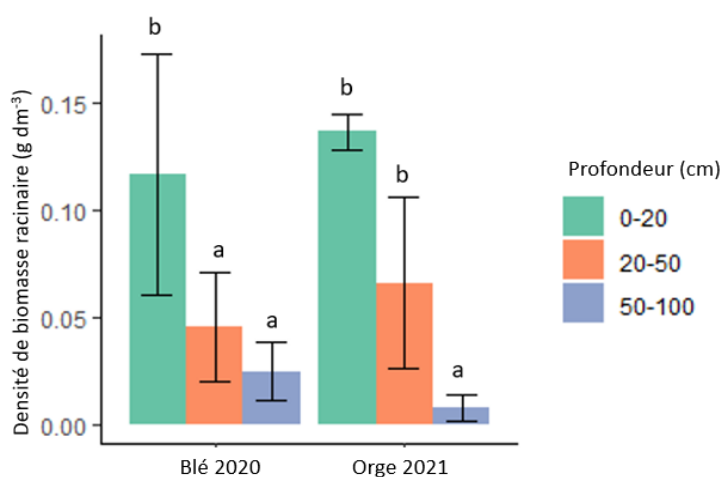


Fig. A-1 Densité de biomasse racinaire du blé en 2020 et de l'orge en 2021 en fonction de la profondeur.

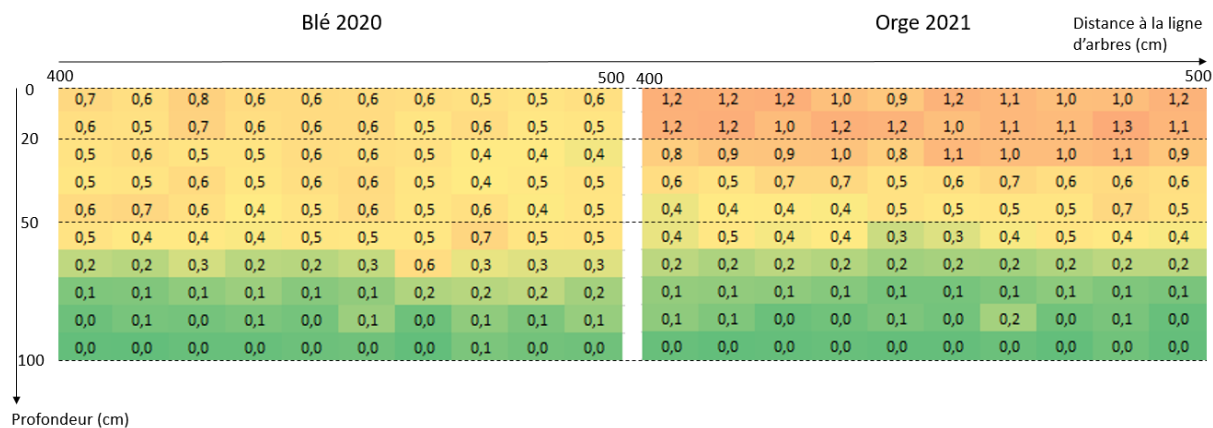


Fig. A-2 Cartographie de la densité de longueur racinaire (RLD, cm cm⁻³) du blé en 2020 et de l'orge en 2021 dans l'inter-rang cultivé (entre 4 et 5 m de la ligne d'arbres) jusqu'à 100 cm de profondeur.

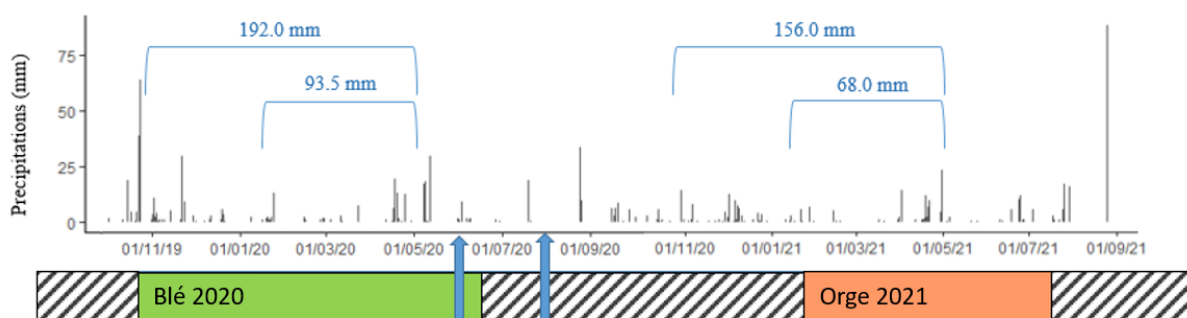


Fig. A-3 Précipitations journalières entre octobre 2019 et septembre 2021 sur DIAMS. La somme des précipitations entre le semis (29/10/2019 pour le blé et 22/01/2021 pour l'orge) et la floraison (estimée au 1^{er} mai 2020 pour le blé et 2021 pour l'orge) sont inscrites en bleu. Les campagnes d'irrigation d'irrigations en été 2020 (localisées sur la ligne d'arbres) sont indiquées par des flèches bleues.

Annexe B

Objectif

Test de l'hétérogénéité de l'épandage de fertilisant sur DIAMS.

Méthodes

Sur DIAMS, des petites coupelles ont été placées sur 6 transects de 4 distances de la ligne d'arbres (1.5, 2.5, 3.5, 8.2 m) et 3 points dans la culture pure. La fertilisation a ensuite été réalisée avec un épandeur à bras de 12 m de large selon les pratiques habituelles. La quantité de fertilisant recueillie dans chaque coupelle a été pesée.

Résultats

L'apport de fertilisant est significativement réduit à 1.5 m de la bande enherbée par rapport aux autres localisations, y compris la culture pure (Fig. B-1). Cette différence est probablement provoquée par les engins agricoles qui contournent les bandes enherbées et ne s'en approchent peut-être pas entièrement.

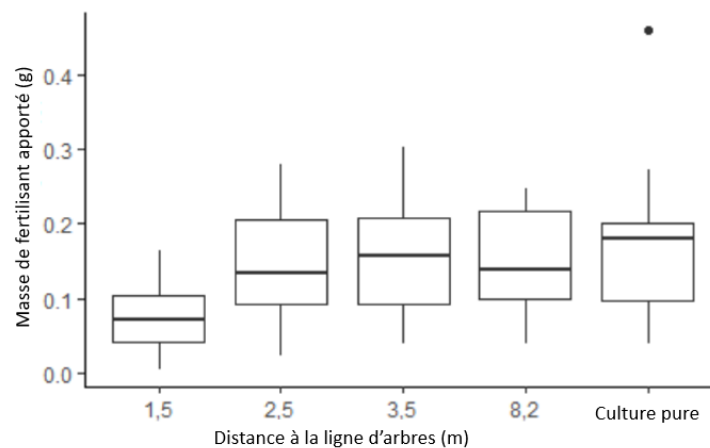


Fig. B-1 Masse de fertilisant dans la coupelle selon la distance à l'arbre en agroforesterie et en culture pure

Annexe C

Objectif

Evaluation des rendements en fonction de la localisation sur la parcelle DIAMS.

Méthodes

Une récolte à la micro moissonneuse batteuse a été réalisée juste avant la récolte du reste de la parcelle. Cette expérimentation a été réalisée sur l'orge en 2021 et sur le pois en 2022. La stratégie expérimentale est la suivante : 3 réplicats (blocs) × 4 pseudo-réplics (au sein de chaque bloc) × 4 positions (Nord-Est, Sud-Ouest de la ligne d'arbres, milieu de l'inter-rang cultivé et culture pure (sans arbre)).

Résultats

Aucune différence significative n'est observée entre les différentes localisations au sein de l'agroforesterie (p-value = 0.47, Fig. C-1).

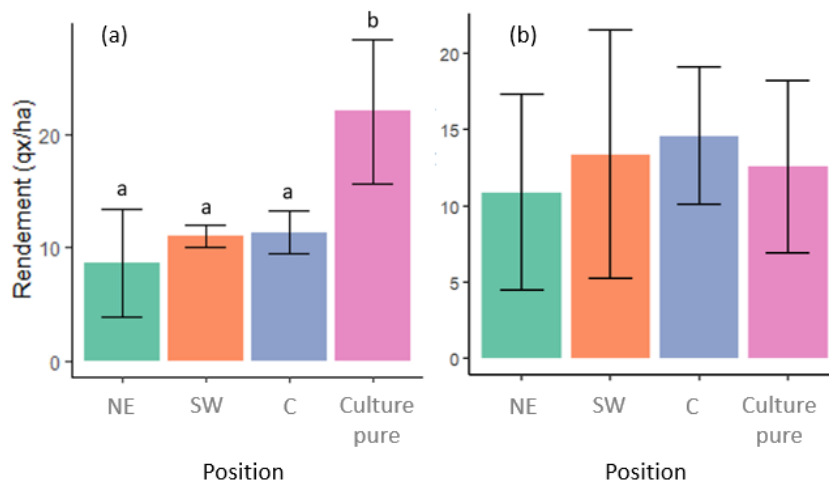


Fig. C-1 Rendements différenciés de l'orge (2021, a) et du pois (2022, b) sur DIAMS en fonction de la position (proche de la bande enherbée côté Nord-Est (NE), proche de la bande enherbée côté Sud-Ouest (SW), milieu de l'inter-rang (C) et dans la culture pure).

Annexe D

Objectif

Comparaison du carbone organique du sol de DIAMS en 2020 et 2022 pour détecter une évolution au cours de la thèse.

Méthodes

Le carbone organique a été mesuré sur des sols de la plantation de DIAMS échantillonnés en Mai 2022 selon les mêmes méthodes qu'en 2020. Vu l'absence de différence significative entre les deux campagnes (p -value = 0.60), nous avons décidé de ne pas analyser le reste des échantillons de DIAMS par soucis d'économie, supposant que si les sols de la plantation de se sont pas différenciés sur cette période, les sols agroforestiers et de la culture pure n'ont pas évolué non plus.

Résultats

Dans les sols des plantations d'arbres de DIAMS, la teneur en carbone organique du sol n'était pas significativement différente entre octobre 2020 et mai 2022 (Fig. D-1). On peut faire l'hypothèse que les stocks de carbone organique du sol de DIAMS n'ont pas évolué significativement sur la durée de la thèse, quelle que soit la localisation.

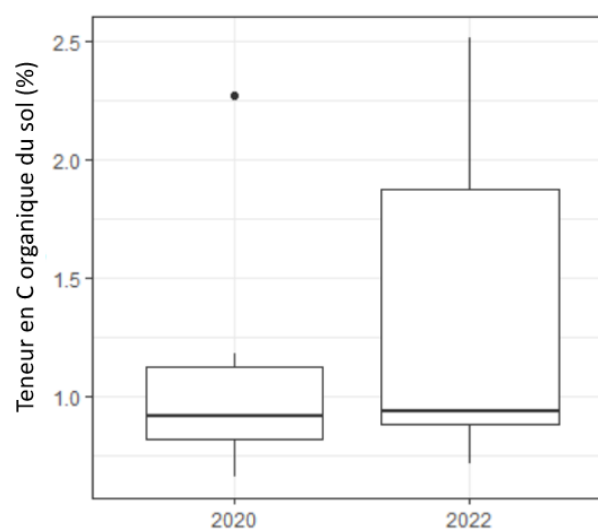


Fig. D-1 Teneur en carbone organique dans le sol de la plantation de DIAMS en octobre 2020 et en mai 2022 (n=6).

Annexe E

Objectif

Vérification de la mesure de la respiration du sol : comparaison des mesures de l'incubation (Article 5) et des quantification *in situ* (Article 6)

Méthodes

Dans les incubations de sol, la respiration hétérotrophe est mesurée dans les contrôles. On utilise les valeurs des sols à 0-20 cm au jour 1 *i.e.* flush provoqué par l'apport d'eau à t0, et entre le jour 3 et le jour 28. En utilisant la densité de la fraction tamisée du sol, la teneur volumique en éléments grossiers, et la densité apparente du sol connus de DIAMS, on peut passer du rapport de la quantité de CO₂ par masse de sol tamisé (mesuré dans l'incubation) à un rapport de la quantité de CO₂ par masse de sol non tamisé, puis à un volume de sol, puis à une surface, en prenant en compte que l'échantillonnage de ce sol concerne les 20 premiers cm. Les mesures *in situ* de la respiration du sol à la surface de DIAMS résultent d'une composante production (respiration du sol (hétérotrophe + autotrophe), et éventuelle contribution des carbonates) et une composante transport (diffusion issue du mouvement désordonné des molécules vers l'équilibrage du système, convection issue d'un mouvement de matière (le vent très présent sur DIAMS comme fluide porteur) et dispersion relative à l'hétérogénéité des vitesses dans le milieu poreux (Delogu 2013)). Pour ce calcul, on estime que la moitié provient de la respiration hétérotrophe (*cf.* Article 6) et on néglige la composante transport.

Résultats

Le maximum atteint par les mesures *in situ* correspond aux valeurs du jour 1 après réhumectation des incubation (données non montrées). Malgré la difficulté de comparer des expérimentations aussi différentes (conditions contrôlées constantes *vs.* variations naturelles des conditions pédoclimatiques *in situ*) et le grand nombre d'approximation et d'étapes à réaliser pour homogénéiser les unités, on peut considérer que les ordres de grandeurs sont équivalents (Tableau E-1).

Tableau E-1 CO₂ émis rapportée à un sol non tamisé $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Respiration hétérotrophe mesurée dans les incubations des sols	Jour 1 (flush microbien)	5.5
	Entre Jour 3 et Jour 60	1.3 ± 0.7
Respiration hétérotrophe estimée de la mesure <i>in situ</i> à la surface du sol	Sur les 2 années d'acquisitions	Entre 1 et 5

Annexe F

Objectif

Gap filling des émissions de CO₂ avec des covariables mesurées de façon continue pour confirmer la méthode de l'interpolation linéaire.

Méthodes

La température et l'humidité du sol mesurées de façon continue entre 0 et 20 cm de profondeur sur DIAMS ont été choisies comme covariables candidates des émissions de CO₂. Après avoir testé la dépendance des émissions de CO₂ à la température et l'humidité (Rey et al. 2011), seule la température a été retenue. La réponse des émissions de CO₂ à la température était exponentielle, comme déjà trouvé dans d'autres études (Rey et al. 2011; Li et al. 2013) :

$$\text{CO}_2 = a e^{bT}$$

avec a et b des coefficients de la régression (Fig. F-1). Cette formule a donc été appliquée à la température du sol mesurée dans la culture pure, à 0.5, 3.5 et 8.5 m de la ligne d'arbres en agroforesterie pour estimer les émissions continues de CO₂ sur la totalité de la période d'expérimentation (15/10/2020 au 14/10/2022) sur ces positions (Fig. F-2). Puis, les émissions annuelles ont été obtenues par le cumul de toutes les mesures journalières de CO₂, divisé par 2 ans et converti en t_{C-CO2} ha⁻¹ an⁻¹.

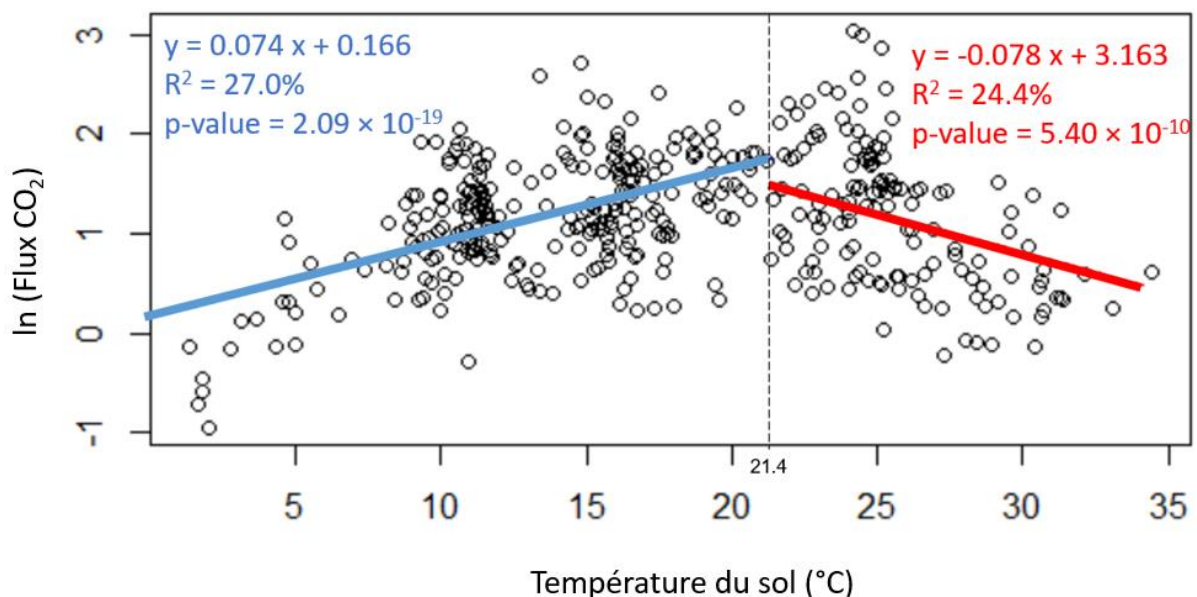


Fig. F-1 Relation entre la température du sol et la respiration du sol. Chaque point correspond à la moyenne des réplicas par position, orientation et date d'acquisition.

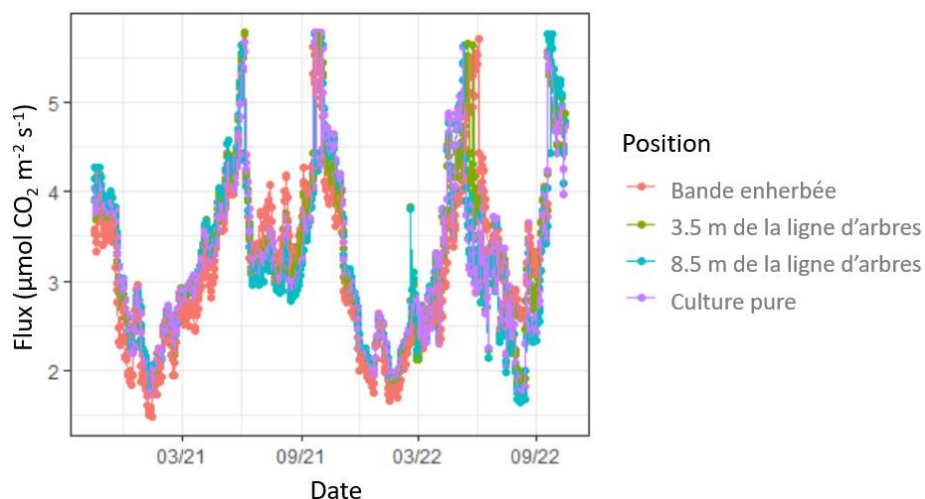


Fig. F-2 Respiration du sol au cours du temps estimée avec la température du sol (méthode de *Gap filling* avec des covariables).

Plus de 70% de la variabilité de la respiration du sol n'était pas expliquée par la température (ni l'humidité éliminée au cours des étapes précédentes), d'où le choix de ne pas garder la méthode des covariables pour le *Gap filling* de l'Article 6.

Résultats

Même si les résultats ne sont basés que sur un unique réplica par position et que le modèle est basé sur un coefficient de corrélation faible (<30%), les valeurs annuelles de la respiration du sol ainsi obtenues se rapprochent de celles calculées avec l'interpolation linéaire dans l'Article 6 (Tableau F-1).

Tableau F-1 Respiration du sol – émissions annuelles de CO₂ calculées avec deux méthodes de *Gap filling* (interpolation linéaire et en utilisant une covariable).

Traitement	Distance à l'arbre	Interpolation linéaire	Utilisation d'une covariable
Agroforesterie	0.5 m de la ligne d'arbres	14.6 ± 3.3	12.2
	3.5 m de la ligne d'arbres	12.2 ± 1.6	12.3
	8.5 m de la ligne d'arbres	13.7 ± 1.4	12.1
Culture pure	-	14.7 ± 0.9	12.2

Annexe G

Objectif

Estimation des flux de N₂O à la surface du sol de DIAMS.

Méthodes

Pour définir les meilleures conditions pour la campagne de prélèvement de gaz à la surface du sol, des tests ont été effectués. Ont été vérifiés : l'étanchéité du dispositif cylindre + chambres, la quantité d'engrais apportée au sol à partir de laquelle l'émission de N₂O est assez importante pour être quantifiable et la durée après l'apport d'engrais à partir de laquelle l'émission est significative (décalée dans le temps du fait de l'uréase). Ainsi, 2 campagnes de prélèvements se sont déroulées à J+6 et J+10 après la fertilisation azotée du 27/04/2021 (SMART N 46). Pour cela, on utilise les mêmes cylindres en PVC que les campagnes CO₂ que l'on recouvre pour créer une chambre totalement hermétique (Fig. G-1) pendant 90 minutes. Après t = 0, 30, 60 et 90 min d'incubation, 10 mL de gaz est échantillonné avec une seringue à aiguille (Terumo, Guyancourt, France) de 10 mL et injecté dans des vials de 9 mL préalablement mis sous vide (Vacuette, Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). Pour chaque échantillon, la concentration en N₂O est mesurée dans un sous-échantillon de 0.2 mL analysé par chromatographie gazeuse (chromatographe CP-3800) équipé d'un détecteur à capture d'électron (Varian, Palo Alto, USA). Avant les analyses, le dispositif est calibré avec des standards du commerce d'hélium et N₂O (99.999 et 99.998% respectivement, Air Liquide, Paris, France). La concentration en N₂O est déterminée par lecture des chromatogrammes à l'aide du logiciel STAR Workstation Version 6.0 (Varian, Palo Alto, USA).



Fig. G-1 Dispositif expérimental de prélèvement d'échantillons de gaz à la seringue dans une chambre hermétique sur le site DIAMS dans le but de mesurer la concentration en N₂O au cours de l'accumulation du gaz dans la chambre et calculer un flux d'émission.

Résultats

Aucune accumulation de N_2O significative n'est observée dans les chambres 6 jours après la fertilisation, suggérant de très faibles flux et difficilement quantifiables (avec cette méthode). Au bout de 10 jours, les flux sont significatifs et toujours très faibles (Fig. G-2), sans différence significative selon la localisation (p -value = 0.92).

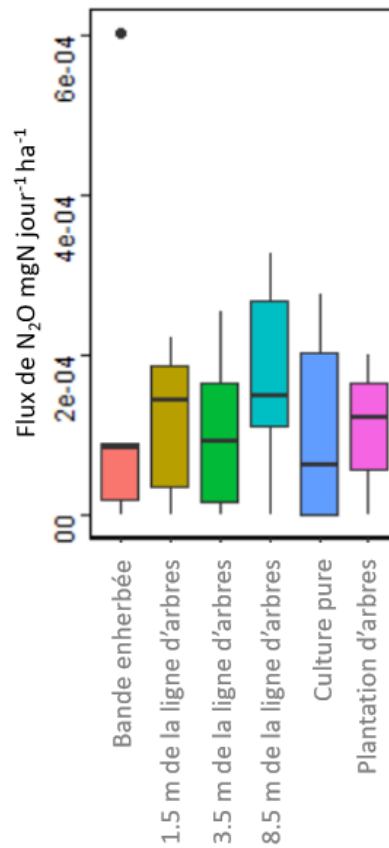


Fig. G-2 Flux de N_2O 10 jours après la fertilisation sur DIAMS, en fonction de la localisation en agroforesterie, culture pure et plantation d'arbres.

Annexe H

Objectif

Quantification du carbone organique dissous dans le profil vertical de DIAMS.

Méthodes

Le carbone dissous dans le sol a été mesuré sur les sols prélevés en Mai 2020 sur DIAMS (cartographie racinaire de l'Article 2) par extraction à l'eau distillée et analysé au TOC. Le carbone organique dissous pourrait peut-être être utilisé, avec parcimonie, comme indicateur de la rhizodéposition. Le ratio du carbone organique dissous et du stock de carbone dans les racines a été calculé.

Résultats

L'absence de différence significative (p -value > 0.05) du carbone organique dissous entre les profondeurs (Fig. H-1a) suggère l'absence d'accumulation du carbone dissous en profondeur et donc l'absence de transferts verticaux d'éléments sur DIAMS (peu de bioturbation, de lessivage *etc*). Lorsque le carbone organique dissous du sol est rapporté au stock de carbone racinaire, les valeurs en surface sont 2 fois plus importantes dans la culture avoisinant la bande enherbée que les autres localisation (Fig. H-1b). A cette position, le manque de nutriments dans le sol pourrait induire une sécrétion d'exsudats racinaires plus importante et visible sur le carbone organique dissous mesuré, comme c'est déjà le cas en profondeur en conditions limitantes de nutriments d'après la bibliographie (Hirte et al. 2018).

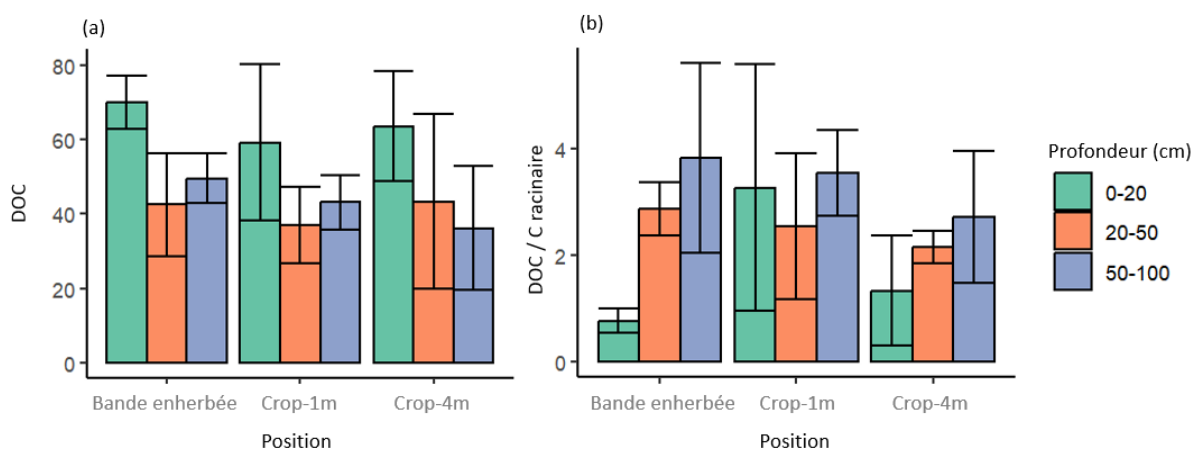


Fig. H-1 Carbone organique dissous (DOC) dans le sol (a) et rapport du carbone organique dissout par le stock de carbone racinaire (b) sur DIAMS en fonction de la profondeur (0-20, 20-50 et 50-100 et de la position (bande enherbée, inter-rang avoisinant la bande enherbée (Crop-1m) et inter-rang éloigné de la bande enherbée (Crop-4m)).

Annexe I

D'après (Roupsard et al. 2020), la distance d'influence de l'arbre sur le rendement du mil (et possiblement sur les propriétés du sol), est de 17 m. En considérant une densité d'arbres de 7/ha, on obtient une surface de 63% du parc considérée comme influencée par *F. albida*, et 37% non influencée.

Références

- Delogu E (2013) Modélisation de la respiration du sol dans les agro-écosystèmes. Sciences de la Terre., Université Paul Sabatier - Toulouse III
- Foxx AJ, Fort F (2019) Root and shoot competition lead to contrasting competitive outcomes under water stress: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 14:e0220674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220674>
- Hirte J, Leifeld J, Abiven S, Oberholzer H-R, Mayer J (2018) Below ground carbon inputs to soil via root biomass and rhizodeposition of field-grown maize and wheat at harvest are independent of net primary productivity. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 265:556–566. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.010>
- Li L-J, You M-Y, Shi H-A, Ding X-L, Qiao Y-F, Han X-Z (2013) Soil CO₂ emissions from a cultivated Mollisol: Effects of organic amendments, soil temperature, and moisture. *European Journal of Soil Biology* 55:83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.12.009>
- Rey A, Pegoraro E, Oyonarte C, Were A, Escribano P, Raimundo J (2011) Impact of land degradation on soil respiration in a steppe (*Stipa tenacissima* L.) semi-arid ecosystem in the SE of Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 43:393–403. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.007>
- Roupsard O, Audebert A, Ndour AP, Clermont-Dauphin C, Agbohessou Y, Sanou J, Koala J, Faye E, Sambakhe D, Jourdan C, le Maire G, Tall L, Sanogo D, Seghieri J, Cournac L, Leroux L (2020) How far does the tree affect the crop in agroforestry? New spatial analysis methods in a *Faidherbia* parkland. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 296:106928. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106928>

Contribution des racines aux stocks de carbone dans le profil de sol de deux systèmes agroforestiers contrastés : distribution, décomposition et impact sur la minéralisation du carbone et des nutriments

Résumé

Dans le contexte actuel d'urgence climatique, la séquestration du carbone (C) dans les sols des systèmes agricoles est encouragée pour maintenir leur fertilité et participer à la réduction de la concentration en gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Les racines pourraient contribuer à l'augmentation des stocks de C dans le sol du fait de leur temps de résidence dans le sol supérieur aux parties aériennes des plantes et de leur capacité à atteindre différents horizons de sol, y compris profonds (> 30 cm de profondeur). Cette thèse vise à identifier la contribution des racines d'espèces pérennes et annuelles aux stocks de C dans les sols jusqu'à 150 cm de profondeur, dans deux systèmes agroforestiers contrastés, en incluant l'hétérogénéité spatiale induite par ces écosystèmes. Dans le parc agroforestier *Faidherbia*-Flux en climat semi-aride (Niakhar, Sénégal), des arbres *Faidherbia albida* âgés d'environ 70 ans sont dispersés aléatoirement, et des rotations d'arachide et mil sont cultivées jusque sous les arbres. Le dispositif encore jeune DIAMS implanté en 2017 en climat méditerranéen (Mauguio, France) est en arrangement linéaire avec du *Robinia pseudoacacia* et complété d'une bande enherbée de 2 m de large. Les rotations culturales (blé dur, orge et pois) sont cultivées en bandes de 15 m de large entre les lignes d'arbres. Les deux sites présentent de faibles stocks de C dans le sol (24 tC ha⁻¹ entre 0 et 150 cm de profondeur dans le parc sénégalais et 56 tC ha⁻¹ entre 0 et 100 cm dans le dispositif français) et les arbres sont tous fixateurs d'azote.

Les résultats de cette thèse montrent une complémentarité des niches écologiques des systèmes racinaires. Dans les deux sites, les racines des espèces pérennes n'interfèrent pas ou peu avec le développement des racines des cultures annuelles. Les entrées de C dérivé des litières racinaires représentent 0.7% des stocks de C des sols entre 0 et 100 cm dans le site français et 1.5% entre 0 et 150 cm dans le parc au Sénégal. Parmi les entrées totales de C (3.0 tC ha⁻¹an⁻¹) dans le dispositif français, 12.6% viennent des litières racinaires. Les racines profondes y contribuent particulièrement puisque 50 à 75% de la biomasse racinaire se trouve sous 20 cm de profondeur. Parmi les entrées de C (0.5 tC ha⁻¹an⁻¹) dans le parc à *F. albida*, 67.3% viennent des litières racinaires, dont 37.7% sous 10 cm de profondeur. La décomposition racinaire a été observée *in situ* avec une méthode innovante (scanners enfouis à différentes profondeurs de sol). Nous montrons que la décomposition racinaire de l'orge débute tôt ; 50% du volume racinaire est déjà perdu au stade floraison. Puis la décomposition du cylindre central, plus récalcitrant, dure 16 mois. Nos observations en conditions contrôlées démontrent le rôle de la disponibilité en nutriments (N et P) sur les mécanismes de *priming effect* dans les horizons profonds. Lors d'entrées de quantités de C équivalentes aux entrées annuelles par les litières racinaires (70 mgC kg_{soil}⁻¹), nous avons mesuré un *priming effect* en profondeur de 85 mgC kg_{soil}⁻¹ en conditions non limitantes en N. Enfin, le bilan C du sol réalisé après 3-5 ans de différenciation des usages de sol estime des entrées de C plus importantes en système agroforestier qu'en culture pure (+0.85 tC ha⁻¹ en considérant la totalité du profil enraciné, principalement grâce au *turnover* aérien des espèces pérennes) et des émissions de CO₂ équivalentes entre les usages de sols (6.7 tC ha⁻¹an⁻¹). Vu l'implication des horizons profonds dans le stockage de C dans le sol des systèmes agroforestiers, leur intégration dans les travaux de modélisation de la dynamique de la matière organique des sols est nécessaire et doit prendre en compte leurs spécificités par rapport aux sols de surface ; cela permettra de préciser le potentiel de séquestration de C dans le sol des systèmes agroforestiers.

Mots clés

Agroforesterie, horizons profonds de sol, méditerranéen, tropical semi-aride, cycles biochimiques, carbone dérivé des litières racinaires