

CENTRE INTERNATIONAL D'ÉTUDES SUPÉRIEURES  
EN SCIENCES AGRONOMIQUES  
(Montpellier SupAgro)

ÉCOLE DOCTORALE  
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement  
(SIBAGHE)

DOCTORAT  
Spécialité : Écosystèmes

Élodie Betencourt

**Interactions entre céréale et légumineuse en association  
et acquisition de phosphore du sol :  
processus rhizosphériques sous-jacents**

Thèse dirigée par Philippe HINSINGER

Soutenue le 2 octobre 2012

Membres du jury :

Sébastien BAROT

Sylvain PELLERIN

Guénaëlle CORRE-HELLOU

Jacques DAVID

Claire JOUANY

Philippe HINSINGER

Directeur de recherches, IRD

Directeur de recherches, INRA

Maître de conférences, ESA Angers

Professeur, Montpellier Supagro

Chargée de recherches, INRA

Directeur de recherches, INRA

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



Je dédie ce manuscrit  
à mon grand père paternel

## RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude a été de préciser l'implication des processus rhizosphériques dans les interactions pour l'acquisition de phosphore (P) entre une céréale et une légumineuse en association. Nous avons proposé comme mécanisme de facilitation l'acidification de la rhizosphère des espèces en association induite par la fixation de N<sub>2</sub> de la légumineuse dans le cas de sol neutres à alcalins. Ainsi, l'étude s'est focalisée sur l'influence des changements de pH induits par les racines. Les effets de la disponibilité initiale en P du sol ainsi que de la distance entre les racines des espèces associées ont également été testés. Les expérimentations ont été menées au champ ainsi qu'en conditions contrôlées. Le blé dur et différentes légumineuses ont été cultivés en culture monospécifique ou en association sur un même sol pour toutes les expérimentations. Le sol neutre utilisé (Luvisol) présentait trois niveaux contrastés de fertilisation phosphatée et provenait des parcelles d'un essai de longue durée. Nous avons pu démontrer que la manipulation des interactions rhizosphériques entre une céréale et une légumineuse en association pouvait être optimisée pour permettre l'augmentation de la disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces associées, et encore plus dans le cas de sols présentant une faible valeur initiale de disponibilité. Les caractéristiques du sol ont eu un rôle clé dans la détermination des processus rhizosphériques impliqués. Dans notre cas, les changements de pH induits par les racines ont permis d'augmenter de façon substantielle la disponibilité en P suite à une acidification, mais aussi à une alcalinisation de la rhizosphère. Ainsi la légumineuse, mais aussi la céréale sont susceptibles de faciliter l'acquisition de l'espèce associée. Les interactions relatives au pH peuvent influencer la disponibilité en P sur une distance de plusieurs millimètres et ainsi améliorer l'acquisition de P des plantes à proximité de l'espèce facilitatrice.

Mots clés : culture associée, facilitation, rhizosphère, disponibilité, phosphore, pH, racine

## ABSTRACT

The aim of the study was to elucidate the implication of rhizospheric processes on plant species interactions for phosphorus (P) acquisition between a cereal and a legume, when intercropped. We proposed that root-induced acidification of the rhizosphere by the intercropped legume due to N<sub>2</sub>-fixation as a mechanism of facilitation in neutral to alkaline soils. Thus, the study focused on root-induced changes of pH. The effects of initial soil P availability and distance between roots of intercropped species were also tested. In order to achieve our goals, experiments in the field and in controlled condition for several cropping devices were conducted. Durum wheat and different legumes were grown as sole crops and intercropped on the same soil for all the experiments. We used a neutral soil (Luvisol) presenting three contrasted fertilization rates from the field of a long-term P fertilizer trial. We demonstrated that cereal-legume can be used to enhance P availability, and even more so in low P soils, through managing rhizospheric interactions to optimize P acquisition of intercropped species. Soil characteristics are also a key factor determining the influence of those rhizospheric processes. In our studied soil root-induced changes of pH substantially enhanced P availability in the rhizosphere either through acidification or alkalization. Thus the legume but also the cereal may facilitate the acquisition of the intercropped species. Interactions involving pH can affect P availability over distance of several millimeters and ultimately enhance P acquisition of plants in the surrounding of the facilitative species.

Key words: intercrop, facilitation, rhizosphere, availability, phosphorus, pH, root

## Remerciements

Je tiens ici à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ces trois années de thèse. La liste des remerciements qui va suivre se veut la plus exhaustive possible mais il n'y aura jamais suffisamment de place pour remercier tout le monde dans le détail, je m'excuse alors d'avance auprès de tous celles ou ceux que j'aurais omis et à qui j'exprime toute ma gratitude.

Je remercie tout d'abord Philippe Hinsinger qui m'a fait confiance dès le début et m'a permis de réaliser ces trois années de thèses qui m'ont enrichie et marquent une période de ma vie que rien ne pourra remplacer. Merci Phillippe de m'avoir donné l'occasion et encouragée à valoriser mes travaux, à enseigner ou encore de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès à l'autre bout du monde ! J'ai également beaucoup apprécié pouvoir donner quelques coups de tarière tôt le matin et presque arriver à apprécier le pâté et vin locaux à gh.... Mais aussi merci d'avoir ouvert les portes de l'UMR Eco&Sols où j'ai rencontré des personnes irremplaçables et avec qui j'ai passé de très très bons moments.

Un grand merci à tout le personnel technique de l'UMR Eco&Sol qui de prêt ou de loin a contribué à la réalisation de cette thèse. Plus particulièrement merci à Didier A pour sa disponibilité, sa bonne humeur et son génie bricoleur sans qui j'aurai eu beaucoup de mal à réaliser un certain nombre de dispositifs expérimentaux (merci notamment pour le petit système D me permettant d'atteindre de ma petite taille les mini-rhizobox au fond de la paillasse !). Merci à Gérard pour son expérience, ses conseils et toutes les discussions sur la faune et la flore ainsi que la chasse à la Truffe ou encore la récolte des olives. Merci encore à Agnès M, Charline, Emilie, Catherine pour leur aide indispensable à la réalisation des différentes expérimentations et leur patience lors des récoltes minutieuses du sol rhizoshérique.

Merci aux étudiants que j'ai encadré, Marek toujours volontaire, autonome et efficace et Hada qui ont permis de faire avancer ces travaux de thèse. Je tiens également à remercier Christina qui m'a fait découvrir le monde des optodes et avec qui les discussions pour la réalisation des dispositifs ont été très enrichissantes. Un remerciement particulier à Philippe Deleporte pour son aide en statistiques qui m'a été d'une aide indispensable.

Je tiens aussi à remercier Joëlle Fustec, Jean Michel Harmand, Xavier Raynaud et Catherine Roumet qui ont apporté leur avis critique et leur soutien au cours de ces trois années de thèse lors des différents comités de thèse.

Merci à mes rapporteurs Sébastien Barot et Sylvain Pellerin qui à la sortie des vacances d'été ont pris le temps de lire de manière exhaustive l'ensemble de ce manuscrit ainsi qu'aux membres du jury Guénaëlle Corre-Hellou, Jacques David et Claire Jouany.

Je tiens également à remercier Farid qui a dû et su gérer à la perfection la partie administrative comme les ordres missions parfois complexes, merci également à Corinne qui a notamment permis à ce manuscrit de voir le jour sous format papier, merci à Hélène et Michelle.

Merci à Jean Luc Chotte Directeur de l'UMR Eco&Sols qui continue à mettre son énergie à faire en sorte que les doctorants s'intègrent, se sentent écoutés et suivis ingrédients indispensables à la vie d'un collectif.

Je tiens à remercier Eric Justes et l'UMR AGIR de Toulouse qui m'ont jeté dans le bain des cultures associées et guidée jusqu'à Montpellier.

Merci à Martine Barraud responsable des études doctorales de Montpellier Supagro qui a réalisé le suivi administratif de ma thèse et je remercie également à l'école doctorale SIBAGHE pour m'avoir fait confiance en m'attribuant une bourse de thèse.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des collaborateurs du projet ANR Systerra PERFCOM avec qui j'ai eu des échanges très constructifs. Cela permet ici de remercier l'ANR qui a contribué au financement de cette thèse.

La réalisation de cette thèse aurait été beaucoup plus difficile sans mes amis. Je n'ai jamais été aussi rapidement intégrée, merci à Ben, Georg qui sont partis trop tôt du labo et de France. Merci à Xiaoyan qui à entre autre pris le grand soin de me guider et m'accompagner à travers Beijing et m'a beaucoup appris. Merci à Rym, Patrice, Christina, Anne Laure, Agnès M, Manon, Marek, Gabrielle, Michaël, Simon. Merci à Agnès R pour sa disponibilité, les trajets quotidiens après une journée bien remplies et toutes les

discussions qui avant et pendant la finalisation de cette thèse m'ont été indispensables. Merci également à Fanny pour les sorties rando, piscine, cinéma et tous les petits moments agréables.

Merci à Simon mon frère que j'aurais aimé avoir plus souvent en stage sur Montpellier durant ma thèse. Merci à mes parents qui de loin m'ont toujours eu confiance en moi, supportée, encouragée à avancer. Merci à ma belle famille qui m'a notamment rendue dépendante à la formule « cours de natation et repas du dimanche » indispensable pour le moral. Merci à Diane de m'avoir empêché de perdre pied dans l'actualité du cinéma, des séries TV et de la musique.

Pour boucler la boucle, merci à Philippe de son choix de bureau en début thèse qui a changé ma vie. Merci Nicolas pour qui aucuns mots ne permet d'exprimer ce que tu m'as apporté, apporte et apportera. Merci d'avoir su me supporter et me redonner courage lors de différents passages à vide. Merci d'avoir été présent à l'autre bout du téléphone le samedi et dimanche matin entre 6h30 et 9h (et tous les autres à des heures peut être plus raisonnables). Même si tu ne veux pas l'entendre, sans toi je ne serais jamais arrivée où je suis.

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE.</b> Contexte et enjeux globaux.....	1
<b>CHAPITRE I.</b> Synthèse bibliographique.....	6
I. Acquisition d'un nutriment : concepts et mécanismes majeurs.....	6
I.1. Disponibilité.....	6
I.2. Biodisponibilité.....	7
I.3. Transport des ions en solution.....	7
I.4. Modification de la disponibilité dans la rhizosphère.....	8
I.4.1. Modification des propriétés physiques.....	8
I.4.2. Modification des propriétés chimiques.....	9
I.4.3. Modification des propriétés biologiques.....	14
I.5. Géométrie de la rhizosphère.....	16
II. Interactions entre espèces pour l'acquisition d'un nutriment: concepts et mécanismes..	20
II.1. Lien diversité-productivité/fonctionnement des écosystèmes.....	21
II.2. Interactions entre plantes pour une ressource : interactions racinaires pour l'acquisition de nutriments.....	21
II.3. Partage de la ressource en nutriment et compétition.....	23
II.3.1. Disponibilité d'un nutriment et répartition homogène ou hétérogène.....	23
II.3.2. Disponibilité d'un nutriment et diffusion.....	24
II.3.3. Disponibilité d'un nutriment, diffusion et modèle de prélèvement.....	25
II.4. Partage de la ressource en nutriment et facilitation.....	27
III. Interactions entre espèces pour l'acquisition des nutriments : diversité des traits racinaires.....	31
III.1. Concepts.....	31
III.1.1. Diversité des traits racinaires et acquisition d'un nutriment entre espèces..	31
III.1.2. Diversité des traits racinaires et plasticité.....	31
III.2. Traits racinaires et occupation de l'espace.....	33
III.3. Traits racinaires et processus rhizosphériques.....	37
III.4. Traits racinaires et dynamique temporelle.....	39
IV. Influence de la disponibilité en nutriments sur les interactions.....	40
IV.1. Relations disponibilité-interactions : hypothèses.....	40
IV.2. Modification de la géométrie de la rhizosphère.....	40
IV.2.1. Modification de la structure et de la morphologie racinaire.....	41
IV.2.2. Modification des processus rhizosphériques.....	44
IV.3. Influence de la disponibilité sur l'acquisition d'un nutriment dans l'association d'espèces.....	48
V. Associations céréale-légumineuse : interactions et facilitation de l'acquisition de P.....	49
V.1. What makes P so special?.....	51
V.2. Better exploiting plant functional diversity in crop-based agroecosystems : the case of cereal-legume intercrops.....	52



V.3. Complementarity in space, time and soil P pools.....	53
V.4. Direct positive interactions.....	54
V.5. Microbially mediated rhizosphere interactions.....	58
V.6. Conclusion.....	61
<b>CHAPITRE II. Objectifs et stratégie de recherche.....</b>	<b>82</b>
I. Objectifs de recherche.....	82
II. Stratégie de recherche.....	84
II.1. Analyse des interactions entre espèces/choix des ratios de densité.....	84
II.1.1. Les designs de type substitutif.....	85
II.1.2. Les dispositifs de type additif.....	86
II.2. Choix des dispositifs de culture et échantillonnage de la rhizosphère.....	87
II.2.1. Choix des dispositifs de culture.....	87
II.2.2. Échantillonnage de la rhizosphère.....	87
II.3. Choix des espèces et cultivars.....	89
II.3.1. Choix du blé dur.....	89
II.3.2. Choix des cultivars de blé dur.....	89
II.3.3. Choix des espèces de légumineuse.....	90
II.3.4. Choix du pois chiche et des cultivars.....	90
II.4. Choix du sol.....	90
II.5. Choix du stade phénologique de récolte.....	91
II.6. Mesures sol et plante.....	91
II.6.1. Mesure du P disponible du sol.....	92
II.6.2. Mesure des variations de pH.....	92
II.6.3. Mesure de la fixation symbiotique de N <sub>2</sub> .....	93
<b>CHAPITRE III. Interactions entre céréale et légumineuse en culture associée et acquisition de phosphore : influence de la disponibilité en P du sol.....</b>	<b>95</b>
I. Enhanced P availability in the rhizosphere of cereal-legume intercrops: evidence from a long term P fertilizer trial.....	98
I.1. Introduction.....	99
I.2. Materials and methods.....	100
I.2.1. Field site and soil.....	100
I.2.2. Experimental design.....	101
I.2.3. Plant sampling and measurements.....	102
I.2.4. Soil/rhizosphere sampling and measurements.....	102
I.2.5. Statistical analyses.....	103
I.3. Results.....	104
I.3.1. Crop growth and phosphorus use.....	104
I.3.2. Phosphorus availability in the rhizosphere and bulk soil.....	107
I.4. Discussion.....	112

I.4.1. Effect of crops on P availability in the rhizosphere.....	112
I.4.2. Effect of plant species on P availability in the rhizosphere.....	113
I.4.3. Effect of intercropping on P availability in the rhizosphere.....	114
I.4.4. Effect of P availability on plant-plant interactions in the rhizosphere.....	115
I.4.5. Effect of species interactions on crop growth and phosphorus use.....	115
I.4.6. Effect of P availability on plant-plant interactions, phosphorus use and growth.....	117
I.5. Conclusions.....	118
Appendix.....	125
II. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil.....	126
II.1. Introduction.....	127
II.2. Materials and methods.....	128
II.2.1. Experimental set-up.....	128
II.2.2. Soil properties.....	129
II.2.3. Plant growth.....	129
II.2.4. Soil/rhizosphere sampling and measurements.....	130
II.2.5. Plant sampling and measurements.....	131
II.2.6. Calculations.....	131
II.2.7. Statistical analyses.....	131
II.3. Results.....	132
II.3.1. Plant growth.....	132
II.3.2. Rhizosphere P availability.....	134
II.3.3. Rhizosphere pH.....	135
II.4. Discussion.....	136
II.4.1. Increased P availability in the rhizosphere.....	136
II.4.2. Changes in pH in the rhizosphere.....	138
II.4.3. Root-induced processes altering P availability.....	139
II.4.4. Phosphorus uptake and plant growth.....	140
II.5. Conclusions.....	141
Appendix.....	147
<b>CHAPITRE IV. Interactions entre blé dur et pois chiche en culture associée et acquisition de phosphore : influence de la fixation de N<sub>2</sub>.....</b>	<b>148</b>
I. Soil characteristics control positive interactions for phosphorus in soil between durum wheat and chickpea in intercrop.....	149
I.1. Introduction.....	150
I.2. Materials and methods.....	152
I.2.1. Experimental set-up.....	152
I.2.2. Mini-rhizobox device.....	152
I.2.3. Soil properties.....	153
I.2.4. Plant growth.....	154

I.2.5. Plant and soil analyses.....	155
I.2.6. Statistical analyses.....	155
I.3. Results.....	155
I.3.1. Plant growth.....	155
I.3.2. Rhizosphere pH.....	159
I.3.3. Rhizosphere P availability.....	160
I.3.4. P availability relative to pH in the rhizosphere.....	161
I.4. Discussion.....	162
I.4.1. Changes of P availability in the rhizosphere.....	162
I.4.2. Changes of pH in the rhizosphere.....	164
I.4.3. Relationship between root-induced changes of pH and P availability.....	165
I.4.4. Plant growth and nutrition.....	166
I.5. Conclusions.....	167
Appendix.....	174

**CHAPITRE V. Interactions entre blé dur et pois chiche en culture associée et acquisition de phosphore : influence de la proximité des racines.....** 175

I. How far root-induced pH changes can extend the rhizospheres of durum wheat and chickpea in intercrop and influence interactions for soil phosphorus acquisition?.....	177
I.1. Introduction.....	178
I.2. Material and methods.....	180
I.2.1. Experimental set-up.....	180
I.2.2. Mini-rhizobox device.....	181
I.2.3. Soil properties.....	181
I.2.4. Plant growth.....	182
I.2.5. Plant and soil harvest.....	183
I.2.6. Plant and soil analyses.....	183
I.2.7. Statistical analyses.....	184
I.3. Results.....	184
I.3.1. Plant growth.....	184
I.3.2. Phosphorus concentration profiles in soil.....	186
I.3.3. Profiles of pH in the soil.....	187
I.3.4. Phosphorus availability and pH in the soil.....	188
I.4. Discussion.....	189
I.4.1. Decreased P availability in the rhizosphere.....	189
I.4.2. Root-induced decrease in pH in the rhizosphere.....	191
I.4.3. Root-induced processes influencing P availability.....	192
I.4.4. Plant growth.....	193
I.5. Conclusions.....	193

**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....** 199

I. Discussion générale et conclusions.....	200
--	-----

I.1. Interactions pour l'acquisition de P entre espèces associées : implication de l'augmentation de la disponibilité de P dans la rhizosphère.....	200
I.2. Implication des modifications de pH induites par les racines dans les interactions pour l'acquisition de P.....	202
I.3. Effet du degré de superposition des rhizosphères des deux espèces végétales associées sur les interactions pour l'acquisition de P.....	205
I.4. Relations NxP et effet de la disponibilité en P sur les interactions entre espèces associées pour l'acquisition de P.....	207
II. Perspectives.....	209
II.1. Relations entre effet des interactions entre espèces sur la disponibilité en P et sur son acquisition.....	209
II.2. Amélioration de l'acquisition de P: hiérarchisation des mécanismes et influence de la facilitation.....	211
II.3. Valorisation de la diversité génotypique/fonctionnelle en agriculture : potentiel vis à vis du P.....	214
<b>ANNEXES</b> .....	<b>222</b>

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### Contexte et enjeux globaux

Parmi les nutriments indispensables à la croissance des plantes le phosphore (P) est considéré comme un facteur limitant dans de nombreux sols, en particulier dans les régions tropicales dominées par des sols âgés et altérés (Ragothama, 1999 ; Vance, 2001 ; Vitousek et al., 2010). Contrairement aux ions de l'azote (N), les ions phosphates prélevés par la plante sont en effet sujets à de nombreuses interactions avec les constituants du sol et sont fortement retenus par la phase solide (Ragothama, 1999 ; Hinsinger, 2001). La concentration en ions phosphates dans la solution du sol peut atteindre jusqu'à 10  $\mu\text{M}$ , voire quelques dizaines de  $\mu\text{M}$ , pour les valeurs les plus élevées mais avoisine des concentrations de l'ordre de 1  $\mu\text{M}$  dans la plupart des sols, alors que dans le cas de l'azote la concentration dans les sols agricoles en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) est de l'ordre de la centaine de micromolaires et du millimolaire pour les ions nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (Ragothama, 1999 ; Miller et Cramer, 2005). Il est ainsi estimé que 30 à 40% des sols cultivés présenteraient des valeurs de disponibilité (*i.e.* la quantité d'une ressource potentiellement accessible aux plantes) en P ne permettant pas d'assurer une production optimale (Vance, 2001).

La principale pratique agricole employée pour maintenir la production est l'apport de fertilisants phosphatés issus majoritairement de roches phosphatées. Depuis les années 1960 l'usage massif de fertilisants N et P a permis d'augmenter la production mondiale de céréales de manière significative, passant de  $8.7 \cdot 10^2 \text{ Tg an}^{-1}$  en 1961 à  $2.4 \cdot 10^3$  en 2010 (FAO stat). Ce triplement de la production a été associé à la multiplication de la consommation de fertilisants N et P par 9 et 4 respectivement (FAO stat) traduisant une diminution de l'efficacité d'utilisation des nutriments par les cultures. Dans le cas du P, la principale stratégie utilisée pour sécuriser les rendements a ainsi été longtemps d'apporter une quantité de fertilisants supérieure aux besoins des cultures en raison de la difficulté d'évaluer la quantité de P réellement accessible aux plantes (Sharpley et al., 1994 ; Delgado et Scalenghe, 2008). Tilman et al. (2001) prédisent que si les pratiques agricoles actuelles sont maintenues, la consommation mondiale de fertilisants phosphatés évaluée à  $34.3 \text{ Tg an}^{-1}$  en 2000 pour une population de 6 milliards atteigne en 2050  $83.7 \text{ Tg an}^{-1}$  en moyenne pour une population évaluée à 9 milliards. Ce scénario soulève deux problèmes majeurs d'ordre environnemental et socio-économique : la pollution des écosystèmes aquatiques et la raréfaction de la principale ressource utilisée pour la synthèse de fertilisants phosphatés. La fertilisation phosphatée en agriculture est considérée comme la principale responsable des phénomènes d'eutrophisation des écosystèmes lacustres et participe à l'eutrophisation des écosystèmes côtiers (Schindler, 1977 ; Dowell et al., 2001 ; Delgado et Scalenghe, 2008). Bouwman et al. (2009) estiment que 10% du P apporté par l'activité agricole est perdu par érosion dans les écosystèmes aquatiques, estimant ainsi à  $2\text{-}3 \text{ Tg an}^{-1}$  pour la période de

1970 à 2000 approchant ainsi l'évaluation proposée par Liu et al. (2008). Dans le meilleur des scénarios proposé par le Millenium Ecosystem Assessment (2005) utilisé dans cette étude la consommation de fertilisants P estimée entre 29 à 46 Tg an<sup>-1</sup> équivaldrait ainsi à des valeurs d'érosion de 3 à 5 Tg an<sup>-1</sup> correspondant à une multiplication par 30% des flux de P vers les écosystèmes aquatiques. La production de fertilisants phosphatés repose essentiellement sur l'exploitation de gisements de phosphates naturels qui constituent une ressource non renouvelable. Tout comme le pétrole il est projeté que l'extraction de roches phosphatées de qualité à un prix acceptable atteigne un pic avant l'épuisement de la ressource. L'évaluation de la proximité de ces deux évènements varie suivant les auteurs qui prévoient l'épuisement total des ressources de quelques dizaines à quelques centaines d'années (Cordell et al., 2009 ; Dawson et Hilton, 2011).

Alors qu'il apparaît nécessaire de maintenir une production agricole suffisante pour répondre aux besoins futurs, il est maintenant admis que le modèle proposé jusqu'à présent reposant sur l'utilisation massive de fertilisants menace l'équilibre du cycle des nutriments et n'est pas une stratégie durable. Cette situation a fait émerger un nouveau paradigme correspondant à l'intensification de la production agricole tout en diminuant l'apport de fertilisants, ou intensification écologique (Casseman, 1999 ; Tilman et al., 2002 ; Vance, 2003 ; Griffon, 2006). Autrement dit de nouvelles solutions sont nécessaires pour améliorer l'exploitation des ressources en P du sol par les cultures, ce qui nécessite l'augmentation des capacités d'acquisition de la ressource ainsi que de son utilisation pour la production de biomasse (Lynch, 2007; Richardson et al., 2011). Plusieurs options ont ainsi été proposées : (i) la gestion efficace de l'apport d'intrants ainsi que la sélection de cultivars et/ou (ii) la conception de systèmes de cultures adaptés aux systèmes à faible niveau d'intrants capables de valoriser les ressources en P du sol. Une des solutions proposée est l'introduction d'une diversité spécifique au sein des agroécosystèmes par le développement des cultures associées (Malézieux et al., 2009). Ces dernières peuvent être définies comme la culture simultanée de deux espèces sur une même parcelle (Willey, 1979 ; Ofori and Stern, 1987). Il est supposé que l'association d'espèces puisse permettre une amélioration de l'acquisition d'une ressource (eau, lumière, nutriment) par deux mécanismes généraux : la différenciation de l'acquisition de la ressource et l'augmentation de sa disponibilité suite à la modification de l'environnement par les espèces associées (Fridley, 2001 ; Loreau et Hector, 2001). Le potentiel bénéfique de l'association d'espèces par rapport aux cultures monospécifiques serait d'autant plus intéressant dans le cas où la disponibilité d'une ressource est faible (Maestre et al., 2009), ce qui ferait des cultures associées des systèmes performants à bas niveau d'intrants. L'association céréale-légumineuse est le modèle dominant en raison de ses capacités d'amélioration de l'acquisition de N, mais la mise en évidence d'un effet similaire pour le P a ouvert un nouveau champ de recherches (Li et al., 2007). Alors que les mécanismes impliqués dans l'acquisition de N par les espèces en association sont actuellement identifiés ils restent encore inconnus dans le cas de l'acquisition de P. Il est maintenant admis que les plantes ont la capacité de modifier la disponibilité des nutriments dans le volume de sol entourant leurs racines (*i.e.* la rhizosphère) non pas uniquement par

leur prélèvement mais aussi par d'autres processus induits par les racines. La quantité de nutriments prélevée est ainsi déterminée par la disponibilité de la ressource et par la capacité d'acquisition de la plante. Il existe actuellement une littérature abondante relative aux caractéristiques racinaires permettant l'optimisation de l'exploration et l'exploitation du volume de sol potentiellement impliqué dans l'acquisition de P pour de faibles valeurs de disponibilité en P de la rhizosphère. Néanmoins l'influence respective de ces traits racinaires, leur interaction tout comme leur implication dans le partage du P entre espèces associées restent encore méconnus (Lynch, 2007 ; Hinsinger et al., 2011\* ; Richardson et al., 2011). De plus, bien que les caractéristiques du sol soient reconnues pour influencer l'effet des traits racinaires sur la disponibilité en P et ses conséquences sur sa biodisponibilité, les mécanismes impliqués restent encore difficiles à évaluer (Raynaud et Leadley, 2008 ; Hinsinger et al., 2011\*).

Dans ce contexte, l'objectif général de ma thèse a donc été la compréhension des interactions entre espèces pour l'acquisition de P dans le cas d'associations céréale-légumineuse. Plus précisément il s'agit de comprendre les processus rhizosphériques impliqués dans le partage de P et l'augmentation de son acquisition observée lors de la comparaison de l'association d'espèces à leur culture monospécifique respective.

La démarche employée pour répondre à cet objectif repose sur une approche expérimentale allant de la parcelle d'essai agronomique jusqu'à des dispositifs en conditions contrôlées au laboratoire. Ces approches complémentaires ont été mises en œuvre afin d'une part d'intégrer l'ensemble des interactions abiotiques et biotiques du système et d'autre part de préciser les mécanismes en contraignant un maximum de variables pour se restreindre à un nombre plus limité de processus. À terme, la connaissance de ces mécanismes doit permettre la gestion des interactions entre espèces afin d'optimiser l'acquisition du P et la productivité de tels agroécosystèmes.

\*L'article Hinsinger et al. (2011) publié dans *Plant Physiology* est inclus dans ce manuscrit et correspond au paragraphe V de la synthèse bibliographique.

### Références bibliographiques

- Bouwman, A.F., Beusen A.H.W., Billen G. 2009. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970–2050. *Global Biogeochemical Cycles* 23: 1-16.
- Cassman, K.G. 1999. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceeding of National Academy of Science of the USA* 96, 5952-5959.
- Cordell, D., Drangert J.O., White S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292–305.
- Dawson, C.J., Hilton J. 2011. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus, *Food Policy* 36:14-22.

- Delgado, A., Scalenghe, R., 2008. Aspects of phosphorus transfer from soils in Europe. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171:552–575.
- Maestre, F.T., Callaway R.M., Valladares F., Lortie C.J. 2009. Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology*, 97:199-205.
- Malézieux, E., Crozat Y., Dupraz C., Laurans M., Makowski D., Ozier-Lafontaine H., Rapidel, B., de Tourdonnet S., Valantin-Morison M. 2009. Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 29:43-62.
- Mc Dowell, R.W., Sharpley A.N., Condon L.M., Haygarth P.M., Brookes P.C. 2001. Processes controlling soil phosphorus release to runoff and implications for agricultural management *Plant and Soil* 59:269–284.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2005. *Ecosystems and Human Well-Being: Scenarios* (Island Press, Washington, DC).
- Griffon, M. 2006. *Nourrir la planète*. Odile Jacob Sciences 456pp.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173–195.
- Hinsinger, P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J., Tang, X., Zhang F. 2011a. P for two, sharing a scarce resource e soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11192-11196.
- Liu, Y., Villalba G., Ayres R.U, Schroder H. 2008. Global Phosphorus Flows and Environmental impacts from a Consumption Perspective. *Journal of Industrial Ecology* 12:229-247.
- Lynch, J. P. 2007. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* 55:493-512.
- Mc Dowell, R.W., Sharpley A.N., Condon L.M., Haygarth P.M., Brookes P.C. 2001. Processes controlling soil phosphorus release to runoff and implications for agricultural management. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 59:269–284.
- Miller, A.J., Cramer M.D. 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274:1-36.
- Ofori, F., Stern W.R. 1987. Cereal-legume intercropping systems. *Advance in Agronomy* 41:41-90.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-693.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P.W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. *The American Naturalist* 171:44-59.
- Richardson, A. E., Lynch J. P., Ryan P. R., Delhaize E., Smith F. A., Smith S. E., Harvey P. R., Ryan M. H., Veneklaas E. J., Lambers H., Oberson A., Culvenor R. A., Simpson R. J. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil* 349:121-156.
- Schindler, D.W. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes: Natural mechanisms compensate for deficiencies of nitrogen and carbon in eutrophied lakes. *Science* 195:260–262.



- Sharpley, A.N., Chapra S.C., Wedepohl R., Sims J.T., Daniel T.C. 1994. Managing agricultural phosphorus for protection of surface waters-Issues and options. *Journal of environmental quality* 23:437-451.
- Tilman, D., Fargione J., D'Antonio W.C., Dobson A., Howarth R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D., Swackhamer, D., 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292:281-284.
- Tilman, D., Kenneth G., Cassman K.G., Pamela A., Matson P.A., Naylor R., Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671-677.
- Vance, C., 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiology* 127:390-397.
- Vance, C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157:423-447.
- Vitousek, P.M., Porder M., Houlton B.J., Chadwick O.A. 2010. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen–phosphorus interactions. *Ecological Applications* 20:5-15.
- Willey, R. 1979. Intercropping-its importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstracts* 32:1-10.

## CHAPITRE I

### Synthèse bibliographique

#### I. Acquisition d'un nutriment : concepts et mécanismes majeurs

L'acquisition d'un nutriment par les plantes correspond à l'ensemble des processus mis en place aboutissant à son prélèvement au niveau des racines, y compris ceux qui se produisent en amont du processus ultime d'absorption (Clarkson, 1985 ; Hinsinger, 1998). Afin de comprendre les mécanismes d'acquisition d'un nutriment par une espèce, il est nécessaire de présenter les concepts et les mécanismes sous-jacents. Nos exemples concerneront essentiellement l'azote (N) et le phosphore (P), qui sont les deux nutriments les plus étudiés en raison de leur effet majeur sur la croissance des plantes.

##### I.1. Disponibilité

La disponibilité d'un nutriment dans le sol correspond à la quantité présente dans la solution du sol immédiatement accessible à l'absorption par la plante, ainsi qu'à la fraction susceptible de passer facilement en solution. Cette dernière ne représente qu'une fraction de la quantité totale présente dans le sol (Harmsen, 2007), dont la proportion varie considérablement d'un nutriment à l'autre. Les nutriments sont essentiellement prélevés par la plante sous forme d'ions minéraux bien que dans le cas de N, il est connu que certaines molécules organiques de faible poids moléculaire telles que les acides aminés et certains peptides peuvent jouer un rôle dans le prélèvement (Miller et Cramer, 2005 ; Rentsch et al., 2007 ; Näshlöm et al., 2009 ; Richardson et al., 2009). Les nutriments dans le sol se trouvent associés à des phases minérales ou à la matière organique du sol, respectivement sous forme inorganique et organique. La spéciation aqueuse des ions inorganiques est plus ou moins complexe suivant les nutriments et dépend des caractéristiques biogéochimiques du sol. Dans le cas du P inorganique, la spéciation en solution est essentiellement gouvernée par le pH ; ainsi dans la gamme de pH de la plupart des sols (pH = 3 à pH = 8.5) les ions dihydrogénophosphate  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et hydrogénophosphate  $\text{HPO}_4^{2-}$  sont les 2 principales espèces chimiques. La spéciation des formes inorganiques de N est dominée par les espèces chimiques ammonium  $\text{NH}_4^+$  et nitrate  $\text{NO}_3^-$  dont la transformation d'une forme à l'autre est régulée par le potentiel d'oxydo-réduction et pour une large partie par les activités de microorganismes du sol. La nature des ions N présents en solution est de fait influencée par le pH, la température, la  $p\text{O}_2$  et l'humidité du sol. De manière générale la répartition des espèces en solution et leur concentration sont déterminées par des processus biogéochimiques se déroulant à l'interface sol/solution : adsorption/désorption, précipitation/dissolution et minéralisation/immobilisation. Ces processus sont déterminés par les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol.

## I.2. Biodisponibilité

La biodisponibilité d'un nutriment correspond à la quantité effectivement prélevée par un organisme. Cette quantité par définition varie, selon le sol considéré, le temps d'exposition à ce sol ainsi que selon l'organisme considéré (*i.e.* génotype) (Harmsen, 2007). Les organismes par leur activité influencent ainsi la disponibilité en nutriment dans leur environnement immédiat correspondant selon Harmsen (2007) à la zone bio-influencée. Dans le cas des plantes elle correspond à la zone entourant les racines affectée par l'activité des racines ou rhizosphère (Darrah, 1993 ; Hinsinger, 1998). Le sol non affecté par les racines sera par la suite désigné comme sol non rhizosphérique (*i.e.* « bulk soil »). La biodisponibilité a longtemps été attribuée uniquement à l'absorption par la racine et à la capacité du sol à réalimenter la solution du sol par différents processus biogéochimiques. Il est actuellement admis qu'en plus de l'absorption, les plantes ont la capacité d'influencer la disponibilité d'un nutriment par la modification des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol environnant les racines (Hinsinger et al., 2005). La biodisponibilité d'un nutriment dépend des propriétés du sol déterminant la quantité du nutriment dans la solution du sol ainsi que de la capacité d'acquisition de ce nutriment par la plante. L'acquisition d'un nutriment est influencée à la fois par les caractéristiques des racines qui déterminent l'accès à la ressource et les modifications de sa disponibilité, soit respectivement l'exploration et l'exploitation de cette ressource (Darrah, 1993 ; Hinsinger, 2005 ; Rengel et Marschner, 2005).

## I.3. Transport des ions en solution

Le transport des ions en solution vers la racine dépend de sa concentration en solution déterminée par les caractéristiques du sol et de l'ion. Il existe deux grands types de transports : l'advection ou « mass flow » et la diffusion. L'advection concerne le transport des ions en solution associé aux flux d'eau vers la racine, qui est lui-même déterminé par la transpiration de la plante. Lorsque la quantité de l'ion transporté ainsi vers les racines ne permet pas de couvrir les besoins de la plante, un gradient de concentration se met en place avec une valeur plus faible à la surface de la racine suite à l'activité de prélèvement. Dans ce cas de figure le transport vers la surface de la racine est alors gouverné par la diffusion. Les nutriments sont caractérisés par un coefficient de diffusion dans le sol ci-après désigné par coefficient de diffusion apparent. Il reflète la réactivité des ions avec les constituants du sol et est déterminé par les caractéristiques du nutriment et du sol dont son contenu en eau (Barber, 1995 ; Raynaud et al., 2008). La quantité de nutriments transportée vers les racines (*i.e.* le flux de diffusion) dans la solution est aussi dépendante de la capacité du sol à réalimenter la solution en nutriments ou pouvoir tampon (Nye, 1966). L'établissement de gradients de concentration autour des racines peut être modélisé par des profils de diffusion représentant la concentration d'un nutriment en fonction de la distance à la surface de la racine.

Les ions phosphates sont caractérisés par une très forte réactivité avec les constituants du sol leur concentration dans la solution du sol est ainsi très faible de l'ordre de 0.1 à 10  $\mu\text{M}$  et leur transport se fait donc par diffusion (Hinsinger, 2001). Dans le cas de N, les ions  $\text{NH}_4^+$

et les acides aminés présentent également une grande affinité pour les phases solides et sont ainsi transportés principalement par diffusion. En comparaison, les concentrations en ions  $\text{NO}_3^-$  peuvent atteindre plusieurs millimoles il est ainsi admis que l'advection couvre une bonne partie des flux de N vers la surface des racines (Miller et Cramer, 2005). Barber, (1984) a ainsi évalué pour du maïs (*Zea mays* L.) cultivé dans un sol fertilisé, que la part de l'azote prélevée transportée par advection était quatre fois supérieure à celle transportée par diffusion. La solution présentait alors de fortes concentrations en  $\text{NO}_3^-$  le principal moteur du transport est la diffusion. Le transport par diffusion est ainsi estimé avoir un rôle déterminant dans le prélèvement des nutriments, en particulier dans le cas de nutriments peu mobiles et/ou de sols présentant de faibles valeurs de disponibilité (Barber, 1995 ; Craine et al., 2005 ; Hinsinger et al., 2011).

#### **I.4. Modification de la disponibilité dans la rhizosphère**

La rhizosphère est définie comme le volume de sol entourant les racines qui est affecté par l'activité racinaire (Darrah, 1993 ; Hinsinger, 1998). Celle-ci induit des modifications des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol qui affectent les processus biogéochimiques à l'interface sol/solution régulant ainsi la disponibilité des nutriments (Gregory, 2006 ; Hinsinger et al., 2009). Il est ainsi maintenant admis que la disponibilité dans la rhizosphère est modifiée par d'autres processus rhizosphériques que le prélèvement. Les modifications de disponibilité des nutriments sont induites directement par les racines ou, indirectement, via la stimulation des microorganismes (Dakora et Phillips, 2002 ; Hinsinger et al., 2005 ; Richardson et al., 2009). L'acquisition d'un nutriment dépend ainsi de l'effet de l'ensemble des processus rhizosphériques sur la disponibilité en P dans la rhizosphère. Les caractéristiques de ces processus rhizosphériques sont reconnues pour varier selon les espèces et les géotypes présentant des capacités d'acquisition contrastées (Rengel, 2002a ; Rengel et Marschner, 2005). L'influence des concentrations en nutriments dans la solution du sol et/ou l'état nutritionnel des plantes sur les caractéristiques de ces processus sera développée dans le paragraphe IV.

##### **I.4.1. Modification des propriétés physiques**

Les modifications des propriétés physiques du sol dans la rhizosphère sont attribuées notamment à la croissance racinaire, à la présence de polysaccharides (*i.e.* mucilage) exsudés par les racines et aux transferts d'eau (Hinsinger et al., 2005 ; Whalley et al., 2005). Il a été mis en évidence que la présence de racines augmentait la cohésion des agrégats du sol en comparaison du « bulk soil » (Hinsinger et al., 2009). Des études ont mis en évidence une augmentation de la densité et une diminution de la porosité dans la rhizosphère (Guidi et al., 1985 ; Dexter et al. 1987 ; Czarnes et al., 1999) ou encore une variation de la taille et de la forme des pores (Whalley et al., 2005). Ces modifications ont été attribuées à un ensemble de facteurs biophysiques comme la présence de poils racinaires, d'hyphes mycéliens (Kabir et Koide, 2000 ; Caravaca et al., 2005 ; Moreno-Espindola et al., 2007), de mucilage d'origine racinaire et parfois microbienne (Morel et al., 1991 ; Watt et al., 1993 ;

Czarnes et al., 2000). Un exemple significatif est la formation de gainages des racines (« rhizosheaths ») observés chez différentes espèces et en particulier chez les graminées présenté sur la figure 1.1 (Hinsinger et al., 2009). Les paramètres physiques du sol dans la rhizosphère sont influencés par les transferts d'eau qui les modifient en retour. Le développement de techniques d'imagerie (*e.g.* tomographie, radiographie par neutron ou rayons X, IRM) ont permis de préciser les transferts d'eau entre la rhizosphère et le sol « bulk soil ». Les résultats sont contrastés montrant à la fois une augmentation du contenu en eau dans la rhizosphère, une diminution ou pas de changement suivant la localisation le long du système racinaire (Esser et al., 2010 ; Moradi et al. 2011). La production de mucilage dans la rhizosphère a également été proposée comme facteur intervenant dans la modification des propriétés hydrauliques du sol. Le mucilage est composé de polysaccharides auxquels sont associés des surfactants phospholipidiques qui sont reconnus pour influencer la viscosité de la solution, et la tension de surface des constituants du sol (Young, 1995 ; Czarnes et al., 2000 ; Read et al., 2003 ; Carminati et al., 2010). Bien que ces modifications des paramètres physiques dans la rhizosphère soient considérées comme un facteur potentiellement important peu d'études ont tenté d'évaluer leur influence sur la disponibilité des nutriments (Gaume et al., 2001 ; Read et al., 2003 ; Dunbabin et al., 2006 ; Ma et al., 2011).



**Figure 1.1.** Rhizosheaths formé autour de racines de *Lyginia barbata* R.Br. D'après Hinsinger et al., (2009)

## I.4.2. Modification des propriétés chimiques

### I.4.2.1. Modifications de la $pO_2$ et de la $pCO_2$

La  $pO_2$  dans les sols est dépendante du contenu en eau mais reste principalement déterminée dans la rhizosphère par la respiration des racines ainsi que des microorganismes. La respiration peut induire une diminution de  $pO_2$  et une augmentation de  $pCO_2$  importantes dans la rhizosphère comme modélisé par Bidel et al. (2001). Ces variations de  $pO_2$  dans la rhizosphère sont peu documentées, l'essentiel des publications disponibles sont relatives aux espèces de milieux hypoxiques tel que le riz (*Oryza sativa* L.) et autres espèces de milieux humides. Les valeurs de  $pO_2$  dans la rhizosphère peuvent varier de celle de l'atmosphère ambiante à quasiment zéro, selon l'activité des racines et les paramètres biotiques et abiotiques du milieu. Revsbech et al (1999), ont ainsi observé chez le riz une  $pO_2$  équivalente à 20% de l'atmosphère à la surface des racines et une valeur nulle à une distance 0.4 mm, réduite à 0.15 mm dans le cas des racines fines. La  $pO_2$  influence la disponibilité des nutriments directement *via* l'établissement du potentiel d'oxydo-réduction

mais aussi indirectement *via* la stimulation de l'activité des microorganismes (Brune et al., 2000 ; Kirk, 2003 ; Bravin et al., 2008 ; Hinsinger et al., 2009). La  $pO_2$  intervient également dans les modifications de pH dans la rhizosphère mais la quantification de son influence reste encore peu documentée (Hinsinger et al., 2003).

Les variations de  $pO_2$  et de potentiel d'oxydo-réduction et leur influence sur la disponibilité des nutriments ont particulièrement été étudiées dans le cas des plantes de milieux humides qui ont la capacité de maintenir des valeurs élevées dans leur rhizosphère (Kirk et al., 1995 ; Chabbi et al., 2000 ; Blossfeld et al., 2011). La  $pO_2$  intervient aussi dans la régulation de l'activité des microorganismes dans la rhizosphère qui déterminent la réaction de nitrification/dénitrification (Brune et al., 2000 ; Khalil et al., 2004), et dans la vitesse de décomposition des exsudats racinaires riches en N (de Graaff et al., 2009). La  $pCO_2$  peut également influencer la disponibilité de nutriments via son effet sur le pH. Le  $CO_2$  forme rapidement un ion  $H_2CO_3$  qui est un acide faible ( $pK_{H_2CO_3/HCO_3^-} = 6.36$ ), lorsqu'il est transféré dans la phase aqueuse. Une augmentation de la  $pCO_2$  induit ainsi une diminution de pH dans la plupart des sols excepté les sols acides où  $H_2CO_3$  n'est pas dissocié (Lindsay, 1979). Il est aussi évoqué un couplage entre le potentiel d'oxydo-réduction et le pH, en particulier dans le changement de niveau d'oxydation du fer (Fe), du manganèse (Mn) et de N qui implique aussi la consommation ou la production de  $H^+$  (Hinsinger et al., 2003). Dans le cas de N, la réaction est réalisée par l'intermédiaire de microorganismes et correspond à la réaction de nitrification/dénitrification précédemment évoquée.

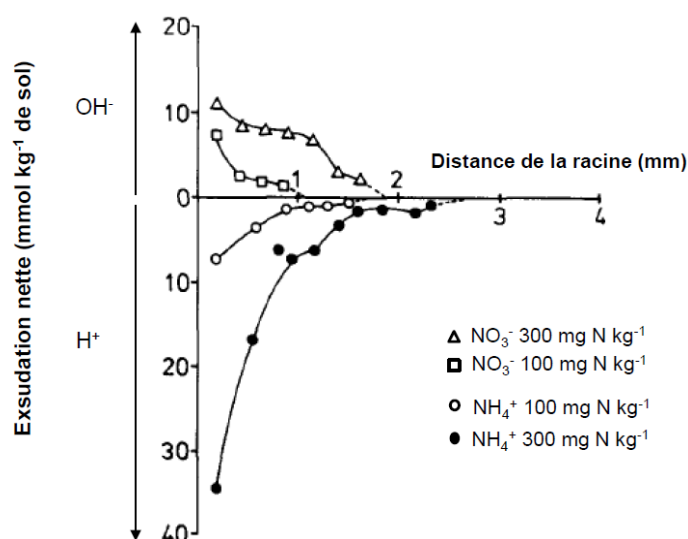
#### 1.4.2.2. Exsudation d'anions organiques

Les anions organiques sont aussi désignés sous les termes carboxylates ou encore acides organiques. D'un point de vue conceptuel nous garderons le terme d'anions organiques en référence à leur forme chimique dissociée lors de l'exsudation. Ces anions organiques sont des composés carbonés possédant au moins un groupe carboxyle,  $-COOH$  et  $-COO^-$  sous la forme ionisée. Cette définition regroupe un grand nombre de composés, dont sont exclus les acides aminés et composés phénoliques qui peuvent aussi jouer un rôle important dans la rhizosphère *via* leur rôle dans la disponibilité des nutriments. Il est ainsi possible de citer le citrate, le malate, l'oxalate ou encore le malonate. Leur faible valeur de  $pK$  implique que dans le cytosol (pH autour de 7.3) ces composés soient sous forme dissociée et donc supposés exsudés sous forme ionisée et non sous forme d'acide carboxylique. L'exsudation de ces composés organiques varie suivant les espèces (Neumann et Römheld, 1999 ; Pearse et al., 2006). Le lupin blanc (*Lupinus albus* L.) est connu pour exsuder de larges quantités de citrate ; la forme majoritaire exsudée par le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est le malonate alors que le malate a été observé pour des espèces comme le maïs (*Zea mays* L.), la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), le colza (*Brassica napus* L.) (Jones et Darrah, 1995 ; Jones, 1998 ; Neumann et Römheld, 1999 ; Ryan et al., 2001). Il a aussi été mis en évidence que pour une même espèce, la composition des anions organiques exsudés pouvait être très variable (Kirk et al., 1999 ; Gaume, 2001 ; Hinsinger et al., 2003).

L'exsudation des anions organiques par les racines est un processus qui a été beaucoup étudié dans un premier temps pour leur effet comme source d'énergie pour les microorganismes (Curl and Truelove, 1986 ; Bowen et Rovira, 1999 ; Dakora et Phillips 2002). Ces exsudats racinaires ont été aussi étudiés pour leur effet sur la disponibilité des nutriments et en particulier P, indirectement *via* les microorganismes mais aussi directement en modifiant le transfert des ions de la phase solide et la solution du sol. Les anions organiques ont ainsi été étudiés pour leur rôle dans les processus d'adsorption/désorption et précipitation/dissolution. Ces composés chargés influencent le processus d'adsorption/désorption par compétition avec les autres anions de la solution pour l'adsorption à la surface des minéraux (Hinsinger, 2001 ; Oburger et al., 2011). Ils peuvent encore influencer les processus de précipitation/dissolution en jouant comme ligands de cations (*e.g.* Ca, Al, Fe) et par l'acidification du milieu (Bolan, 1997 ; Jones, 1998). Dans le cas de l'Al, les anions organiques interviennent dans les sols acides par la complexation des ions  $Al^{3+}$  (Jones, 1998 ; Hinsinger, 2001). En ce qui concerne le Fe, des anions organiques ainsi que les phytosidérophores sont impliqués dans la chélation des ions  $Fe^{3+}$  contrôlant l'acquisition du Fe dans le cas de la stratégie II développée par les graminées (Marschner et Römheld, 1996 ; Hell et Stephan, 2003 ; Schmidt 2003).

#### 1.4.2.3. Modifications de pH

Les variations de pH dans la rhizosphère sont expliquées par trois processus physiologiques : (i) l'absorption des ions, (ii) l'exsudation d'anions organiques et (iii) la respiration racinaire. Il est admis que l'absorption d'ions, en fait l'excrétion de  $H^+$  ou  $OH^-$  qui en résulte, est le principal processus qui régule le pH rhizosphérique. En effet, l'influence majeure de l'équilibre cation-anion sur l'exsudation de  $H^+/OH^-$  par les racines est largement admis. Afin de maintenir l'électroneutralité dans le milieu intracellulaire les racines compensent le prélèvement des cations et des anions par l'exsudation de l'excès de charges positives ou négatives sous la forme, respectivement de  $H^+$  ou d' $OH^-$ . Si plus de cations que d'anions sont prélevés, les racines vont ainsi compenser cet influx net de cations par un efflux net de  $H^+$  hors des racines vers la rhizosphère. Dans le cas inverse, l'influx net d'anion sera compensé par un efflux net d' $OH^-$  (ou  $HCO_3^-$ ) de la racine vers la rhizosphère. La nutrition N est considérée comme le principal déterminant du bilan cations-anions. L'azote peut en effet être prélevé sous forme cationique ( $NH_4^+$ ), anionique ( $NO_3^-$ ) et non chargé ( $N_2$  atmosphérique pour les légumineuses et autres plantes fixatrices). De nombreuses études en hydroponie ou dans le sol ont mis en évidence l'influence de l'apport de  $NH_4^+$  et  $NO_3^-$  sur les modifications de pH dans la rhizosphère (Kirkby et Mengel, 1967 ; Riley et Barber 1971 ; Kirkby 1977 ; Gahoonia et al., 1992 ; Zhang et al., 2004). La figure 1.2 présente les résultats de Gahoonia et al. (1992) montrant dans le cas du ray gras (*Lolium perenne* L) l'exsudation nette de  $H^+$  ou de  $OH^-$  dans la rhizosphère du suite à des apports de N respectivement sous forme  $NH_4^+$  et  $NO_3^-$ .

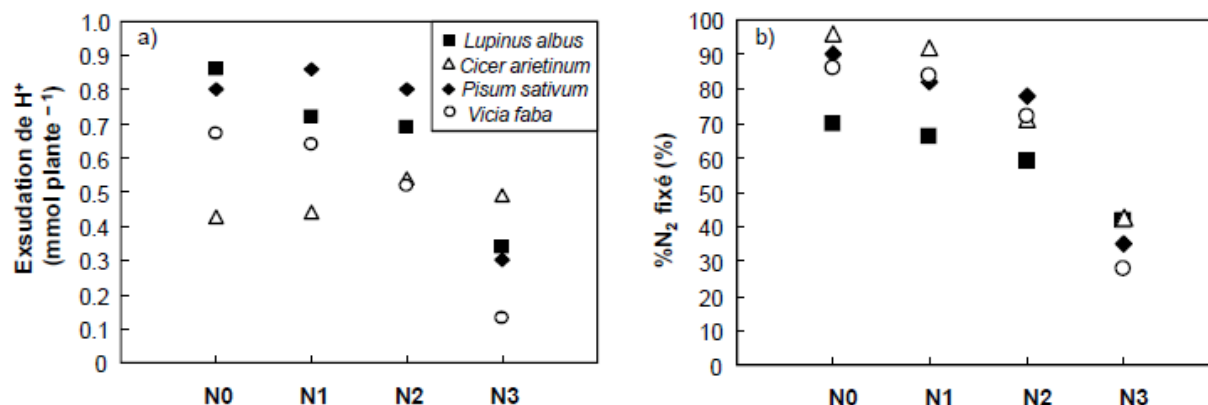


**Figure 1.2.** Exsudation nette de H<sup>+</sup> et OH<sup>-</sup> par les racines de ray gras (*Lolium perenne* L) après 10 jours de culture sur un Luvisol pour différents apports de N sous forme NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. D'après Gahonnia et al. (1992).

La principale différence suivant les espèces concerne les légumineuses qui se distinguent par leur capacité d'acidifier leur rhizosphère du fait de leur faible prélèvement d'anions (peu de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> qui est de loin l'anion le plus prélevé), lorsqu'elles fixent des quantités significatives de N<sub>2</sub> grâce à la symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote (Hinsinger et al., 2003). Tang et al. (1997) ont observé dans le cas de 12 espèces de légumineuses à graines que l'activité fixatrice était associée à l'exsudation de protons par les racines, ce qui peut s'expliquer par un prélèvement préférentiel de cations. Ces auteurs ont aussi pu mettre en évidence une variation du taux de fixation suivant les espèces, qui a été confirmée par d'autres études (Tang et al., 1999 ; Fan et al., 2002 ; Rengel, 2002b ; Provorov et Tikhonovich, 2003). De plus la fixation de N<sub>2</sub> par les légumineuses n'est pas systématique et peut également être influencée par l'apport de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> inhibant l'activité fixatrice et pouvant amener à une diminution de l'efflux de protons (Leidi et Rodríguez-Navarro, 2000 ; Fan et al., 2002 ; Tang et al., 2004). Parmi les différents travaux, ceux de Tang et al. (1999) ont montré l'effet inhibiteur des ions nitrate sur l'activité fixatrice de N<sub>2</sub> et *in fine* sur l'exsudation de H<sup>+</sup> par les racines pour différentes espèces de légumineuses montrant des réponses contrastées à l'apport croissant de N sous forme NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig.1.3).

Barber et ses collaborateurs ont été les premiers au début des années 1970 à souligner le rôle des changements de pH dans la rhizosphère sur la disponibilité en nutriments, et cet aspect a depuis été largement documenté (Hinsinger et al., 2005). Les modifications de pH induites par les racines influencent les processus d'adsorption/désorption, de dissolution/précipitation ainsi que de minéralisation/organisation. L'exsudation de H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> modifie ainsi les charges de surface des minéraux et les caractéristiques des matières organiques directement ou indirectement *via* l'activité des microorganismes mais aussi la dissolution de la plupart des minéraux du sol.





**Figure 1.3.** Exsudation de H<sup>+</sup> par les racines (a) et pourcentage d'azote fixé (b) par différentes espèces de légumineuse pour un apport croissant de N sous forme N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les doses d'azote apportées sont 0 (N0), 5.7 (N1), 14.2 (N2), 56.9 (N3) mg N kg<sup>-1</sup>. D'après Tang et al. (1999).

#### 1.4.2.4. Prélèvement d'ions

La quantité d'un ion prélevée par une plante est le résultat de l'absorption par les racines ainsi que de la surface développée par les racines. L'absorption des nutriments par la plante nécessite le transport des solutés présents dans la solution du sol à travers la membrane plasmique. Ce transport peut se faire par diffusion le long d'un potentiel électrochimique ou par transport actif contre un potentiel électrochimique. D'un point de vue fonctionnel et macroscopique, l'absorption d'ions par les plantes peut être décrite par une cinétique suivant la loi de Michaelis-Menten qui relie le flux d'absorption  $F$  ( $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) à la concentration en ions en solution  $C$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (e.g. Barber, 1995).

$$F = \frac{F_{\max} (C - C_{\min})}{K_m + (C - C_{\min})} \quad (\text{eq.1})$$

où  $F_{\max}$  représente le flux maximum d'absorption ( $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $C$  représente la concentration en ion de la solution ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_{\min}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) correspond à la concentration en solution en dessous de laquelle le flux d'absorption devient nul,  $K_m$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) est la concentration de l'ion en solution qui induit un flux d'absorption égal à  $F_{\max}/2$  et correspond à l'affinité de l'ion pour les transporteurs. Plus la valeur du  $K_m$  est faible plus le prélèvement est efficace à faible concentration. Pour un même nutriment il est possible d'avoir des transporteurs à faible et forte affinité. En fonction de la concentration en ion de la solution du sol, les plantes sont capables de compenser la faible concentration par une augmentation du  $F_{\max}$  et l'induction d'un transport à haute affinité. Différentes études physiologiques ont permis de mettre en évidence des capacités d'absorption différentes suivant les espèces ou génotypes (Barber, 1995 ; Baligar et al., 2001 ; Gahoonia et Nielsen, 2004 ; Hodge, 2004). Néanmoins ces différences sont supposées avoir une influence négligeable sur les capacité d'acquisition dans le cas de nutriments dont le transport est limité par la diffusion, tels que P (Rengel et Marschner, 2005 ; Hinsinger et al., 2011).

#### 1.4.2.5. Exsudation d'enzymes

Diverses enzymes exsudées par les racines sont impliquées dans l'hydrolyse des nutriments présents sous des formes organiques. Les microorganismes du sol sont reconnus pour jouer un rôle important dans l'hydrolyse des formes organiques mais l'exsudation d'enzymes extracellulaires par les racines existe également (Marschner 1995, Richardson et al., 2009). Bien qu'il ait été récemment mis en évidence que les racines pouvaient sécréter des protéases, la minéralisation des formes organique de N est principalement réalisée par les microorganismes (Miller et Cramer, 2005 ; Richardson et al., 2009). Dans le cas du P les racines sont reconnues pour exsuder des enzymes hydrolysant le P organique. Ces enzymes constituent le groupe très diversifié des phosphatases. Plusieurs études ont abouti à considérer que les légumineuse ont la capacité de maintenir une activité phosphatasique élevée dans leur rhizosphère, supérieure à celles de céréales (Yadav et Tarafdar, 2001 ; Li et al., 2004 ; Venterink, 2011). Néanmoins cette tendance n'est pas observée systématiquement (Li et al., 1997 ; Hayes, 2000). De plus, le taux de sécrétion peut être fortement influencé par les variations de disponibilité en P et en N (Li et al., 1997 ; Richardson et al., 2009 ; Venterink, 2011). Il faut aussi ajouter qu'une part de la variabilité observée suivant les études peut être liée à des questions méthodologiques. Or il existe souvent un décalage entre les études *in vitro* et *in situ*. Suivant les sols, les enzymes sont rapidement adsorbés sur les constituants solides et peuvent perdre leur activité catalytique. De plus il est difficile de différencier dans un sol l'origine de ces phosphatases (*i.e.* végétale vs microbienne) (Quiquampoix et Burns, 2007 ; George et al., 2008 ; Giaveno et al., 2010).

#### 1.4.3. Modification des propriétés biologiques

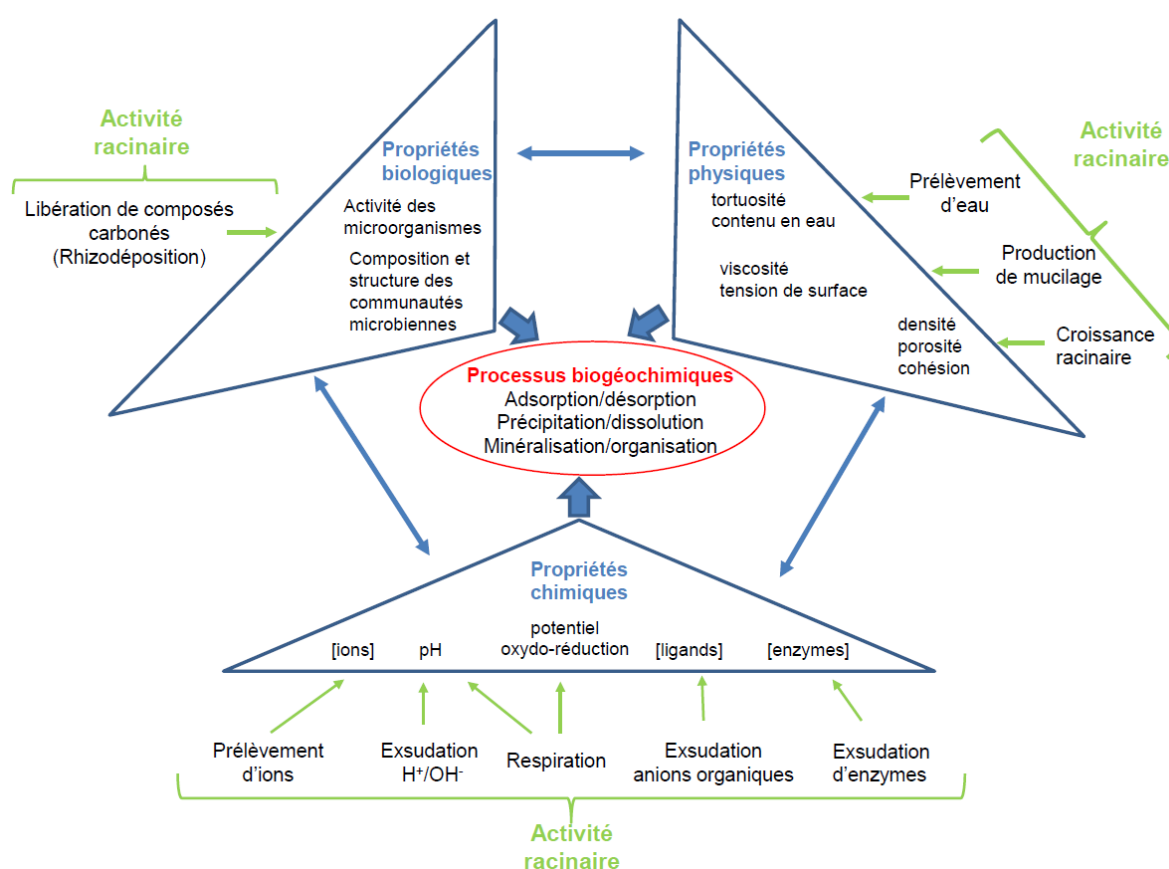
La rhizosphère est caractérisée par sa concentration élevée en composés carbonés en comparaison du sol non affecté par les racines (*i.e.* le « bulk soil »). Cette rhizodéposition est considérée comme le principal facteur contrôlant les processus microbiens dans la rhizosphère et leur effet sur la biodisponibilité des nutriments (Hiltner, 1904 ; Grayston et Jones, 1996 ; Jones et al., 2009). De nombreux processus sont à l'origine de l'entrée de carbone sous forme de rhizodépôts dans la rhizosphère dont principalement la libération et la lyse des cellules racinaires ainsi que l'exsudation et la sécrétion de composés carbonés (Kuzakov et Domansky 2000 ; Jones et al., 2009 ; Richardson et al., 2009 ; Dennis et al., 2010). Approximativement 11 % du carbone issu de la photosynthèse et 27 % du carbone alloué aux racines est associé à la rhizodéposition (Grayston et Jones, 1996 ; Jones et al., 2009). Ces exsudats sont souvent différenciés selon deux catégories, la plus diverse représentée par des composés de faible poids moléculaire (*e.g.* acides aminés, anions organiques, sucres) et la plus importante quantitativement représentée par des composés à poids moléculaire plus élevé (*e.g.* polysaccharides tels que le mucilage, protéines) (Bais et al., 2006 ; Jones et al., 2009). Ces exsudats sont à la fois une source d'énergie mais aussi des signaux qui déterminent la structure et l'activité des communautés microbiennes (Dakora et Phillips, 2002 ; Walker et al., 2003 ; Hartmann et al., 2009 ; Dennis et al., 2010). Le taux d'exsudation et la composition de ces exsudats varient suivant les espèces et génotypes mais

sont aussi influencés par l'état nutritionnel des plantes et donc la disponibilité en nutriments dans le sol (Griffiths et al., 1999 ; Baudouin et al., 2003). Il a ainsi été observé une grande variabilité des communautés microbiennes dans la rhizosphère selon les espèces et génotypes (Marschner et al., 2001 ; Smalla et al., 2001 ; Marschner et al., 2006 ; Haichar et al., 2008). Dans le cas particulier des microorganismes symbiotiques, les légumineuses sont connues pour exsuder des composés particuliers (*e.g.* flavonoïdes) qui attirent des bactéries microsymbiontes particulières impliquées dans la fixation de  $N_2$  (Dakora et Phillips, 2002 ; Richardson et al., 2009). L'association avec des champignons mycorhiziens reconnus pour leurs effets sur la nutrition phosphatée des plantes est quant à elle, plus répandue, avec environ 80% des plantes vasculaires capables de réaliser des mycorhizes à arbuscule (Morgan et al., 2005 ; Biais et al., 2006 ; Wang et Qiu, 2006).

Les microorganismes peuvent avoir un effet direct sur la disponibilité des nutriments dans la rhizosphère via la modification des caractéristiques physiques chimiques et biologiques du sol, comme démontré dans le cas de N. L'entrée de N dans l'écosystème peut être réalisée par l'intermédiaire de microorganismes symbiotiques ou libres qui fixent  $N_2$  d'origine atmosphérique, ainsi que par la minéralisation des matières organiques en  $NH_4^+$ , dont l'oxydation en  $NO_3^-$  (*i.e.* nitrification) mais aussi la sortie du système sous forme de  $N_2O$  ou NO (*i.e.* dénitrification), qui peuvent constituer des sorties de l'écosystème. Le N disponible peut aussi être immobilisé dans la biomasse microbienne temporairement à partir des ions  $NH_4^+$ .

Les microorganismes sont aussi reconnus pour pouvoir modifier la disponibilité du P dans la rhizosphère. Ils influencent en premier lieu le processus de minéralisation/organisation. Alors que les racines ont la capacité d'exsuder des enzymes hydrolysant les formes organiques de P, parmi les phosphatases, les phytases qui sont impliquées dans l'hydrolyse de la forme prédominante de P organique dans les sols, le phytate, seraient exclusivement d'origine microbienne (Richardson et al., 2001 ; Rengel et Marschner, 2005 ; Richardson et al., 2011). Le recyclage et le turnover des microorganismes peuvent aussi présenter une source significative de P organique susceptible d'être transformé en P inorganique dans la rhizosphère mais qui peut aussi être rapidement immobilisé dans la biomasse microbienne (Richardson et Simpson, 2011). Une grande variété de microorganismes dit « solubilisateurs de P » sont capables de solubiliser du P associé aux phases minérales du sol (Rengel et Marschner, 2005 ; Richardson et al., 2009). Des cultures de ces microorganismes isolés de la rhizosphère ont permis de relier le passage des ions phosphates en solution avec l'exsudation d'anions organiques (*e.g.* citrate, gluconate, oxalate) ainsi que de  $H^+/OH^-$ . En conditions contrôlées, l'inoculation de plantes avec des « microorganismes solubilisateurs » de P a généralement été associée à une augmentation de croissance et une amélioration de la nutrition P, des résultats similaires pour des milieux plus complexes, au champ sont rares et souvent aucun effet n'est observé (Richardson et Simpson, 2011). S'il semble clair que les microorganismes ont la capacité de modifier la disponibilité en P de la solution du sol, leur impact effectif sur la croissance et la nutrition des plantes est plus difficile à évaluer, y compris dans le cas des champignons mycorhiziens.

Bien que différents processus rhizosphériques présentés par la figure 1.4 aient été évalués comme ayant une influence sur les réactions biogéochimiques déterminant la disponibilité d'un nutriment, il reste à l'heure actuelle difficile de quantifier leur importance respective et leurs possibles interactions (Hinsinger et al., 2009, 2011 ; Richardson et al., 2011). Une grande partie des travaux réalisés en ce sens concerne des nutriments peu mobiles comme le P (Devau et al., 2011 ; Oburger et al., 2011). Ces processus rhizosphériques sont aussi susceptibles de varier dans le temps et dans l'espace ; ceci rend encore plus complexe l'analyse de leur influence sur la disponibilité des nutriments et souligne l'importance de l'évaluation de l'impact de la variabilité du fonctionnement de la rhizosphère dans le temps et à l'échelle de l'ensemble de l'appareil racinaire (Hinsinger et al., 2005, 2011).



**Figure 1.4.** Influence de l'activité des racines sur les propriétés physiques chimiques et biologiques dans la rhizosphère sur les processus biogéochimiques déterminant la disponibilité d'un nutriment.

### 1.5. Géométrie de la rhizosphère

Avant de déterminer comment l'acquisition d'un nutriment par une espèce influence celle d'une autre espèce il est nécessaire de définir quand et où cette interaction s'établit. Autrement dit cela revient à évaluer la zone d'influence des espèces et leur degré de recouvrement comme indicateurs respectivement de la quantité de nutriments accessible à chacune des plantes et l'intensité des interactions (Czaran et Bartha, 1992 ; Huston et De Angelis, 1994 ; Casper et Jackson, 1997 ; Dunbabin et al., 2002 ; Casper et al., 2003 ; Berger

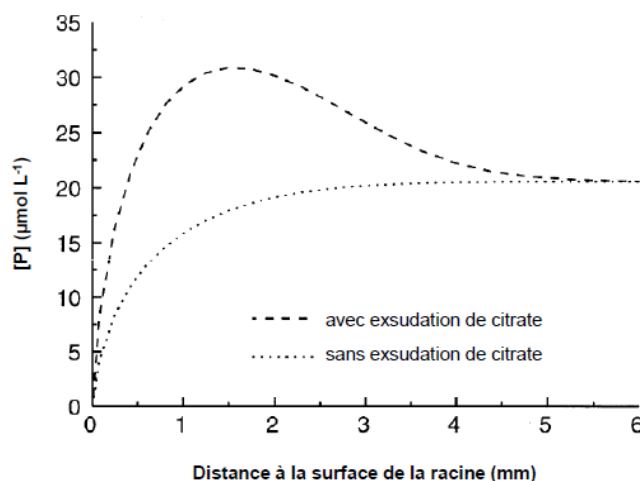
et al., 2008). Casper et al. (2003) soulignent que cette définition reste très théorique et donc que la distribution spatiale des racines ainsi que leur activité n'a souvent pas été prise en compte. Pour caractériser la géométrie de cette zone d'influence correspondant à la rhizosphère il semble donc nécessaire de déterminer sa forme dans l'espace sa structure et son volume.

La structure de la rhizosphère dépend de celle de l'appareil racinaire, déterminée par l'architecture racinaire sa configuration spatiale qui prend en compte la géométrie des axes racinaires, la densité et la longueur racinaire, ainsi que la morphologie des racines (Lynch, 1995). Son évaluation est souvent déduite de mesures de la topologie des racines ainsi que de leur distribution verticale et horizontale dans les profils de sol. Ces méthodes fournissent une information partielle sur la surface racinaire développée et ne permettent pas de prendre en compte les morphologies particulières de certaines racines influençant le volume de la rhizosphère. La présence de poils racinaires qui peuvent s'étendre à plus d'un millimètre de la surface des racines ou encore la présence de « cluster roots » sont des caractéristiques morphologiques modifiant peu l'architecture racinaire mais susceptibles d'augmenter considérablement le volume de sol exploré et exploité (Lynch, 1995 ; Hinsinger et al., 2005 ; Lynch 2007). Il est ainsi reconnu que les poils racinaires sont particulièrement importants dans l'acquisition de nutriments présentant une diffusion faible dans le sol comme c'est typiquement le cas du P (Gahoonia et Nielsen, 1998 ; Lynch, 2007). Un poil racinaire correspond à une excroissance d'une cellule épidermique ; la mise en place de ces poils permet d'augmenter la surface de contact avec la solution du sol à faible coût en carbone (Gahoonia et Nielsen, 1997 ; Lynch, 2007). En plus de l'augmentation de la surface par les poils racinaires certaines espèces mettent en place certaines structures particulières. Il est ainsi possible de citer les racines protéoïdes, ou plus exactement « cluster roots » développées par la famille des Proteacées et quelques espèces d'autres familles comme le lupin blanc parmi les légumineuses, ou encore les racines dauciformes dans le cas de la famille des Cyperacées (Watt et Evans, 1999 ; Lambers et al., 2006). Les « cluster roots » sont des structures racinaires situées sur une section de racine consistant en un groupement compact de plusieurs dizaines à centaines de racines d'ordre inférieur juxtaposées les unes aux autres atteignant quelques millimètres de longueur (Purnell, 1960 ; Skene, 1998). La structure de la rhizosphère peut également être modifiée par l'interaction avec des microorganismes. Il est ainsi possible de citer les mycorhizes, correspondant à l'association symbiotique avec des champignons dont les hyphes augmentent considérablement l'étendue de la rhizosphère, qui contribuent à l'acquisition de nutriments des plantes en particulier dans le cas du P (Jakobsen et al., 1992 ; Jakobsen et al., 2005 ; Schnepf et al., 2008). En contrepartie, la plante fournit du C issu de la photosynthèse (Bolan, 1991 ; Finlay, 2008).

Afin de déterminer le volume de la rhizosphère il est nécessaire d'évaluer jusqu'à quelle distance de la racine la plante modifie les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol qui influencent la disponibilité des nutriments. Cela revient à évaluer les frontières extérieures de la rhizosphère. Or la rhizosphère peut être plus ou moins étendue suivant les

processus rhizosphériques pris en compte dans l'acquisition d'un nutriment. Elle peut ainsi être restreinte à la zone de prélèvement du nutriment (« depletion zone » ou zone d'appauvrissement), ou lorsque les modifications des caractéristiques de la rhizosphère par les racines sont considérées s'étendre à une zone plus proche de la surface des racines, ou au contraire plus éloignée (selon la portée de ces modifications). Des zones d'appauvrissement à proximité de la surface des racines ont été observées pour différents nutriments, sols et espèces (Hinsinger et al., 2005). Ces zones d'appauvrissement se développent en réponse à l'effet « puits » de la racine lié à son activité de prélèvement, résultant en un gradient de concentration qui est le moteur du transport par diffusion (Tinker et Nye, 2000 ; Jungk, 2002). La mise en place des gradients de concentration est influencée par les caractéristiques du sol et du nutriment selon un formalisme bien établi, de sorte qu'il est aisé de simuler et prédire la portée de la zone d'appauvrissement. Selon le nutriment considéré, cette dernière peut ainsi s'étendre d'environ 1 mm pour le P à quelques centimètres pour le N sous forme  $\text{NO}_3^-$  (Hinsinger et al., 2005). Ge et al., (2000) ont simulé l'augmentation du rayon de cette zone pour plusieurs valeurs de coefficient de diffusion apparent ( $D_e$ ) d'un soluté dans le sol. Pour des valeurs de  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$  et  $10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  les rayons correspondants sont respectivement 0.6, 1.9 et 6 mm après 13 jours de croissance chez un haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). Les valeurs de ces coefficients, notamment les deux plus faibles, encadrent bien la gamme indiquée pour le P dans la littérature. Dans le cas du  $\text{NO}_3^-$  la zone d'appauvrissement est supposée plus étendue radialement compte tenu des valeurs du coefficient de diffusion apparent comprises entre  $10^{-11}$  et  $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (Tinker et Nye, 2000 ; Jungk, 2002 ; Raynaud et al., 2004). Dans ce cas de figure, seul le processus de prélèvement est pris en compte pour déterminer l'étendue radiale de la rhizosphère. Il n'est pas pris en compte l'influence des modifications des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol par les racines sur la disponibilité et ainsi sur le gradient de concentration du nutriment considéré. Dans le cas contraire le rayon de la rhizosphère devient dépendant de la diffusion des exsudats vers l'extérieur de la racine (Hinsinger, 2005 ; Darrach et al., 2006). Une grande partie des exsudats racinaires impliqués dans les modifications de disponibilité dans la rhizosphère (e.g. anions organiques, enzymes) diffusent sur une plus courte distance en raison de leur rapide adsorption sur les constituants solides du sol et/ou leur dégradation par les microorganismes dans le cas des composés carbonés (Jones et al., 2003 ; Hinsinger et al., 2005 ; Giaveno et al., 2010). Les protons exsudés par les racines sont quant à eux supposés présenter un temps de persistance plus long dans la solution du sol et diffuser sur une plus grande distance de l'ordre de plusieurs millimètres (Hinsinger et al., 2005 ; Raynaud, 2010). La prise en compte de l'adsorption de ces exsudats et leur taux de dégradation est ainsi nécessaire quand il s'agit d'évaluer l'étendue du gradient de concentration de ces composés racinaires et donc l'étendue de la rhizosphère comprenant alors l'ensemble de la zone affectée par l'activité des racines (Hinsinger et al., 2005 ; Raynaud et al., 2008). Un certain nombre de travaux expérimentaux et de modélisation ont permis de mettre en évidence l'influence des exsudats racinaires sur les gradients de concentration de différents nutriments dans la rhizosphère. Dans le cas du cuivre, Bravin et

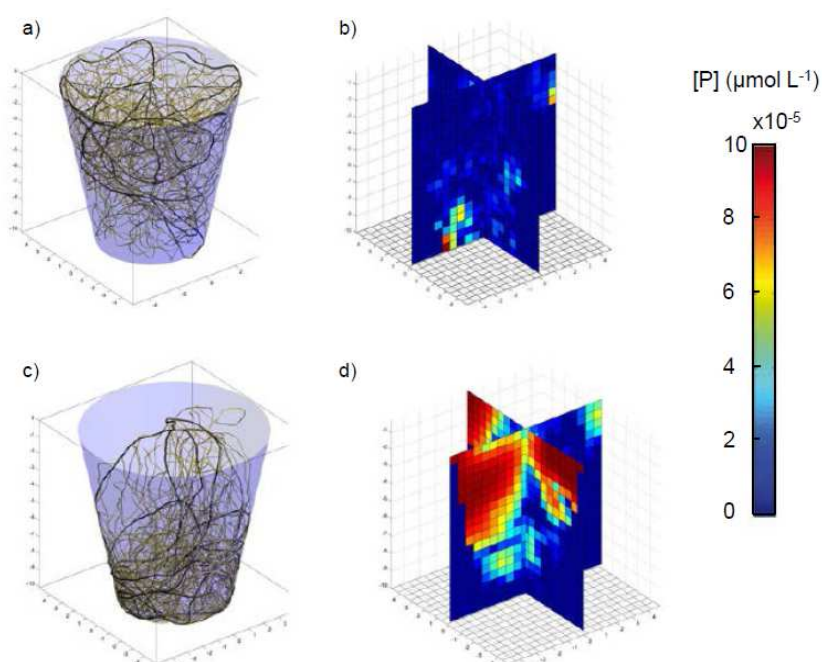
al. (2009) ont pu observer un écart entre le gradient de concentration à proximité des racines du blé dur (*Triticum turgidum durum* L.) par rapport à celui simulé en prenant uniquement en compte le prélèvement. Ce même décalage entre données simulées et mesurées a été observé chez la même espèce par Devau et al. (2010) qui rapportent une augmentation de la disponibilité en P dans la rhizosphère. En prenant en compte le prélèvement en P, celui de calcium (Ca) ainsi que l'exsudation de  $H^+/OH^-$ , ces auteurs ont pu alors simuler correctement la variation de disponibilité observée dans la rhizosphère. Dans certains cas il a été montré que les augmentations de disponibilité dans la rhizosphère correspondaient à une distribution complexe de la concentration du nutriment, avec une diminution à la surface de la racine et une augmentation en s'éloignant de la racine en comparaison des valeurs du sol non rhizosphérique (Hinsinger, 2001 ; Hinsinger et al., 2011). Nye (1983), puis Geelhoed et al. (1999) ont montré à l'aide de modèles empirique et mécaniste, respectivement, que de tels profils en bosse pouvaient s'expliquer par la combinaison du prélèvement de P et de l'exsudation par la racine d'un composé capable de solubiliser P ( $H^+$  ou anion organique tel que citrate (Fig.1.5), dans leurs modèles). La détermination de l'extension radiale de la rhizosphère reste donc difficile quand il s'agit de prendre en compte l'ensemble des processus rhizosphériques influençant la disponibilité d'un nutriment.



**Figure 1.5.** Profils de concentration en ions phosphate avec ou sans exsudation de citrate, Calculs réalisés pour  $19 \mu\text{mol P m}^{-2}$ ,  $95\text{m}^2 \text{goethite kg sable}^{-1}$ ,  $0.5 \mu\text{mol m}^{-1} \text{day}^{-1}$  et  $t = 1$  jour. D'après Geelhoed et al. (1999).

Il est également nécessaire de considérer l'hétérogénéité temporelle et spatiale de la rhizosphère mais aussi sa plasticité en réponse aux variations de l'environnement biotique et abiotique pouvant influencer les interactions entre plantes (Callaway et al., 2003 ; Casper et al., 2003 ; Hodge, 2004 ; Hinsinger et al., 2005). Afin de rendre compte de cette complexité, l'évaluation de la géométrie de la rhizosphère à l'aide d'outils de modélisation est nécessaire. Un certain nombre de travaux se sont intéressés à simuler l'architecture racinaire et l'étendue radiale de la rhizosphère, mais l'intégration des deux composantes reste encore limitée en particulier quand il s'agit de représenter la rhizosphère dans l'espace en 3D (voir Casper et al., 2003 et Hinsinger et al., 2011). Leitner et al. (2010) ont ainsi

proposé un modèle permettant l'évaluation de l'influence de l'architecture racinaire sur le prélèvement de P par les racines (Fig. 1.6). Les simulations de ces auteurs dans le cas du maïs permettent ainsi de représenter les concentrations en ions phosphates dans le sol en réponse au prélèvement dans un cas simplifié où seul l'effet de prélèvement par les racines est considéré. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer la zone d'influence des espèces végétales et leur superposition éventuelle, préalable nécessaire à la compréhension des interactions impliquées dans l'acquisition de nutriments au sein d'agroécosystèmes plurispécifiques.



**Figure 1.6.** Simulation 3D des appareils racinaires du maïs pour différents types de croissance dans un pot et effet sur les concentrations en ions phosphate dans le sol prélèvement de P. Distribution des racines (a) et concentration en ions phosphate dans le cas de chimiotropisme. Distribution des racines (b) et concentration en ions phosphate (d) dans le cas du gravitropisme. D'après Leitner et al. (2010).

## II. Interactions entre espèces pour l'acquisition d'un nutriment : concepts et mécanismes

L'acquisition des nutriments par un assemblage d'espèces est le résultat des interactions entre individus. La compréhension des mécanismes impliqués est nécessaire pour déterminer le partage des nutriments entre espèces, son influence sur leurs performances (*e.g.* biomasse, prélèvement d'un nutriment) et *in fine* sur le fonctionnement global de l'écosystème ou agroécosystème (*e.g.* production primaire, flux de nutriments). Suivant l'échelle d'interprétation de l'effet des interactions et les objectifs des auteurs le degré d'explicitation des mécanismes impliqués est variable.

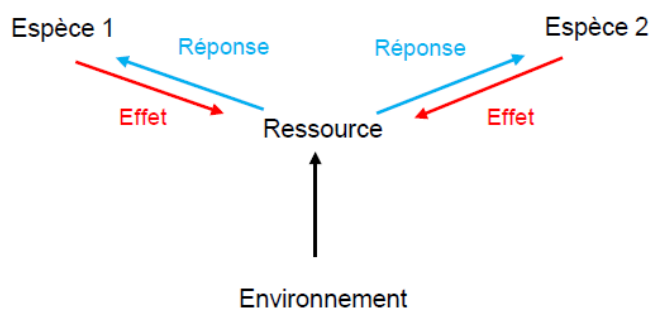


### **II.1. Lien diversité-productivité/fonctionnement des écosystèmes**

Afin de comprendre la relation entre le nombre, l'identité des espèces et le fonctionnement de l'écosystème différents mécanismes ont été proposés. Dans l'ensemble de ce manuscrit nous avons fait le choix de nous placer dans le cas de l'effet de la diversité spécifique, mais le même raisonnement peut être proposé dans le cas plus général de diversité génotypique. Il a ainsi été proposé que l'augmentation des performances des écosystèmes fréquemment observée avec la diversité soit le résultat de l'amélioration de l'utilisation des ressources (eau, lumière, nutriments) par les espèces. Les mécanismes proposés sont classés sous différentes catégories, la différenciation de niche, la facilitation et le « sampling effect » (Fridley 2001 ; Loreau et Hector 2001). Hutchinson (1957), définit une niche écologique comme l'ensemble des ressources et des conditions de l'environnement nécessaires au développement d'un individu. Loreau et al. (2001) rassemblent les deux premiers mécanismes sous le terme de complémentarité alors que Fridley distinguent leur effet réciproque. Notre objectif étant de décrire l'ensemble des mécanismes déterminant l'acquisition des ressources en nutriments, nous suivons donc par la suite le formalisme proposé par Fridley. Le « sampling effect » a été proposé suite aux expérimentations de biodiversité, consistant en la modification du nombre d'espèces ou de groupes fonctionnels assemblés au hasard (Loreau, 2010). Le « sampling effect » correspond alors à la probabilité d'introduire des espèces maximisant la différenciation de niche et la facilitation (Fridley, 2001 ; Loreau et al., 2001). Le « sampling effect » dépend alors des deux autres catégories de mécanismes. Dans le cas des agroécosystèmes plurispécifiques dont les associations céréale-légumineuse sont un exemple, il s'agit le plus souvent d'assemblage d'un nombre réduit d'espèces, fréquemment deux. Pour ces raisons la notion de « sampling effect » ne sera pas davantage développée.

### **II.2. Interactions entre plantes pour une ressource : interactions racinaires pour l'acquisition d'un nutriment**

Les deux grandes catégories de mécanismes proposées ci-dessus sont le résultat des interactions entre individus pour une ressource. Lorsque les individus appartiennent à la même espèce ces interactions sont dites intraspécifiques tandis qu'elles sont interspécifiques dans le cas de plusieurs espèces. La notion d'interaction entre individus a été utilisée sous différentes perspectives suivant les objectifs des auteurs. Le formalisme de Goldberg (1990) permet de clarifier la définition et de l'adapter à l'acquisition d'un nutriment. L'auteur place la ressource au centre de sa définition et prend en compte « l'effet » des individus sur sa disponibilité, « la réponse » des individus à ces variations ainsi que l'influence de l'environnement sur la disponibilité de la ressource (Fig. 1.7). « L'effet » est relatif à l'acquisition de la ressource alors que « la réponse » fait référence à l'utilisation de la ressource et donc aux performances de l'individu. Ces deux catégories de mécanismes peuvent être difficiles à dissocier (Violle et al., 2009). Dans le cas du partage d'une ressource entre individus, le terme interaction désigne ainsi le cas où l'acquisition par un individu affecte celle d'un autre.



**Figure 1.7.** Interactions entre espèces pour une ressource : effet de deux espèces en association ainsi que de l'environnement sur la disponibilité d'une ressource et réponse des espèces aux variations. D'après Goldberg, (1990)

Les interactions sont généralement classées en deux types, négatives ou positives, respectivement désignées sous le nom de compétition ou de facilitation. La compétition est définie comme la diminution des performances en termes de croissance, de reproduction et/ou de survie (*i.e.* « fitness ») par un autre individu *via* la diminution de l'accès à la ressource. Cela peut être induit directement par la réduction de la disponibilité de la ressource suite au prélèvement de l'individu voisin, ou indirectement par l'intermédiaire de l'exsudation de molécules toxiques (*i.e.* allélopathie), la compétition est alors désignée respectivement comme « exploitative competition » ou « interference competition ». La facilitation correspond, à une augmentation des performances d'un individu suite à l'accroissement de la disponibilité de la ressource induite par un autre individu suite à une modification de l'environnement (Callaway, 1995 ; Brooker et al., 2003 ; Bruno et al., 2003). Une majorité des publications en écologie s'intéresse à la réponse des individus exprimée en termes de biomasse ou parfois de prélèvement de la ressource. Il sera ici développé, le cas de l'acquisition d'un nutriment et ainsi « l'effet » des interactions racinaires sur la disponibilité en nutriments. La « réponse » des espèces est alors évaluée à travers le partage du nutriment prélevé. Nous avons donc fait le choix de redéfinir la compétition comme l'ensemble des mécanismes de prélèvement gouvernant le partage de la ressource en nutriments entre les individus, correspondant donc à une diminution de la ressource. La facilitation désigne alors l'ensemble des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la disponibilité d'un nutriment dans le sol à travers l'activité racinaire se traduisant par une augmentation de sa biodisponibilité pour au moins une des espèces du peuplement plurispécifique. En conséquence la facilitation influence le partage d'un nutriment entre espèces et donc la compétition. Nous présenterons par la suite comment les mécanismes de partage d'un nutriment sont définis dans la littérature et, lorsque la facilitation est considérée, comment l'effet de ces mécanismes sont pris en compte dans le partage entre espèces. L'influence de l'environnement sur la valeur de la disponibilité de la ressource est supposée modifier les mécanismes d'interaction sera vue dans le paragraphe IV de cette synthèse.

### II.3. Partage de la ressource en nutriment et compétition

La détermination des mécanismes impliqués dans la compétition pour les nutriments a fait l'objet de controverses. Les modèles proposés par Grime (1979) et Tilman (1988) continuent à faire débat (Craine, 2005 ; Tilman, 2007). La controverse est liée à la représentation de la disponibilité de la ressource par ces deux auteurs. Les concepts de ces deux auteurs seront donc présentés dans un premier temps. L'évolution des modèles conceptuels d'interaction, essentiellement de compétition, est parallèle à la prise en compte progressive de la représentation de la disponibilité de la ressource.

#### II.3.1. Disponibilité des nutriments et répartition homogène ou hétérogène

Dans le cas de Tilman (1988), la disponibilité du nutriment est répartie de façon homogène. Cette hypothèse a été formulée en lien avec ses recherches antérieures sur la compétition pour le silicium et le phosphore entre deux espèces de diatomées en milieu aquatique (Craine, 2005). Selon Tilman (1988), la compétition pour un nutriment repose sur les capacités de prélèvement respectives des espèces. Le partage des ressources est déterminé par la capacité de chaque espèce à réduire la concentration d'un nutriment en solution jusqu'au seuil minimum à sa survie. Cette valeur est désignée par  $R^*$  et est évaluée pour chaque espèce cultivée en monoculture. L'espèce ayant la valeur de  $R^*$  la plus faible présente ainsi un avantage compétitif. Ce modèle a été largement utilisé en écologie et complexifié pour prendre en compte l'effet du cycle des nutriments en particulier de leur recyclage sur la compétition (Daufresne et Hedin, 2005).

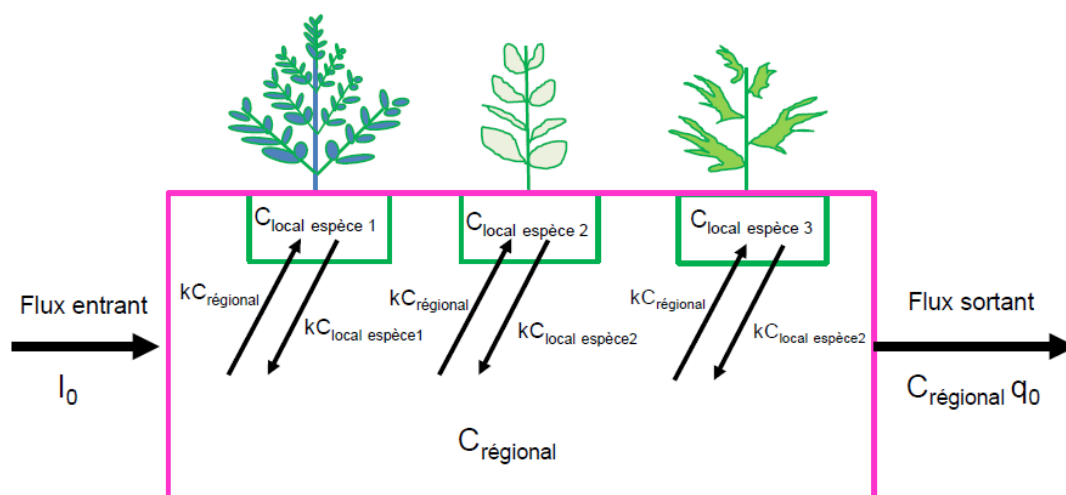
Il est cependant admis que dans le sol la ressource en nutriment est répartie de manière hétérogène. Cette caractéristique n'est pas uniquement spécifique des écosystèmes naturels pauvres en nutriments. En effet cette hétérogénéité est liée à la répartition de la matière organique et à sa dynamique de dégradation par les microorganismes mais également à l'apport de fertilisants inorganiques dans les sols agricoles. La disponibilité en nutriments présente ainsi une répartition variable dans l'espace ou dans le temps sous forme de « patch » ou zone de forte concentration. Dans le cas d'un « patch » de nutriments sous forme organique, leur minéralisation se fait au cours du temps et leur libération en solution conduit à des pics ou « pulses » (Robinson et al., 1999 ; Hodge, 2004). Grime (1979) se place dans le cas d'une distribution hétérogène. Par conséquent la compétition est déterminée par le prélèvement dans les zones de forte concentration (« patch »), le prélèvement en dehors de ces zones étant supposé limité. Le partage d'un nutriment est donc influencé par la prolifération des racines dans ces zones et par la capacité de prélèvement des racines. Grime (1979) présente la compétition comme une course pour la colonisation par les racines des zones de forte concentration. L'espèce capable de placer ses racines préférentiellement dans ces zones et présentant une capacité de prélèvement supérieur à l'autre aura ainsi un avantage compétitif.

Si ces deux modèles théoriques diffèrent essentiellement dans leur représentation de la répartition de la ressource ils traitent la disponibilité en nutriment de manière équivalente à

celle de la lumière. Les deux auteurs ne tiennent pas compte des nombreuses interactions entre les nutriments et le sol qui sont essentielles à la description de leur disponibilité ainsi que l'effet des espèces sur celle-ci, donc sur son partage.

### II.3.2. Disponibilité d'un nutriment et diffusion

Dans leur modèle de compétition pour la ressource en nutriments, Hutson et De Angelis (1994) ainsi que Loreau (1998) rappellent l'importance de la prise en compte des interactions entre les nutriments en solution et la phase solide du sol, ainsi que leur transport par diffusion vers les racines. Dans leurs modèles, le transport se produit du milieu le plus concentré vers le moins concentré. Le transport est ainsi représenté par un flux entre un compartiment représentant le pool général d'un nutriment et la zone de prélèvement autour des racines, respectivement définis comme compartiment « régional » et « local » comme illustré par la figure 1.8 dans le cas du formalisme proposé par Huston et De Angelis (1994). La différence, suivant les espèces, de la valeur de ce flux détermine le partage du nutriment. La prise en compte de la diffusion dans le transport des nutriments dans le sol permet ainsi à ces auteurs de présenter la notion de zone d'appauvrissement à proximité des racines. Hutson et De Angelis (1994) manipulent la notion de gradient de concentration du nutriment à proximité de la racine, tel qu'il est induit par l'activité d'absorption de la plante. Dans leur représentation, les valeurs de concentration suivant la distance à la racine dépendent de la diffusion du nutriment dans le sol et sont déterminées par le flux d'apport du nutriment dans la solution du sol et le prélèvement par la plante, ainsi que par les caractéristiques du nutriment et du sol.



**Figure 1.8.** Modélisation des flux d'un nutriment dans le cas de plusieurs espèces associées du compartiment régional au compartiment local. Concentration du nutriment  $C$  (masse volume<sup>-1</sup>), coefficient de transport du nutriment  $k$  (volume temps<sup>-1</sup>), taux d'efflux du nutriment  $q_0$  (volume temps<sup>-1</sup>), flux entrant  $I_0$  (masse temps<sup>-1</sup>). D'après Huston et De Angelis, (1994).

Huston et De Angelis (1994) ainsi que Loreau (1998) manipulent également la notion de zone d'influence définie par les zones d'appauvrissement du nutriment. Son partage est ainsi déterminé par le degré de recouvrement des zones d'appauvrissement et le flux de

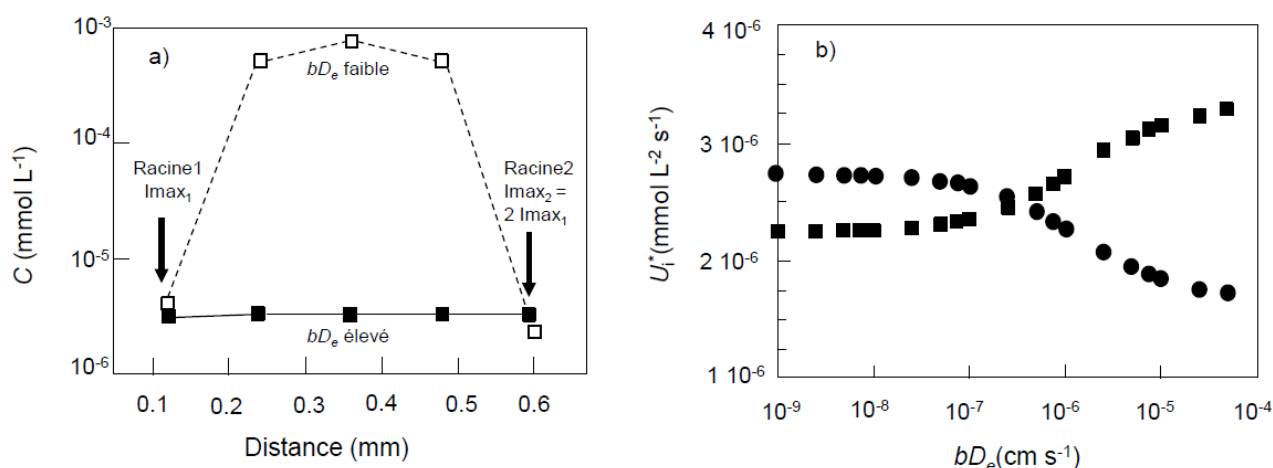
transport du nutriment vers les racines. Autrement dit la compétition est influencée par l'occupation de l'espace par chaque individu et leur capacité de prélèvement réciproque qui affecte le flux du nutriment entre le compartiment « régional » et « local ». La valeur minimale de concentration du nutriment se situe à proximité de la surface de la racine et diffère suivant les espèces, en particulier en fonction de leur capacité de prélèvement.

Par leur formalisme les auteurs remettent en question l'hypothèse de Tilman (1988) qui prend en compte l'effet des individus sur la concentration moyenne d'un nutriment, la plante la plus compétitive étant celle capable de réduire cette concentration à une valeur minimale. Hutson et De Angelis (1994) ainsi que Loreau (1998) ont ainsi intégré les concepts de disponibilité d'un nutriment développés en nutrition des plantes à son partage entre espèces. Néanmoins leurs modèles restent très théoriques, les paramètres utilisés ne pouvant pas être mesurés expérimentalement (Raynaud et Leadley, 2004).

### II.3.3. Disponibilité d'un nutriment, diffusion et modèle de prélèvement

Raynaud et Leadley (2004) ont développé un modèle de compétition entre espèces pour le prélèvement d'un nutriment. Dérivé d'un modèle de prélèvement de type Barber-Cushman à l'échelle de la racine d'un individu, il est complété par un modèle décrivant l'apport en nutriments. Le partage d'un nutriment est évalué pour deux racines en compétition pour ensuite être agrégé à l'échelle de l'individu et de la communauté. Le modèle se place à l'équilibre quand le taux de prélèvement d'un nutriment est égal à son apport dans la solution du sol autrement dit quand le gradient de concentration est établi au voisinage des racines. Ces auteurs considèrent que le transport des nutriments vers la racine se fait par diffusion. Dans leur modèle, Raynaud et Leadley (2004) s'affranchissent du transport par advection en considérant un taux de prélèvement d'eau identique pour chaque espèce. Les auteurs proposent la valeur du « diffusive supply » comme facteur clé de la compétition pour les nutriments. Le « diffusive supply » représente les propriétés du sol à l'équilibre, il est déterminé par le coefficient de diffusion de l'ion dans la solution du sol (*i.e.* coefficient de diffusion apparent) et par la capacité du sol à réapprovisionner la solution en ion ou « buffer power ». La zone d'influence d'une espèce est représentée par un index dérivé des polygones de Thiessen encore appelés diagramme de Voronoï (ou encore tessellation de Dirichlet) qui représente une décomposition de l'espace particulière correspondant à des polygones dont les côtés sont définis par l'ensemble des points situés à égale distance d'un objet central ici correspondant à une racine. Le volume de sol exploité par une racine est donc représenté par l'aire de ce polygone. Le volume total exploité par une espèce consiste en la somme de ceux définis par les polygones de chaque racine. Les zones d'influence des différentes espèces sont déterminées par la répartition dans l'espace des racines des espèces. Leur nombre est ensuite défini par les auteurs ou établi de façon aléatoire. Les résultats des simulations sont représentés par des profils de concentration entre les deux racines, permettant d'illustrer l'influence de la valeur du transport diffusif. La figure 1.9a représente pour une distance fixée entre deux racines la concentration en solution d'un nutriment en fonction de la distance pour deux valeurs contrastées de transport diffusif. À

faible valeur de « diffusive supply », la zone de concentration minimale du nutriment est localisée à la surface de la racine, la concentration augmente de manière asymptotique jusqu'à atteindre un plateau lorsqu'on s'éloigne de la racine. La valeur de concentration à la surface de la racine ainsi que la pente de la courbe varient suivant les caractéristiques de prélèvement des individus. Ainsi la valeur de concentration minimale à la surface de la racine est gouvernée par la capacité de prélèvement maximum de la plante. Dans le cas d'une valeur élevée de « diffusive supply », l'effet de prélèvement par la racine affecte la valeur de concentration sur une plus longue distance. Le profil de concentration est quasiment plat, la valeur étant proche de celle à la surface de chacune des racines. Les auteurs concluent qu'il est nécessaire de distinguer les deux cas de transport diffusif afin de déterminer l'influence respective des différentes caractéristiques ou traits de prélèvement des racines dans le partage des nutriments. Ils concluent ainsi que la compétition est contrôlée par les caractéristiques du sol et du nutriment. Pour de faibles valeurs de « diffusive supply » le partage entre individus est déterminé par l'occupation de l'espace par les racines (*e.g.* la distance entre les racines), tandis que c'est la capacité de prélèvement des racines qui est déterminante pour des valeurs élevées (Fig. 1.9b).



**Figure 1.9.** Simulation de gradients de concentration entre deux racines (a) et prélèvement respectif de deux espèces en compétition (b). **(a)** Simulation de gradient de concentration en nutriments  $C$  à l'équilibre entre 2 racines présentant différentes capacité de prélèvement ( $I_{max_i}$ ) pour des valeurs faibles de « diffusive supply » ( $bD_e = 1 \cdot 10^{-9}$ ; ligne pointillée) et pour des valeurs élevées de « diffusive supply » ( $bD_e = 1 \cdot 10^{-5}$ ; ligne pleine). **(b)** Prélèvement à l'équilibre ( $U_i^*$ ) des espèces pour différentes valeurs de « diffusive supply » ( $b$  capacité de rétention du sol et  $D_e$  coefficient apparent de diffusion d'un soluté dans le sol). Le prélèvement de l'espèce 1 (cercles) et l'espèce 2 (carrés) est simulé pour un taux de prélèvement de l'espèce 1 inférieur à l'espèce 2  $\gamma_2/\gamma_1 = 2$  ( $\gamma_i$  mmol s<sup>-1</sup>) et une occupation de l'espace de l'espèce 1 supérieure à l'espèce 2  $\sigma_2/\sigma_1 = 0.82$  ( $\sigma_i$  cm<sup>3</sup>). Quelques gammes de valeurs de  $bD_e$  pour différents nutriments :  $NH_4^+$  [ $3.0 \cdot 10^{-6}$ ;  $1.7 \cdot 10^{-6}$ ],  $NO_3^-$  [ $5.4 \cdot 10^{-7}$ ;  $8.8 \cdot 10^{-7}$ ],  $K^+$  [ $1.3 \cdot 10^{-7}$ ;  $9.3 \cdot 10^{-6}$ ];  $PO_4^{3-}$  [ $2.4 \cdot 10^{-7}$ ;  $5.3 \cdot 10^{-6}$ ]. D'après Raynaud et al. (2004).

Le même type de formalisme consistant à adapter un modèle de prélèvement dans le cas de la compétition au sein de communautés plurispécifiques a été utilisé par Craine et al. (2005). Ces auteurs l'ont appliqué afin d'évaluer la théorie de Tilman (1988) dans le cas de N.

Les conclusions sont en accord avec celles de Raynaud et Leadley (2004), à savoir que la prise en compte du transport diffusif des nutriments dans le sol implique que ce soit l'influence des individus sur la concentration en nutriments proche de la racine qui influence le prélèvement respectif des individus en compétition. Ceci remet en cause la théorie fondée sur le concept de  $R^*$  de Tilman. Craine et al. (2005) parlent alors de « préemption » comme capacité d'un individu à capturer une partie des nutriments transportés par diffusion à proximité et vers les racines d'un individu voisin. Raynaud et Leadley (2004), en revanche, ne rejettent pas les conclusions de Tilman (1988) mais en font un cas particulier correspondant à une valeur de « diffusive supply » élevée.

L'évolution des modèles de compétition vers une prise en compte de la dynamique des nutriments dans le sol et des phénomènes de diffusion permet de clarifier les facteurs contrôlant le partage des ressources entre individus à l'équilibre, ce partage étant fonction de facteurs comme l'occupation de l'espace par les racines ainsi que leur capacité de prélèvement. Concernant l'influence respective des individus, Raynaud et Leadley (2004) concluent que l'acquisition d'un nutriment par un individu est seulement ou exclusivement influencée par son plus proche voisin dans la majorité des cas. Néanmoins, dans ce cas de figure, seule l'influence du prélèvement est prise en compte et non pas la capacité des plantes à augmenter la disponibilité d'un nutriment.

#### **II.4. Partage de la ressource en nutriment et facilitation**

Contrairement à la compétition, longtemps considérée comme le principal déterminant de l'assemblage des communautés et du fonctionnement des écosystèmes, le concept de facilitation et ses mécanismes n'ont été pris en compte que récemment en écologie et restent peu documentés. De nombreuses définitions ont été proposées mais de manière générale, la facilitation est opposée à la compétition en considérant uniquement la nature positive ou négative de la réponse de la plante. Selon, l'approche proposée par Callaway (1995), l'effet de l'individu sur la disponibilité de la ressource est pris en compte. La facilitation correspond alors à l'amélioration des performances d'un individu suite à l'augmentation de la disponibilité de la ressource par un individu voisin suite à une modification de son environnement. Dans cette définition, la nature de la ressource n'est pas prise en compte. Dans le cas du partage d'un nutriment la facilitation entre espèces peut être définie comme l'ensemble des mécanismes induisant une augmentation de sa disponibilité par un individu amenant à un accroissement du prélèvement par un individu voisin, donc de la biodisponibilité du nutriment. Il est ainsi pris en compte la capacité des racines à augmenter la disponibilité d'un nutriment en modifiant les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du sol. Callaway (1995) parle alors de facilitation qui peut être directe lorsque la disponibilité est modifiée par l'activité de la racine et/ou indirecte *via* l'activité d'autres organismes (*e.g.* microorganismes). Cette définition ne considère pas les augmentations possibles de biodisponibilité suite à la différenciation de niche même si la distinction expérimentale reste difficile (Loreau et Hector, 2001). Afin de

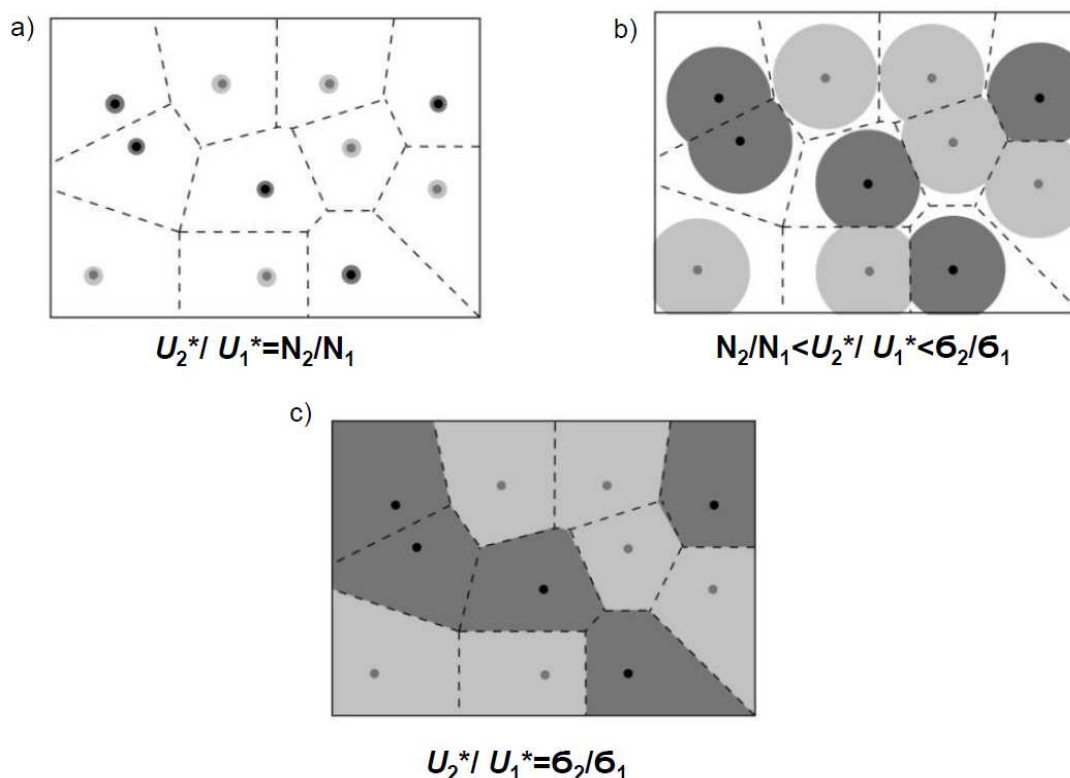
déterminer les mécanismes de facilitation il est ainsi nécessaire d'intégrer l'effet de l'augmentation de disponibilité d'un nutriment par une espèce sur son partage avec les espèces voisines, autrement dit comment l'accroissement de la disponibilité d'une ressource peut modifier son partage (*i.e.* compétition) et aboutir *in fine* à la facilitation.

Comme dans le cas du partage, la facilitation ne peut avoir lieu que si les zones d'influence des espèces se superposent. L'évaluation de l'extension radiale de ces zones (*i.e.* la rhizosphère) ne se limite pas à la zone d'appauvrissement comme évoqué dans le cas du partage, mais s'étend à la distance affectée par les racines. Pour qu'une espèce puisse bénéficier de l'augmentation de disponibilité induite par l'activité racinaire d'une espèce voisine et donc que la facilitation ait lieu, il est nécessaire que cette activité se déroule dans la zone affectée par le prélèvement de la racine de l'espèce facilitée. L'influence des modifications des propriétés physiques dans la rhizosphère sur la facilitation sera considérée de manière indirecte *via* les différences de gradients de potentiel hydrique qui en résultent dans la rhizosphère et leur effet sur le transport par diffusion. Dans le cas des modifications des propriétés chimiques, en plus du processus de prélèvement qui influence la concentration en ions, les racines impactent la disponibilité des nutriments *via* l'exsudation de composés divers. Ces composés sont transportés dans la solution du sol par diffusion et sont caractérisés par leur durée de vie dans le sol (Hinsinger et al., 2005 ; Raynaud et al., 2008). L'ensemble de ces éléments est donc nécessaire à prendre en compte afin d'évaluer l'effet d'une augmentation de disponibilité par une espèce sur le partage du nutriment amenant à l'augmentation de sa biodisponibilité.

À l'heure actuelle, seuls Raynaud et al. (2008) ont modélisé l'effet de cette augmentation de disponibilité sur le partage d'un nutriment. Ces auteurs ont considéré le cas de l'exsudation de composés chimiques par les racines. Les simulations sont réalisées dans le cas de l'exsudation d'un anion organique, le citrate, et son effet sur le partage du P. Le modèle dérive de celui proposé par Raynaud et Leadley (2004), présenté précédemment, concernant le partage d'un nutriment ou la compétition. Les auteurs ont intégré au modèle initial de diffusion des nutriments et de prélèvement par la plante, la diffusion d'autres solutés exsudés par les racines ainsi que la possibilité de simuler des variations de disponibilité par ces composés en prenant plus explicitement en compte l'effet du contenu en eau. Ces solutés sont également caractérisés par une durée de demi-vie. La répartition des racines des espèces et leurs zones d'occupation de l'espace restent représentées par des polygones de Thiessen. Ainsi, le formalisme utilisé par les auteurs permet de tester l'effet de l'exsudation d'un soluté par des racines pour plusieurs valeurs de diffusion et de durée de demi-vie (s'agissant d'exsudats organiques susceptibles d'être décomposés par les microorganismes) sur la disponibilité du nutriment et son partage. Raynaud et al. (2008) considèrent dans leurs simulations que le citrate exsudé par les racines augmente la disponibilité du P et évaluent l'effet de l'exsudation par une ou les deux espèces associées sur le partage du nutriment. Dans le cas des agroécosystèmes plurispécifiques, l'intérêt est particulièrement porté sur la présence d'une seule espèce dite « facilitatrice » capable d'exsuder le citrate. Les simulations concernant l'exsudation par une seule des espèces



montrent l'importance de la durée de vie du soluté exsudé sur le partage du nutriment dans le cas de faibles valeurs de « diffusive supply » (*i.e.* teneur en eau faible). Dans le cas où l'exsudat diffuse peu car présente une durée de demi-vie faible, ce qui est assez caractéristique du citrate dans de nombreux sols, l'augmentation de disponibilité est réduite à une zone proche de la racine. Elle n'affecte alors pas le prélèvement des racines de l'espèce voisine, située le plus souvent au-delà de la zone de diffusion du citrate. Il n'y a donc pas de facilitation. Plus la demi-vie de l'exsudat augmente plus l'espèce n'exsudant pas voit son prélèvement augmenter traduisant l'établissement de facilitation. Pour des valeurs de « diffusive supply » élevées (*i.e.* teneur en eau élevée) la demi-vie du soluté exsudé n'affecte pas les interactions, l'augmentation de disponibilité qui résulte de l'exsudation de citrate influence l'ensemble des racines des deux espèces végétales associées, se traduisant par une facilitation de l'espèce qui n'exsude pas de citrate. Dans ces conditions, le partage du nutriment est alors déterminé par la part relative de l'occupation de l'espace et de la capacité de prélèvement des racines. Les résultats des simulations mettent ainsi en évidence l'importance de la proximité des racines sur le degré de recouvrement des zones influencées par les racines (*i.e.* leurs rhizosphères) et *in fine* sur les interactions possibles entre les deux espèces végétales. La figure 1.10 traduit l'effet du degré de recouvrement des rhizosphères dans le cas de l'exsudation de solutés augmentant la disponibilité en nutriment par les racines des deux espèces pour de faibles valeurs de « diffusive supply ». Dans le cas où l'exsudat racinaire diffuse peu (Fig. 1.10a) ils restent concentrés autour des racines il n'y a pas de compétition et le prélèvement dépend du nombre (*i.e.* densité) de racines de chaque espèce. Pour un taux de dégradation faible (Fig. 1.10c), les exsudats se propagent et augmentent la disponibilité en nutriment de l'ensemble du sol il y a alors compétition entre les espèces et le partage est déterminé par l'occupation respective de l'espace des racines des espèces. La figure 1.10b représente le cas intermédiaire, la densité des racines, l'occupation de l'espace et le degré jusqu'où la rhizosphère s'étend au-delà des limites des polygones de Thiessen détermine le partage du nutriment entre les espèces. Comme précédemment évoqué, la figure 1.10c correspond également au cas où la valeur du « diffusive supply » est élevée (*i.e.* contenu en eau élevé). Raynaud et al. (2008) généralisent leur modèle à différents exsudats et nutriments à l'exception des protons qui ont un coefficient de diffusion très élevé et supposé systématiquement affecter la disponibilité du nutriment pour l'ensemble des espèces végétales associées. Dans le cas d'une augmentation de la facilitation indirecte, via les microorganismes, il serait nécessaire de prendre en compte une étape supplémentaire dans l'analyse qui serait l'effet de leur activité sur la disponibilité d'un nutriment. Cet effet complexe est peu documenté et reste encore à déterminer (Raynaud et al., 2008).



**Figure 1.10.** Effet du degré de recouvrement des rhizosphères sur le partage d'un nutriment dans le cas où les deux espèces exsudent un soluté permettant l'augmentation de la disponibilité pour de faibles valeurs de « diffusive supply ». Le gris clair et foncé distinguent respectivement l'étendue de la zone affectée respectivement par l'exsudat de chaque espèce (*i.e.* étendue de la rhizosphère). Les lignes en pointillé indiquent les polygones de Thiessen entourant chaque racine. Les différents scénarios correspondent à : une propagation restreinte de l'exsudat (a), une propagation supérieure au plus petit polygone de Thiessen (b), une propagation supérieure au plus grand polygone de Thiessen (b). Pour l'espèce  $i$  prélèvement à l'équilibre  $U_i^*$ , nombre de racines  $N_i$ , occupation par les racines. D'après Raynaud et al. (2008)

Les études des différents auteurs ont mis en évidence l'importance de l'occupation de l'espace par les racines et de leur capacité de prélèvement dans le partage d'un nutriment, ainsi que des processus rhizosphériques susceptibles de modifier sa disponibilité. Les travaux de Raynaud et collaborateurs ont abouti à la prise en compte des caractéristiques du nutriment et du sol dans les mécanismes d'acquisition par deux espèces fonctionnellement différentes. Néanmoins, différents points restent encore à développer afin d'appréhender les déterminants du partage des nutriments entre individus et les traits racinaires impliqués. Pour cela, il serait nécessaire de pouvoir prendre en compte l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la rhizosphère, ainsi que celle de la répartition des ressources. L'évaluation dynamique des interactions et non pas uniquement l'étude à l'équilibre permettrait de prendre en compte la plasticité des racines, autrement dit leur réponse à des variations de l'environnement abiotique et biotique. En outre, la biodisponibilité de P est gouvernée parfois par l'interaction de plus de deux processus rhizosphériques, comme l'ont montré les travaux de Devau et al. (2010, 2011), ce dont le modèle de Raynaud et al. (2008) ne peut rendre compte (Hinsinger et al., 2011). De plus les modèles présentés ci-dessus restent théoriques et n'ont pu être confrontés à des données expérimentales.

### III. Interactions entre espèces pour l'acquisition d'un nutriment : diversité des traits racinaires

L'évolution des modèles de compétition vers une prise en compte de la dynamique des nutriments dans le sol et des phénomènes de diffusion permet de clarifier les facteurs contrôlant le partage d'un nutriment entre espèces. Alors qu'il est admis que l'occupation de l'espace par les racines et leur capacité de prélèvement influencent le partage, il a récemment été pris en compte la capacité des racines à augmenter la disponibilité d'un nutriment. Ce partage est alors supporté par différents traits racinaires déterminant la géométrie de la rhizosphère et ses propriétés. La diversité des traits racinaires observée suivant les espèces et les géotypes permettrait la différenciation du partage d'un nutriment et/ou l'augmentation de sa disponibilité et ainsi aboutir à une augmentation de l'acquisition d'un nutriment dans le cas d'associations d'espèces judicieusement combinées (*i.e.* présentant des traits différents) en comparaison de leur culture monospécifique.

#### III.1. Concepts

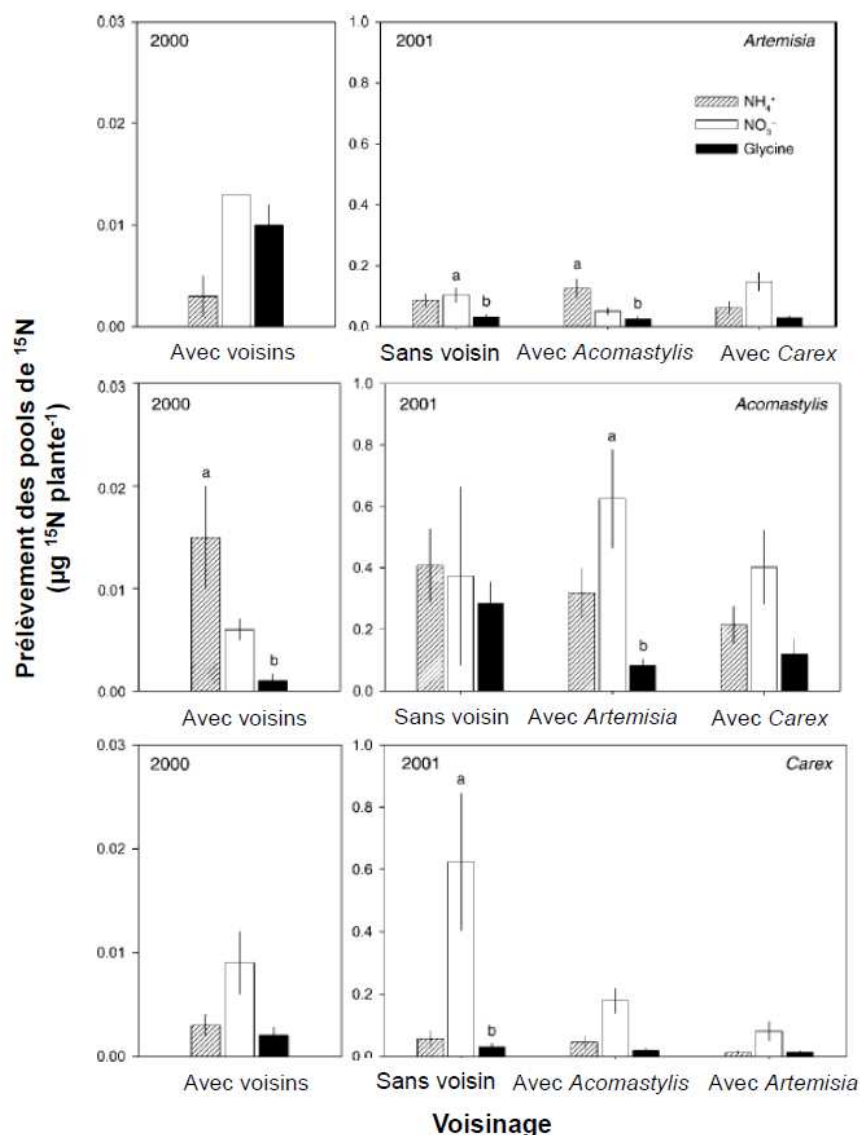
##### III.1.1. Diversité des traits racinaires et acquisition d'un nutriment entre espèces

Il est proposé que l'amélioration de la valorisation d'un nutriment du sol par les espèces en association soit liée à une augmentation du volume de sol exploré et exploité par les espèces en comparaison de leurs cultures monospécifiques. Autrement dit la diversité des traits racinaires pourrait permettre de diminuer l'intensité de la compétition entre espèces en : (i) diminuant l'intensité des interactions liée au degré de recouvrement des rhizosphères (*e.g.* séparation de niche d'un point de vue spatial) et/ou (ii) augmentant la disponibilité d'un nutriment (*i.e.* facilitation). La géométrie de la rhizosphère d'une espèce est déterminée par des traits relatifs à l'occupation de l'espace par les racines et à leur fonctionnement biologique (*i.e.* processus rhizosphériques). Une grande majorité des études considérant que l'acquisition d'un nutriment est uniquement déterminée par le prélèvement ont été amenées à proposer trois types de différenciation. L'amélioration de l'acquisition des nutriments serait ainsi liée à la diversité des traits racinaires permettant la différenciation dans le temps, dans l'espace et selon les « formes » prélevées du nutriment considéré (Fridley, 2001 ; Mc Kane, 2002 ; von Felten et al., 2009). La différenciation spatiale et temporelle du prélèvement fait référence à la dynamique spatiale et temporelle des traits racinaires. La différenciation des « formes » prélevées fait, elle, référence aux capacités des espèces à prélever différentes formes chimiques d'un même nutriment. Ce raisonnement peut être étendu aux différents traits racinaires influençant les processus biogéochimiques déterminant la disponibilité et permettant d'accéder à différentes « fractions » d'un même nutriment dans le sol et donc correspondant aux processus rhizosphériques.

##### III.1.2. Diversité des traits racinaires et plasticité

Les traits racinaires sont spécifiques d'une espèce ou d'un géotype au sein d'une espèce, mais peuvent répondre aux modifications de l'environnement abiotique et biotique au niveau de l'individu, en fait de son phénotype. La présence d'un individu voisin peut ainsi

modifier les caractéristiques des traits racinaires. Selon Callaway et al. (2003) ces modifications peuvent être induites de manière permanente ou être dynamiques à une échelle temporelle (*e.g.* de l'ordre de l'heure). Il a ainsi été mis en évidence que concernant la répartition des racines qu'un même individu pouvait augmenter leur densité, la diminuer ou encore ne pas induire de réponse en présence d'un individu voisin (Callaway et al., 2003 ; Schenk, 2006 ; Gonkhamdee et al., 2010 ; Cahill et Mc Nickle, 2011). D'un point de vue évolutif/adaptatif, ces différents types de développement ont été désignés respectivement comme stratégies de « confrontation », d'« évitement » et « neutre ou de tolérance » (Novoplansky, 2009 ; Herben et Novoplansky, 2010). Il existe ainsi de nombreux exemples dans la littérature (*e.g.* de Kroon, 2007). Dans le cas d'espèces cultivées, Li et al. (2006) ont observé que la réponse du maïs variait suivant l'espèce associée. Fang et al. (2011) en étudiant la croissance des racines du soja (*Glycine max* L.) associé à différentes variétés de maïs dans du gel permettant ainsi une répartition homogène des nutriments, ont également mis en évidence que les racines des deux espèces avaient tendance à s'éviter ou, au contraire à se superposer suivant la variété de maïs après 12 jours de croissance. Les mécanismes induisant cette plasticité restent encore indéterminés (Gruntman et Novoplansky, 2004). Il a longtemps été considéré que cette plasticité en présence d'un individu voisin était induite par une modification de la disponibilité des ressources (*e.g.* eau, nutriments). Certains cas des études ont néanmoins mis en évidence que les réponses des plantes semblaient spécifiques de l'identité du voisin et indépendantes de la disponibilité laissant supposer d'autres mécanismes comme l'implication de molécules allélopathiques (Callaway et al., 2003 ; Hodge, 2004 ; Schenk, 2006 ; de Kroon, 2007). Il a également été proposé l'implication d'organismes du sol, macro- et microorganismes comme intermédiaires à ces interactions entre plantes comme synthétisé par de Kroon et al. (2012). Dans le cas des interactions faisant intervenir des champignons mycorhiziens il a été proposé que les hyphes permettent de transférer des nutriments d'un appareil racinaire à un autre jouant ainsi le rôle de pont (Yao et al., 2003 ; Wilson et al., 2006 ; Meding et Zasoski, 2008 ). Les précédents exemples sont relatifs à répartition des racines dans l'espace mais la différenciation peut également concerner les formes chimiques prélevées comme cela a été montré pour N dans le cas d'écosystèmes prairiaux (Miller et al., 2007 ; Ashton et al., 2010 ). Miller et al. (2007) après marquage au <sup>15</sup>N de différentes formes chimiques d'azote ont ainsi pu observer une modification du prélèvement des espèces suivant l'identité de la plante voisine (Fig 1.11). Néanmoins, la mise en évidence de ces phénomènes et l'évaluation de leur impact sur le partage des nutriments entre espèces restent encore mal connues et débattues (Semchenko et al., 2007 ; Sanon et al., 2009).

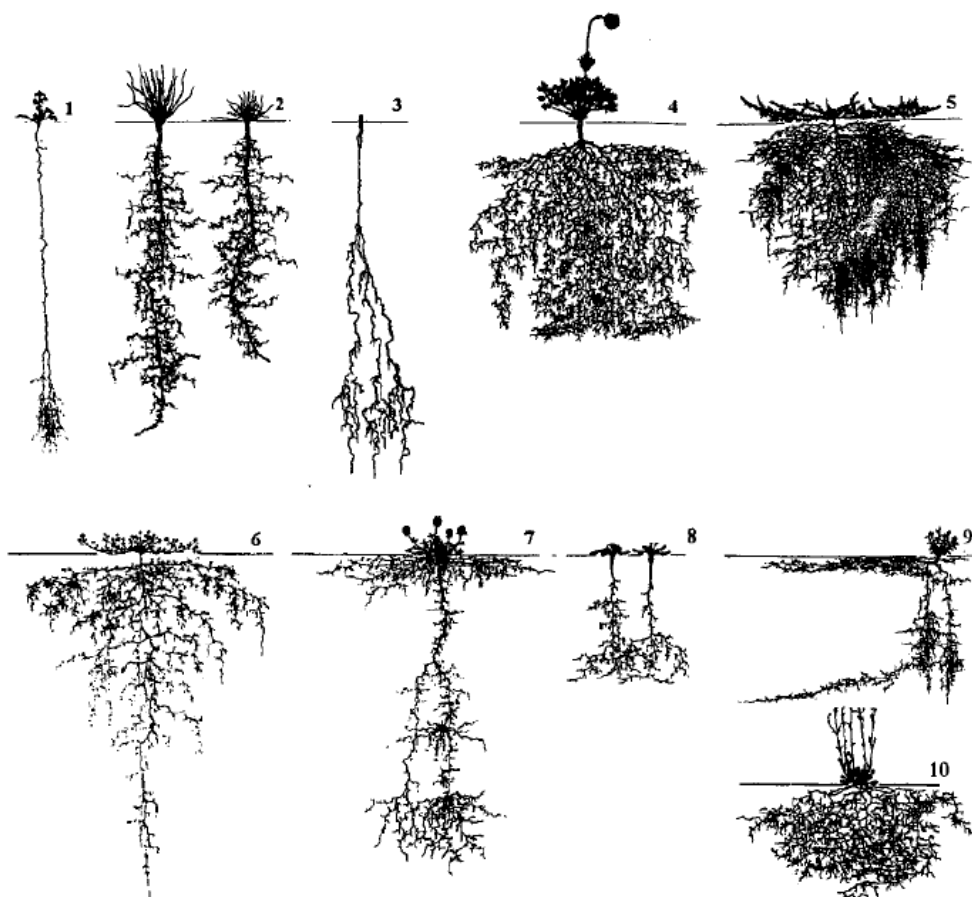


**Figure 1.11.** Effet de l'identité de différents voisins sur le prélèvement de  $^{15}\text{N-NH}_4^+$ ,  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  et  $^{15}\text{N-glycine}$  (mesures  $^{15}\text{N}$  parties aériennes + racines) pour trois espèces de prairies alpines sèches. Durant l'année 2000 le voisinage des espèces n'a pas été modifié. En 2001 le voisinage a été modifié pour pouvoir évaluer l'effet de l'identité d'un voisin particulier. Les moyennes  $\pm$  SE sont indiquées. Les lettres indiquent les différences significatives différents suivant les voisins ( $P < 0.05$ ). La différence des axes y entre 2000 et 2001 est liée à la modification du taux d'application de  $^{15}\text{N}$ . D'après Miller et al. (2007).

### III.2. Traits racinaires et occupation de l'espace

L'occupation respective de l'espace par les racines des espèces associées est considérée comme un des facteurs contrôlant le partage des ressources. Elle est déterminée par la densité racinaire (*i.e.* abondance en biomasse ou longueur), la morphologie des racines et leur répartition dans l'espace (*i.e.* l'architecture racinaire). Cette dernière est souvent complexe et peut présenter une grande variabilité suivant les espèces et les génotypes comme illustré par les travaux de Kutschera et Lichtenegger (1992) dans le cas d'espèces prairiales (Fig. 1.12). L'évaluation de cette ségrégation racinaire dans les communautés plurispécifiques a fait l'objet de nombreuses études. Différentes méthodologies sont

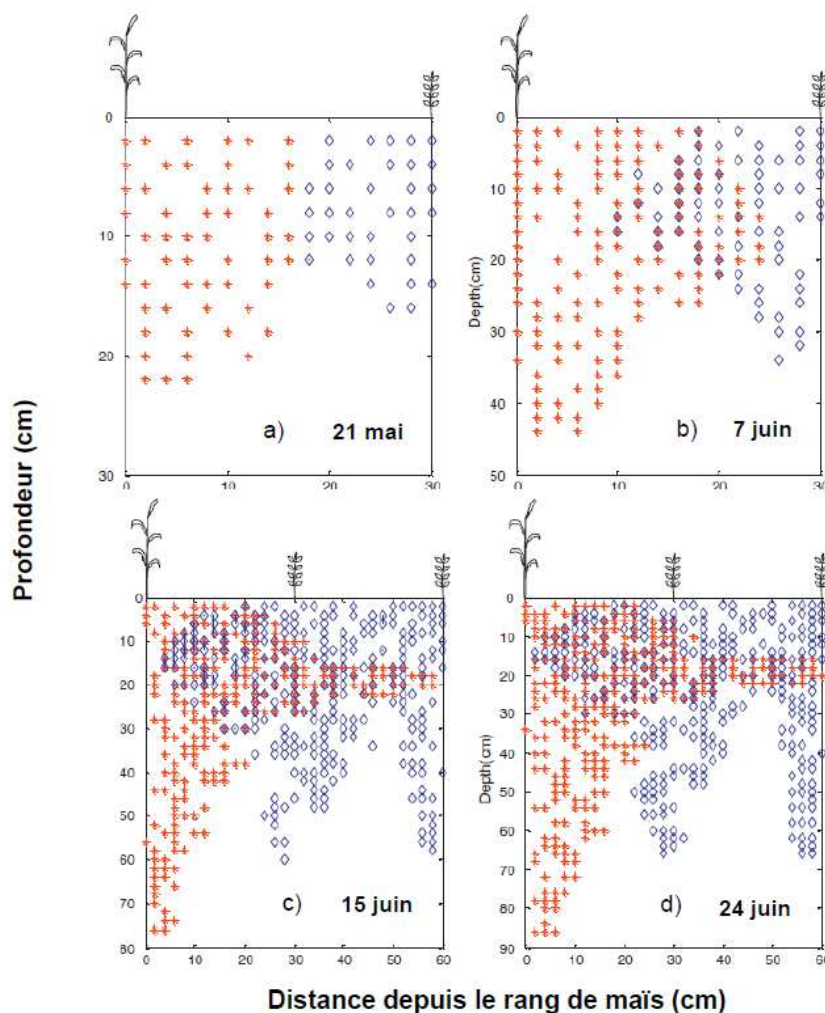
utilisées pour évaluer le positionnement des racines (voir Cahill et McNickle, 2011). Une majorité des publications sont relatives à des excavations permettant le comptage, les mesures de biomasse ou de longueur des racines fines. La densité racinaire est exprimée en biomasse ou longueur en fonction de la profondeur ou de la distance à l'axe racinaire principal. Les mesures de densité racinaire se focalisent le plus souvent sur un type de racines, par exemple les racines fines (*i.e.* diamètre  $\leq 1$  à 2 mm) qui sont supposées être plus importantes dans le prélèvement des nutriments (Gordon et Jackson, 2000 ; Robinson, 2001). Néanmoins la prise en compte plus fréquente de l'augmentation de la surface racinaire par des morphologies particulières (*e.g.* poils racinaires, mycorhizes) permettrait d'évaluer plus précisément l'effet de l'association d'espèces sur l'exploration du sol et, *in fine*, sur l'acquisition des nutriments. Jusqu'à présent des difficultés concernant la différenciation des racines des espèces ont limité les études à des assemblages de deux espèces mais le développement récent de nouvelles techniques d'identification a permis de considérer un nombre plus important.



**Figure 1.12.** Exemple de variation de l'architecture racinaire de différentes dicotylédones prairiales. *Eryngium campestre*, 1; *Scorzonera villosa*, 2; *Chondrilla juncea*, 3; *Pulsatilla pratensis*, 4; *Genista germanica*, 5; *Trigonella balansae*, 6; *Trifolium tricocephalum*, 7; *Carum caucasicum*, 8; *Onosma arenarium*, 9; *Silene otites*, 10. D'après Kutshera et Lichtenegger, (1992).

La répartition des racines a été rapportée dans différents écosystèmes naturels et cultivés. Dans le cas d'assemblages de deux espèces, la majorité des publications rapportent

une ségrégation verticale et/ou horizontale des racines entre espèces. La répartition est souvent modifiée dans l'association à l'avantage d'une espèce qui augmente sa densité racinaire verticalement et/ou horizontalement permettant ainsi de prospector de nouveaux horizons du sol. Cela a été mis en évidence dans le cas de l'association de céréales et de légumineuses (Hauggaard-Nielsen et Jensen 2001 ; Corre-Hellou et Crozat 2005 ; Li et al., 2006 ; Gao et al., 2010). Gao et al. (2010) se sont intéressés au développement des racines d'espèces en association et leur positionnement dans le profil de sol et ont observé que les racines de maïs avaient tendance à se développer sous celles du soja associé. La figure 1.13 représente la cartographie des racines permettant d'observer la distribution des racines des espèces en association au cours du temps. Li et al. (2006) se sont eux intéressés à l'association blé tendre (*Triticum aestivum* L.)-soja. Ils ont pu observer des comportements similaires, les racines de la céréale se développant sous celles de la légumineuse. Néanmoins, la majorité de la densité racinaire reste située dans les horizons supérieurs du sol.



**Figure 1.13.** Cartographie des racines du maïs et du soja en association au cours du temps. Les deux espèces ont été semées le 16 avril 2008. D'après Gao et al. (2010).

Des observations similaires ont été faites sur des arbres en forêt naturelle entre le hêtre (*Fagus Sylvatica* L.) et le chêne (*Quercus petraea* L.) ou l'épicéa (*Picea abies* L.) (Leuschner et al., 2001 ; Schmid et Kazda, 2002), et dans le cas de plantation d'acacia (*Acacia mangium* L.) et d'eucalyptus (*Eucalyptus mangium* L.) (Da Silva et al., 2009). Les travaux de ces auteurs ont ainsi mis en évidence que les racines d'acacia poussaient d'avantage en profondeur en présence d'eucalyptus qu'en plantation monospécifique. L'étude de la ségrégation des racines a été récemment étendue au cas de peuplements de plus de deux espèces afin de tester l'hypothèse d'une amélioration des performances avec la diversité liée à une augmentation de l'exploration du volume de sol par les espèces et en particulier une augmentation de la profondeur d'enracinement. Ainsi dans le cas d'une expérimentation de biodiversité sur des prairies, Mommer et al. (2010) ont observé une augmentation de la densité des racines avec la diversité, par rapport aux performances des espèces en culture monospécifique, et une modification de la répartition verticale de la densité des racines fines de chaque espèce suivant le niveau de diversité. À l'échelle de l'association d'espèce ils n'observent néanmoins pas de variation de la profondeur moyenne d'enracinement avec la diversité. Par contre, les racines ont plutôt tendance à s'accumuler dans l'horizon supérieur du sol. Ces résultats confirment l'étude de von Felten et al. (2008) sur des prairies et ont aussi été observés dans le cas de forêts tempérées (Meinen et al., 2009).

Que l'on se place dans le cas d'assemblages de deux espèces ou plus, le volume de sol est ainsi colonisé de manière différente suivant les espèces et semble dépendre de l'identité de la ou des espèce(s) associée(s). L'hypothèse d'augmentation de la profondeur d'enracinement et/ou de l'extension horizontale des racines dépend des caractéristiques abiotiques et biotiques des systèmes étudiés comme la distribution des ressources (*e.g.* eau, nutriments), de la densité du sol et aussi l'identité et de l'arrangement spatial des espèces (*e.g.* densité de semis). Dans les systèmes étudiés, les racines s'accumulent préférentiellement dans les horizons supérieurs, *i.e.* dans la zone généralement considérée comme la plus riche en nutriments (Jobbágy et Jackson, 2001 ; Casper et al., 2003, Callaway et al., 2003). Cette constatation est confirmée par la méta-analyse réalisée par Schenk et Jackson (2002) sur une grande variété d'écosystèmes qui montre que 50% de toutes les racines sont situées dans les premiers 30 cm de sol dans 85% des profils étudiés et que la densité la plus importante est située dans les 20 premiers cm dans environ 95% des cas. Ces auteurs soulignent toutefois que ces valeurs pourraient être réévaluées dans le cas de l'étude des horizons profonds et non pas uniquement ceux superficiels.

Dans les zones de forte densité racinaire, la distance entre les racines est souvent inférieure au centimètre laissant supposer un degré de recouvrement important des zones d'influence des espèces et ainsi des interactions rhizosphériques substantielles. Il paraît donc intéressant d'étudier les interactions pour l'acquisition des nutriments se déroulant dans ces zones de forte densité racinaire. L'évaluation de l'importance respective sur le prélèvement total de ces régions de forte densité par rapport à celle où les interactions entre espèces sont plus faibles voire nulles permettrait une meilleure compréhension de l'acquisition d'un nutriment dans le cas des associations. L'étude actuelle de ces zones de



forte densité racinaire reste limitée. En effet la plupart des publications donnent des informations en termes de densité de racines fines qui n'indiquent pas la structure de la répartition des racines permettant d'évaluer le degré de recouvrement des zones influencées par les racines des espèces. Ce dernier type d'observations est possible *in situ* avec l'utilisation de rhizotrons ou de chambres d'observation des racines. Caldwell et al. (1996) ont ainsi pu observer à l'échelle du cm voire du mm que dans ces zones de forte concentration en nutriments, la ségrégation des racines d'armoise (*Artemisia tridentata* L.) et de graminées (*Pseudoroegneria spicata* L. et *Agropyron destorum* L.). L'observation fine de la répartition des racines peut aussi être effectuée en conditions artificielles par l'intermédiaire de rhizobox ; Gondkhamdee et al. (2010) ont ainsi montré une tendance des racines de maïs à se développer préférentiellement à proximité des racines de l'hévéa (*Hevea brasiliensis* L.) associé. Cette échelle d'étude de l'ordre du centimètre voire du millimètre, semble alors d'autant plus intéressante à développer afin d'améliorer la compréhension des interactions racinaires pour l'acquisition de nutriments. Fang et al. (2011) sont allés plus loin dans la compréhension de l'effet de l'association d'espèces sur la structure des appareils racinaires en proposant une méthode permettant d'observer la dynamique de croissance des racines d'espèces en association. Les plantes ont ainsi été cultivées dans des cylindres remplis de gel transparent et le développement racinaire suivi à l'aide de scans permettant de construire des images en 3D. Cette approche prometteuse d'observation du développement racinaire en 3D d'espèces en association reste encore marginale et nécessiterait d'être développée.

### III.3. Traits racinaires et processus rhizosphériques

Il a été proposé que les espèces ou génotypes se différencient également suivant les « formes », ou des espèces chimiques des nutriments qu'elles prélèvent (Fridley, 2001 ; Mc Kane et al., 2002). Cette hypothèse a dans un premier temps été formulée en référence à N. En effet, ce nutriment est réparti dans différents pools dans le sol, organiques (*e.g.* acides aminés, protéines) et inorganiques ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ ), mais il peut également être prélevé dans le pool atmosphérique dans le cas des plantes réalisant une symbiose avec des bactéries fixatrices de  $\text{N}_2$ . L'exemple type de cette différenciation d'exploitation des différents pools de N suivant les espèces est celui des associations comprenant une légumineuse fixatrice d'azote. Les augmentations de l'acquisition de N observées dans le cas des associations céréale-légumineuse en comparaison des espèces en culture monospécifique ont ainsi été attribuées à la différenciation des pools de N exploités. Il a ainsi été proposé que la capacité des légumineuses à prélever le N dans le pool atmosphérique permette d'augmenter la disponibilité totale du N et ainsi de diminuer la compétition pour le N du sol. Il a également été observé que le taux de fixation de la légumineuse associée à la céréale était supérieur à celui de la légumineuse en culture monospécifique (Corre-Hellou et al., 2006 ; Fan et al., 2006 ; Bedoussac et al., 2010). Ce phénomène tient à l'appauvrissement du sol en  $\text{NO}_3^-$  par la céréale associée, ce qui tend à réduire l'effet d'inhibition de fortes concentrations en nitrate sur la fixation symbiotique de  $\text{N}_2$  (Voisin et al., 2002 ; Li et al., 2009). Il a aussi été mis

en évidence que des espèces différentes pouvaient présenter des préférences pour différentes formes chimiques de N dans la solution du sol (Mc Kane et al., 2002 ; Miller et Bowman, 2003 ; Miller et al., 2007 ; Ashton et al., 2008, 2010). Cette différenciation du prélèvement de N a été observée suite à l'injection de N inorganique ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) et/ou organique (glycine) marqués au  $^{15}\text{N}$ . Un mécanisme supplémentaire a également été proposé pour expliquer l'amélioration de l'acquisition de N par les associations céréale-légumineuse. Ce mécanisme consiste au transfert direct de N d'une espèce à l'autre suite à la minéralisation de rhizodépôts riches en N et fait ainsi référence à la capacité des plantes à modifier la disponibilité d'un nutriment dans leur rhizosphère. Si dans un premier temps ce transfert a été observé de la légumineuse vers la céréale, il a été proposé que le transfert peut se faire dans les deux sens (Jensen, 1996 ; Fustec et al., 2010). Les travaux de Xiao et al. (2004) permettent de mettre en évidence l'importance de la proximité des racines pour l'observation de la facilitation via le transfert de N. Néanmoins la mise en évidence de ces processus reste difficile, ainsi que l'évaluation de leurs effets sur l'acquisition de N.

Ces observations concernant la différenciation des espèces et génotypes à modifier la disponibilité de différentes formes de N a été proposée dans le cas d'autres nutriments. En effet d'autres nutriments tels que le P ou le soufre peuvent être sous forme deux pools, inorganique et organique respectivement. En outre, le pool inorganique de la plupart des nutriments rassemble des formes ioniques susceptibles d'être associées à différentes phases solides minérales et/ou organiques. Les processus biogéochimiques permettant le transfert des ions entre ces phases solides et la solution du sol déterminent la disponibilité du nutriment. Ces processus biogéochimiques sont susceptibles d'être fortement influencés par différents processus rhizosphériques mis en place par les plantes dont les caractéristiques sont reconnues pour présenter des variations suivant les espèces ou génotypes (Rengel et Marschner, 2005). Il a ainsi été proposé que cette différenciation explique les améliorations de l'acquisition d'un nutriment observées dans le cas d'associations d'espèces. Dans le cas du Fe pour des sols calcaires où ce nutriment est très peu disponible, il a été mis en évidence que la facilitation de l'acquisition de Fe d'une espèce non graminée était liée à la sécrétion de phytosidérophores par la graminée associée (Zuo et al., 2000 ; Cesco et al., 2006 ; Zuo et Zhang, 2008). Dans ce cas la différenciation entre les deux espèces est claire, une seule étant capable de sécréter le composé chimique capable de modifier de manière substantielle la disponibilité en Fe. La différenciation des processus rhizosphériques et leur influence sur l'acquisition par l'association d'espèces d'un nutriment a également été étudiée dans le cas du P. La diversité des processus rhizosphériques selon les espèces et génotypes peut être suivie indirectement par des mesures, au niveau de la rhizosphère, de la répartition des ions phosphates suivant différentes fractions. La mise en évidence expérimentale reste cependant peu documentée. Cu et al., (2005) ont observé que le blé dur (*Triticum aestivum durum* L.) et le lupin blanc en association exploitaient différentes fractions de phosphore inorganique. Ces observations ont été relayées par l'analyse de l'évolution de différentes fractions organiques et inorganiques de phosphore effectuée par Li et al. (2008) au niveau de la rhizosphère d'une association blé dur-haricot. Ces auteurs ont pu mettre en évidence

une différence d'acquisition du P entre ces deux espèces pour les pools inorganique et organique. Cependant, l'interprétation des mécanismes responsables des variations selon les fractions de P correspondant à ces différents pools reste complexe.

#### III.4. Traits racinaires et dynamique temporelle

Les espèces peuvent présenter des différences de vitesse de croissance ainsi que des besoins nutritionnels contrastés au cours du temps. Ces caractéristiques influencent l'occupation de l'espace par les racines ainsi que l'intensité des processus rhizosphériques. Dans le cas de l'occupation de l'espace par les racines, une espèce présentant une vitesse de croissance plus importante que celle associée est supposée avoir accès à des volumes de sol encore inexplorés et, ainsi, à une quantité de nutriments disponibles plus importante. Les différences phénologiques peuvent induire des différences de prélèvement dans le temps d'une ressource (Hooper, 1998), comme évoquées pour l'eau (Schenk, 2006). Le cas des nutriments a aussi été étudié mais essentiellement pour l'acquisition de N dans des écosystèmes prairiaux. Il a ainsi été mis en évidence que le prélèvement des différentes fractions azotées marquées au  $^{15}\text{N}$  différaient au cours du temps suivant les espèces prairiales (Mc Kane et al., 2002 ; Fargione et Tilman 2005 ; James et al., 2008). Ce partage dans le temps a aussi été évoqué pour les écosystèmes forestiers (Ong, 1999 ; Kelty, 2005). Dans le cas des agroécosystèmes, les différences des besoins en nutriments entre espèces peuvent être manipulées afin d'améliorer l'exploitation des nutriments. Il est ainsi possible d'associer des espèces aux phénologies contrastées par exemple par la pratique de semis et récolte décalés dans le temps, comme pratiqué en Chine pour des cultures annuelles (Li et al., 2007). La minéralisation des résidus de récolte de la féverole (*Vicia faba* L.) associée au maïs a été évoquée comme mécanisme supplémentaire au décalage des besoins dans le temps pour expliquer l'amélioration du rendement observé pour la céréale récoltée dans un deuxième temps (Li et al., 1999). Dans les associations céréale-légumineuse il a également pu être observé des différences de croissance racinaire la céréale se développant plus rapidement que la légumineuse associée (Hauggard-Nielsen et Jensen, 2001 ; Corre-Hellou et Crozat 2005).

Il paraît aussi nécessaire de prendre en compte la démographie des racines (*i.e.* leur turn-over), puisqu'il est connu que l'âge des racines influence leur fonctionnement biologique donc leur prélèvement et la géométrie de leur rhizosphère. La longévité des racines est aussi influencée par leur environnement abiotique et biotique (Eissenstat et al., 2000). Les traits racinaires d'une espèce ne sont ainsi pas figés dans le temps, leurs caractéristiques évoluent et induisent une hétérogénéité fonctionnelle à l'échelle de l'appareil racinaire et influencent *in fine* la géométrie de la rhizosphère (Hinsinger et al., 2005, 2011). Cette hétérogénéité de la zone d'influence d'une espèce ainsi que son impact sur le partage des ressources sont difficiles à évaluer. La simplification de la représentation de l'ensemble des racines comme fonctionnellement identiques au sein d'un système racinaire peut limiter la compréhension du partage des ressources entre espèces.

## **IV. Influence de la disponibilité en nutriments sur les interactions entre espèces**

### **IV.1. Relations disponibilité-interactions : hypothèses**

De faibles valeurs de disponibilité d'un nutriment affectent son acquisition et ainsi le statut nutritionnel des plantes. Ce dernier affecte le fonctionnement de la plante parmi lesquels, en retour (« feedback effect »), l'acquisition des nutriments (Hinsinger et al., 2011). L'exposition à de faibles valeurs de disponibilité d'un nutriment est supposée permettre à la plante d'optimiser le prélèvement en augmentant la surface racinaire et en induisant des modifications des processus rhizosphériques. Les caractéristiques de la réponse des plantes à des variations de disponibilité d'un nutriment dépendent des espèces et des génotypes (Rengel 2002a ; Rengel et Marschner, 2005). Ces modifications du fonctionnement racinaire avec la disponibilité sont susceptibles d'influencer les interactions entre espèces. En écologie, le « stress gradient hypothesis » propose une augmentation de l'intensité ou de l'importance des interactions de type facilitation le long d'un gradient de stress environnemental : ces interactions seraient d'autant plus importantes quand la disponibilité en nutriments tend vers des valeurs faibles (Bertness et Callaway, 1994 ; Brooker et al., 2003). Cette hypothèse fait l'objet de nombreux débats en écologie, de nombreux auteurs ayant tenté de redéfinir la relation entre disponibilité et interactions (Maestre et al., 2009 ; Le Roux et Mc Goech, 2010). Selon le formalisme de Goldberg (1990), la ressource au cœur des interactions est influencée par l'environnement. Il est donc supposé que sa disponibilité influence les mécanismes d'interaction, en l'occurrence l'effet des plantes sur la ressource et leur réponse. Alors que les interactions en écologie sont exclusivement fondées sur l'analyse de la réponse des plantes à des variations de disponibilité, il paraît nécessaire de déterminer également leur effet en retour sur l'acquisition d'un nutriment.

### **IV.2. Modification de la géométrie de la rhizosphère**

Il est reconnu que la disponibilité en nutriments influence la structure de l'appareil racinaire qui est également évalué indirectement à travers les modifications de biomasse. Ainsi, l'allocation préférentielle de biomasse aux racines par rapport aux parties aériennes est une réponse largement observée chez les plantes exposées à de faibles valeurs de disponibilité de nutriments dans le sol (Wilson, 1988 ; Lynch, 2007). Ce modèle a néanmoins été nuancé suivant le type de nutriment considéré (Marschner et al., 1995) mais également par les travaux de Mollier et Pellerin (1999) montrant dans le cas du P que ces modifications étaient temporaires chez le maïs et présenteraient une réponse à court terme. Lorsque la structure de l'appareil racinaire a est prise en compte, il est reconnu que la disponibilité en nutriments influence : (i) l'extension des racines (*e.g.* longueur racinaire, diamètre), (ii) l'apparition de racines d'ordre inférieur sur les axes racinaires (*e.g.* apparition de racines latérales), (iii) la direction d'élongation de l'axe racinaire (*e.g.* angle racinaire) et (iv) la démographie des racines (*e.g.* longévité) (Lynch, 1995). De faibles valeurs de disponibilité d'un nutriment peuvent également induire des modifications de la morphologie racinaire, notamment dans le cas des poils racinaires et de racines spécialisées comme les racines protéoïdes (« cluster roots ») ou dauciformes (Hinsinger et al., 2005 ; Lynch, 2007). Le N et le P sont les

nutriments les plus étudiés pour leurs effets sur le développement racinaire. La réponse des plantes à des variations de disponibilité reste difficile à évaluer en raison des multiples interactions existant entre les racines et leur environnement abiotique et biotique, y compris la présence d'autres plantes, auxquelles il faut ajouter des difficultés méthodologiques rencontrées par les expérimentateurs pour leur évaluation (Lynch, 1995). De plus, les données disponibles sont limitées et sont relatives à un nombre restreint d'espèces et de génotypes (Forde et Lorenzo, 2001). Les auteurs s'étant intéressés à la plasticité racinaire en réponse à la disponibilité en nutriments poursuivent différents objectifs, la détermination des mécanismes (internes vs externes) et de leur importance quant à l'acquisition des nutriments, qui ne seront pas détaillés ici (pour plus de détails voir Forde et Lorenzo 2001 ; Hodge, 2009 ; Hodge et al., 2009).

#### IV.2.1. Modification de la structure et de la morphologie racinaire

##### IV.2.1.1. Modification de la longueur racinaire et du diamètre

Les modifications de la structure de l'appareil racinaire sont souvent évaluées à partir de mesures de biomasse ou de longueur racinaire des racines fines ( $\leq 1$  à  $2$  mm) permettant de calculer des traits racinaires, le « Specific Root Length » (SRL en  $\text{m g}^{-1}$  qui représente la longueur spécifique des racines (Ryser, 2006) ou des densités de racines par horizon de sol. Il a été proposé que l'extension racinaire par développement de racines plus fines (augmentation du SRL) soit une stratégie permettant aux plantes d'augmenter la surface racinaire tout en limitant le coût carbone, et ainsi faciliter l'acquisition de nutriments peu mobiles comme le P en réponse à de faibles valeurs de disponibilité. Néanmoins, l'évaluation de cette hypothèse a amené à des résultats contrastés selon l'échelle d'analyse (*i.e.* ensemble de l'appareil racinaire ou de la racine), le nutriment étudié et les espèces (Fransen et al., 1998 ; Forde et Lorenzo, 2001 ; Hill et al., 2006).

##### IV.2.1.2. Extension de racines latérales

L'extension de racines latérales a aussi été étudiée mais peu de données sont disponibles dans la littérature. La question de l'effet de la disponibilité est traitée sous deux angles d'approche suivant la répartition des nutriments. Dans le cas d'une répartition homogène de la disponibilité la plante modèle utilisée est *Arabidopsis thaliana* avec pour but une approche physiologique de l'effet de la disponibilité. Il a ainsi été mis en évidence une stimulation du développement des racines latérales pour de faibles concentration en P du milieu et dans le cas du nitrate aucun effet n'a pu être observé (Williamson et al, 2001 ; López-Bucio et al., 2003). Des résultats inverses ont été rapportés chez des espèces cultivées : diminution de l'extension de racines latérales observée chez le maïs (Mollier et Pellerin, 1999) et chez le haricot (Borch et al., 1999). Des résultats contrastés ont également été observés dans le cas de la comparaison de deux génotypes de *Bracharia*, un seul des deux répondant à la variation de disponibilité par une stimulation de l'apparition de racines latérales (Louw-Gaume et al., 2010), ou encore dans le cas de plusieurs génotypes de haricots (Lynch, 2007). En raison du faible nombre de données et de leur variabilité (*e.g.*

espèce, stade de développement observé), la détermination des mécanismes régulant la plasticité racinaire reste difficile à établir. Les résultats issus des expérimentations sur *Arabidopsis thaliana* tendent néanmoins à montrer l'existence de mécanismes impliqués dans l'interprétation des concentrations interne et externe en nutriments (López-Bucio et al., 2003 ; Gojon et al., 2009 ; Péret et al., 2011 ; Laugier et al., 2012). Plus de données sont disponibles dans le cas d'une répartition hétérogène de la disponibilité. Il a ainsi été observé l'induction de racines latérales en particulier la prolifération de racines latérales dans les zones présentant des valeurs de disponibilité en N et P élevées (Robinson, 1994 ; Forde et Lorenzo, 2002 ; Remans et al., 2006a ; Walch-Liu et al., 2006 ; Svistoonoff et al., 2007). Ce type de réponse dépend du génotype mais aussi de l'ensemble des caractéristiques de l'environnement biotique et abiotique (Hodge, 2004 ; Malamy, 2005 ; Hodge, 2009).

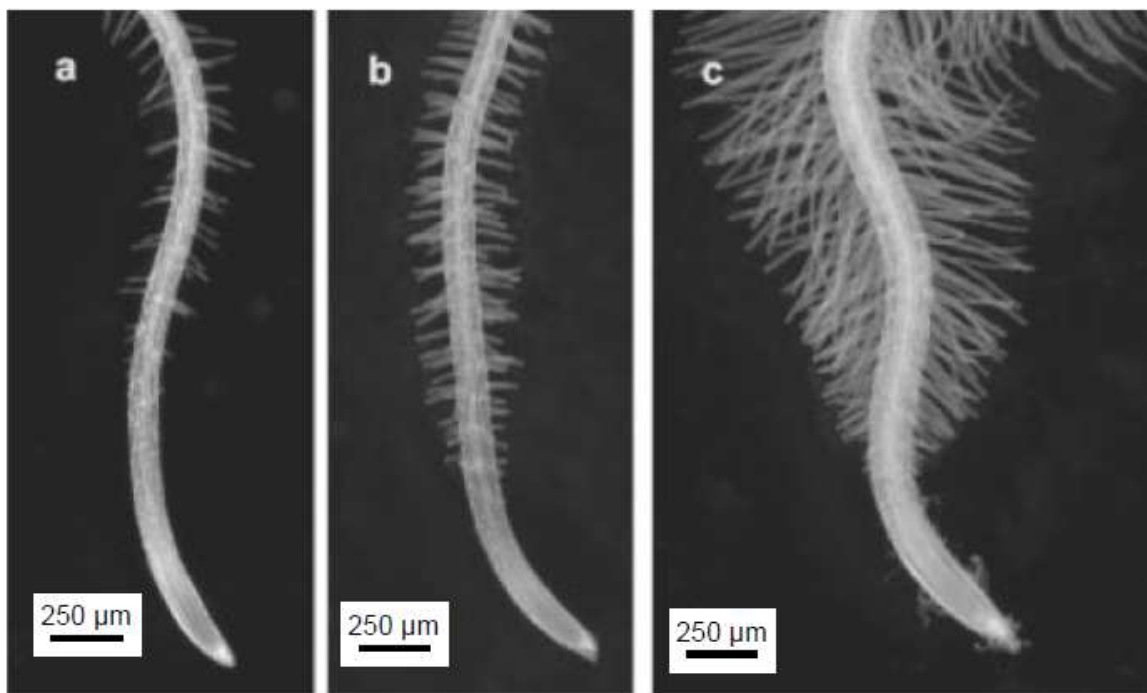
#### IV.2.1.3. Modification de l'angle racinaire

L'angle de croissance racinaire s'établit en réponse à la gravité (*i.e.* gravitropisme), et constitue un facteur déterminant la distribution des racines dans le sol (Lynch, 1995 ; Forde et Lorenzo, 2002), en particulier la profondeur de développement des racines latérales (Ge et al., 2000). Des études ont mis en évidence une plasticité de certaines espèces et génotypes en réponse à la disponibilité en nutriments. Ainsi Bonser et al., (1996) ont comparé la réponse de 16 génotypes de haricots à de faibles valeurs de disponibilité de P. Les auteurs ont pu observer une modification de l'angle de croissance des racines latérales émergeant à la base de l'hypocotyle (*i.e.* racines adventives), qui a par la suite été observée par d'autres auteurs (Liao et al., 2001 ; Miller et al., 2003). Cette réponse a particulièrement été étudiée pour son implication dans l'exploitation des horizons de surface considérés comme plus riches en nutriments, en particulier en P (Ge et al., 2000 ; Lynch et Brown, 2001 ; Rubio et al., 2003).

#### IV.2.1.4. Modification de la morphologie

De faibles valeurs de disponibilité de certains nutriments sont reconnues pour induire le développement de poils racinaires (Bates and Lynch, 1996 ; Ma et al., 2001 ; López-Bucio et al., 2003) ainsi que de racines spécialisées comme les « cluster roots » (Neuman et al., 1999 ; Watt et Evans, 1999 ; Lamont, 2003 ; Peek et al., 2003) aboutissant à une augmentation de la surface racinaire. La production de poils racinaires est reconnue pour être très sensible à la disponibilité en P mais aussi d'autres nutriments tels que les ions  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{NO}_3^-$ . Ainsi Lynch, (2007) rapporte l'effet régulateur de la disponibilité en P sur la longueur des poils racinaires, leur densité et leur distance d'apparition par rapport au méristème apical, ces réponses dépendant de l'espèce et du génotype. La figure 1.14 montre l'augmentation du nombre de poils racinaires en réponse à des déficiences en P et Fe observée chez *Arabidopsis thaliana* par Müller et Schmidt (2004). Il a aussi été rapporté que de fortes concentrations en  $\text{NO}_3^-$  limitent leur développement mais les réponses semblent présenter une plus grande variabilité que dans le cas du P (Forde et Lorezo, 2002). Les « cluster root » ou racines protéoïdes correspondent à un assemblage dense de racines latérales de même longueur et

relativement courtes. La formation de ces organes est reconnue pour être stimulée majoritairement par de faibles valeurs de disponibilité en P et également évoquée dans le cas du Fe (Hagström et al., 2001 ; Neumann et al., 2002 ; Lamont, 2003). Il est ainsi rapporté que leur apparition est généralement observée dans des sols agricoles pour des valeurs de concentration en P inférieures à 10  $\mu\text{M}$  (Watt et Evans, 1999). Chez le lupin blanc, Keerthisinghe et al., (1998) ont observé en hydroponie que la formation de « cluster roots » était maximale pour des concentrations en P inorganique de 1-10  $\mu\text{M}$  tandis qu'elle était inhibée pour des valeurs supérieures à 25  $\mu\text{M}$ .



**Figure 1.14.** Effet du statut nutritionnel Fe et P d'*Arabidopsis thaliana* sur le développement de poils racinaires. État nutritionnel suffisant (*i.e.* contrôle) (a), déficience en Fe (b), déficience en P (c). D'après Müller et Schmidt (2004).

#### IV.2.1.5. Longévité racinaire

Il a été proposé que les taux d'apparition de nouvelles racines et leur taux de mortalité soient influencés par les valeurs de disponibilité en nutriments et varient selon une relation positive. Dans le cas d'une répartition homogène des nutriments, certains auteurs ont observé une longévité plus importante des racines pour des valeurs de disponibilité faibles (Pregitzer et al., 1995 ; Ryser 1996). Dans le cas d'une répartition hétérogène des nutriments Gross et al., (1993) ont observé un turnover des racines plus important dans les zones présentant des valeurs élevées de disponibilité en nutriments. Cette plasticité est supposée permettre de maintenir un taux de prélèvement élevé dans ces zones particulières. Comme pour les précédents traits racinaires, cette réponse diffère néanmoins suivant les espèces et génotypes (Eissenstat et Yanai, 1997 ; Fransen et de Kroon, 2001) et est influencée par des caractéristiques de l'environnement biotique et abiotique autres que la disponibilité en nutriments (*e.g.* température) (Eissenstat et al., 2000 ; Hodge, 2004).

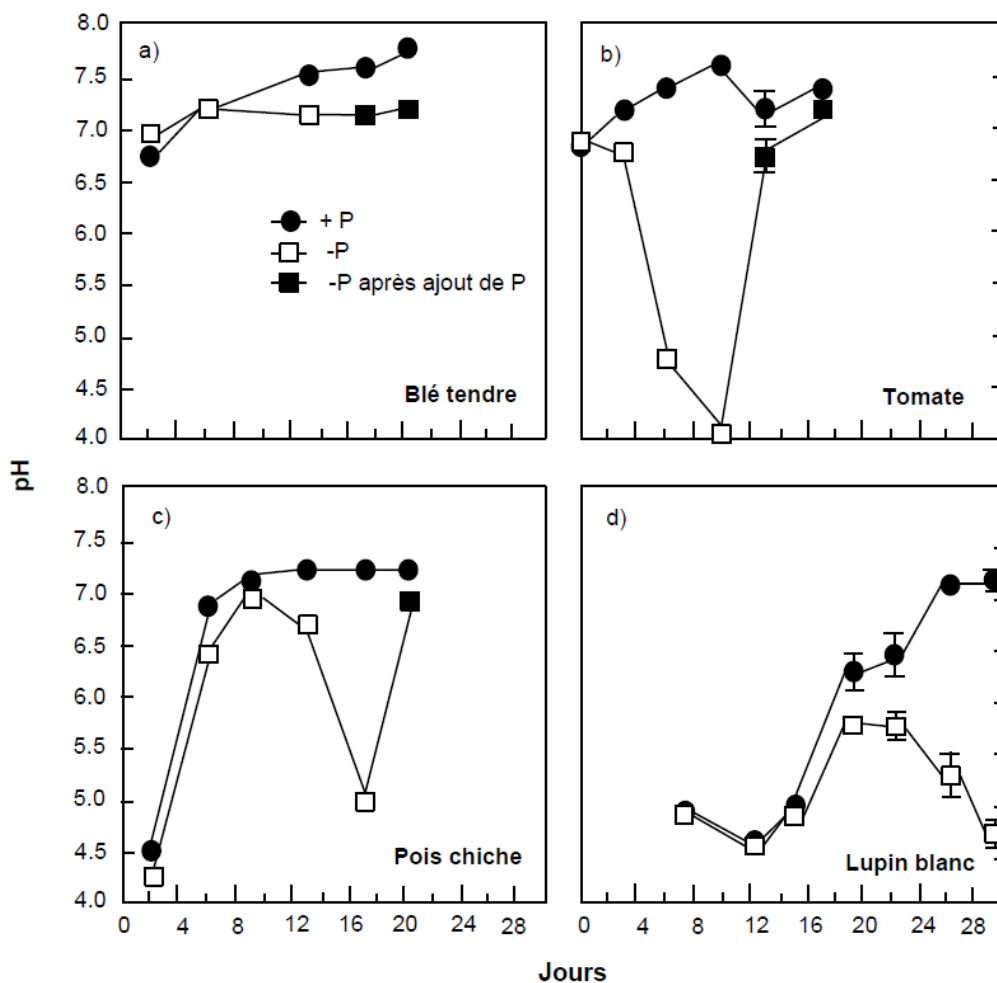
#### IV.2.2. Modification des processus rhizosphériques

Un certain nombre de processus rhizosphériques impliqués dans l'acquisition des nutriments sont influencés par l'état nutritionnel des plantes. Il a ainsi été mis en évidence que les modifications de pH, l'exsudation d'anions organiques ainsi que d'enzymes (*e.g.* phosphatases) ainsi que l'expression de transporteurs impliqués dans l'absorption des ions étaient influencés par la disponibilité en nutriments tels que P. L'établissement des symbioses rhizobiennes (avec les légumineuses) et mycorhizienne dépend également de la disponibilité en nutriments.

##### IV.2.2.1. Modification de pH

L'effet de la disponibilité sur l'exsudation de protons par les racines, est particulièrement documenté dans le cas de l'acquisition du Fe chez les espèces végétales dites de stratégie I (majoritairement des dicotylédones). Ces espèces exposées à de faibles valeurs de disponibilité en Fe répondent par une augmentation de l'efflux de proton dans la rhizosphère, combinée avec une augmentation de l'activité réductase (Marschner 1994 ; Schmidt 2003 ; Hinsinger et al., 2003). L'exsudation de  $H^+/OH^-$  est reconnue pour être fortement influencée par la nutrition N, mais l'efflux de protons a été montré sensible à la disponibilité du P. Neumann et Römheld (1999), ont ainsi observé dans le cas de plantes cultivées en hydroponie exposées à de faibles concentration en P (Fig. 1.15), une augmentation de l'exsudation de protons et d'anions organiques pour le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et le lupin blanc, seule l'exsudation de protons a augmenté pour la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) et de façon moindre dans le cas du blé tendre. Les réponses des plantes, en terme de modification du pH de la rhizosphère, à la diminution de concentration en P ne pouvant être que rarement être expliquées par les variations d'exsudation d'anions organiques et étant dépendantes de l'espèce, certains auteurs ont proposé que l'exsudation de protons soit le résultat d'une diminution de prélèvement en N sous forme  $NO_3^-$ . Cette supposée réponse indirecte à des variations respectives de nutrition N et P des plantes a été testée par Tang et al. (2004) dans le cas de deux génotypes de haricots cultivés en hydroponie avec différentes formes d'azote pour deux concentrations en P. Une augmentation de l'exsudation de protons pour de faibles valeurs de P a uniquement été observée dans le cas des haricots cultivés en présence de  $NO_3^-$  alors qu'aucune variation entre les deux apport de P n'a été observée dans le cas des haricots ayant recours exclusivement à la fixation d'azote. De manière similaire, il a été montré dans le cas d'une toxicité en aluminium en conditions acides, que les espèces considérées comme peu tolérantes avaient tendance à diminuer le prélèvement de  $NO_3^-$  et donc de diminuer le pH de la rhizosphère contrairement aux espèces tolérantes (Hinsinger et al., 2003).





**Figure 1.15.** Effet du phosphore sur le pH du milieu de culture du blé tendre (a), de la tomate (b), du pois chiche (c) et du lupin blanc en hydroponie. Les espèces ont été cultivées en présence de phosphore +P (ronds noirs), ou sans phosphore -P (carrés blancs) suivi d'un apport de P (carrés noirs) excepté pour le lupin blanc pour lequel les plantes -P n'ont pas reçu de P. Le P a été apporté à la concentration de  $0.25\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  et le N sous forme  $\text{N-NO}_3^-$ . Les barres d'erreurs indiquent  $\pm\text{SD}$  de trois réplicas. D'après Neumann et Römheld, (1999).

#### IV.2.2.2. Exsudation d'anions organiques (carboxylates) et autres ligands organiques

La stratégie II des graminées en réponse à une faible disponibilité en Fe qui consiste à l'induction d'une sécrétion accrue de ligands organiques particuliers, les phytochélateurs (Marschner 1994 ; Schmidt 2003 ; Robin et al., 2008). Dans le cas du P, différentes études ont montré que l'exsudation d'anions organiques par les racines dépend de l'état nutritionnel de la plante. Cette augmentation a été observée chez le lupin blanc (Keerthinsinghe et al., 1998 ; Neumann et Römheld 1999 ; Pearse et al., 2006), le colza (Hoffland et al., 1989 ; Zhang et al., 1997) et d'autres espèces (Gaume et al., 2001 ; Dong et al., 2004 ; Hoffland et al., 2006). Mais cette réponse à une diminution de la disponibilité en P ne semble pas induite systématiquement chez toutes les espèces (Neuman et Römheld 1999 ; Wouterlood et al., 2004).

#### *IV.2.2.3. Exsudation d'enzymes*

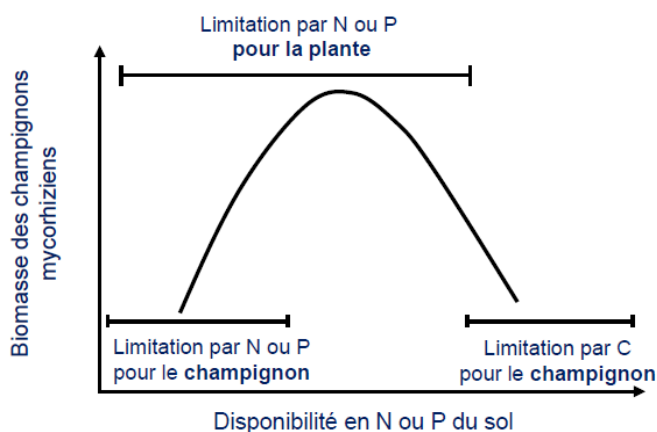
L'implication d'enzymes extracellulaires d'origine racinaire dans l'acquisition de nutriments est surtout documentée pour P mais des études récentes ont observé l'exsudation de protéases chez certaines espèces (Godlewsky et Adamczyk, 2007 ; Richardson et al., 2009). Il a été observé une augmentation de l'exsudation d'enzymes hydrolysant le P et de leur activité dans la rhizosphère en réponse à de faibles valeurs de disponibilité en P (Gaume et al., 2001 ; Yun et al., 2001 ; Liu et al., 2004 ; Wang et al., 2008). Néanmoins ces variations restent difficiles à évaluer en raison de leur rapide adsorption sur les phases minérales du sol mais aussi en raison de la difficulté à dissocier l'origine racinaire ou microbienne de ces enzymes (George et al., 2006 , 2008 ; Richardson et al., 2011)

#### *IV.2.2.4. Prélèvement d'ions*

De faibles valeurs de concentration en nutriments est reconnues pour induire l'activité de transporteurs à haute affinité (Remans et al., 2006b ; Chen et al., 2008 ; Remy et al., 2012). Néanmoins l'expression des mécanismes moléculaires à l'origine reste encore à élucider (Smith, 2003 ; Gojon et al., 2009 ; Bao et al., 2011).

#### *IV.2.2.4. Établissement de symbioses*

Les champignons symbiotiques mycorhiziens dépendent de la plante pour le C issu de la photosynthèse et sont reconnus pour faciliter l'acquisition de N et plus particulièrement du P du sol pour les plantes (Bolan, 1991 ; Richardson et al ; 2009). Il a été proposé que l'abondance des mycorhizes et leur colonisation des racines ainsi que leur activité soient dépendants des rapports entre C, N et P le long d'un gradient de disponibilité dans le sol de ces deux derniers nutriments (Sylvia et Neal. 1990 ; Blanke et al., 2005 ; Egerton-Warburton et al., 2007). En particulier dans le cas de valeurs de disponibilité en N et/ou P limitant le développement de la plante, il est supposé que la plante investisse plus de C dans la symbiose. À l'autre extrême, pour de fortes valeurs de disponibilité en N et/ou P (*e.g.* suite à la fertilisation), il est proposé que la plante investisse moins de C dans la symbiose et que ce dernier devienne limitant pour le développement du microsymbionte. Une autre possibilité est que les champignons mycorhiziens soient directement influencés par la disponibilité en N et P du sol qui régulerait la structure et l'abondance des communautés de champignons (Treseder, 2004). Treseder et Allen, (2002) ont ainsi modélisé la relation entre l'abondance des champignons mycorhiziens et la disponibilité en N et/ou P du sol par une relation hyperbolique (Fig 1.16). Bien que la fertilisation en N et P soit supposée diminuer l'abondance des champignons mycorhiziens, les résultats expérimentaux sont très contrastés. Treseder (2004) a ainsi réalisé une méta-analyse pour tenter de clarifier l'effet de la fertilisation sur l'abondance des microsymbiontes. Cette méta-analyse montre que l'effet négatif du N n'est pas clairement établi, tandis que l'abondance des champignons mycorhiziens est plus fréquemment associée à une diminution de la disponibilité de P. En conséquence les relations entre l'abondance du symbionte et la disponibilité en N et P du sol restent encore à être précisées.



**Figure 1.16.** Effet de co-limitation pour la plante et pour les champignons mycorhiziens pour différents nutriments sur la biomasse des champignons mycorhiziens le long d'un gradient de disponibilité en N ou P. Pour des niveaux les plus élevés de disponibilité en nutriments, les champignons reçoivent peu de carbone depuis les plantes et vont être limités en C. Pour de plus faibles niveaux de disponibilité en nutriments, les plantes vont être limitées par le N ou le P et vont allouer du carbone aux champignons mycorhiziens. Si la disponibilité en N ou P est suffisante pour le fonctionnement des plantes les champignons mycorhiziens vont proliférer. Pour les niveaux de disponibilité les plus faibles à la fois les plantes et les champignons vont être limités par les nutriments et la biomasse des champignons mycorhiziens quelque soit l'allocation de C par les plantes. D'après Tresedes et Allen, (2002).

La symbiose rhizobienne entre les légumineuses et des bactéries fixatrices d'azote confère aux plantes l'accès à une source en N inépuisable et ainsi leur permet de disposer d'un avantage sur les espèces dépendant uniquement de N du sol. Les bactéries fixatrices d'azote font en effet bénéficier la plante de N d'origine atmosphérique en échange de C provenant de la photosynthèse. La mise en place de la symbiose est connue pour être influencée par la disponibilité en P et N et être sensible à d'autres paramètres environnementaux. La méta-analyse réalisée par Smith (1992) tend à montrer une relation négative entre la fertilisation en N et les paramètres relatifs à la fixation symbiotique alors qu'une tendance inverse est rapportée dans le cas de la fertilisation P. Il a ainsi été montré une diminution du taux de fixation des légumineuses suite à la fertilisation en N et plus particulièrement l'apport de nitrate (Voisin et al., 2002 ; Liu et al., 2011 ; Naudin et al., 2011). Leidi et Navaro (2000), observent une interaction entre la disponibilité en N et P sur les paramètres de fixation du haricot, l'augmentation de la disponibilité en P ayant un effet positif sur la fixation et plus particulièrement pour de faibles valeurs de disponibilité en N. En effet, les légumineuses établissant une symbiose ont tendance à présenter des besoins en P supérieurs à celles dépendant de la fertilisation N (Graham et Vance, 2000). Reed et al. (2007), ont ainsi montré un doublement de l'activité fixatrice évaluée par l'activité de réduction de l'acétylène d'une prairie après fertilisation P. Des résultats similaires ont été rapportés par Isaac et al. (2011) dans le cas de l'acacia (*Acacia senegal* L.) dont l'activité fixatrice évaluée au travers du  $^{15}\text{N}$  augmentait avec la fertilisation P de l'acacia (*Acacia senegal* L.). Les mécanismes impliqués dans l'effet de la disponibilité en N et en P restent encore débattus (Høgh-Jensen et al., 2002 ; Vitousek et al., 2002 ; Naudin et al., 2010).

### IV.3. Influence de la disponibilité sur l'acquisition d'un nutriment dans l'association d'espèces

Le modèle de « stress-gradient hypothesis » propose que l'importance ou l'intensité de la compétition et de la facilitation varient inversement le long d'un gradient de stress avec une prédominance de la facilitation pour les conditions de stress abiotique élevées (Bertness and Callaway, 1994 ; Brooker et al., 2003). Elle suppose que dans des conditions de stress élevées, une espèce bénéficie de l'effet positif sur l'environnement d'une espèce voisine, supérieur à l'effet négatif de compétition pour une ressource. Cette formulation se veut générale et peut amener à différentes interprétations suivant la définition des différents concepts comme celui de facilitation, compétition et gradient de stress. La majorité des études ont testé cette hypothèse en mesurant la réponse des individus aux interactions et donc leur effet net en termes de performances, mais ne se sont pas intéressées à l'effet sur la ressource. Le « stress-gradient hypothesis » a été confirmé par de nombreuses expérimentations dont la plupart comparent les performances d'espèces avec ou sans voisin et non pas l'effet du changement de l'identité d'un voisin comme dans le cas pour les cultures associées. Néanmoins les résultats d'un certain nombre d'études ont remis en cause cette relation, en mettant en évidence qu'elle pouvait varier suivant les comparaisons effectuées (avec ou sans voisin, en modifiant l'identité du voisin), la nature du gradient de stress, l'identité et la phénologie des espèces ainsi que les performances mesurées (Maestre et al., 2009). Le Roux et McGeoch (2010) citent l'existence de 4 types de relations entre les interactions entre plantes et la disponibilité des ressources, dont ils attribuent les différences à des considérations méthodologiques. Si l'on prend l'exemple des associations céréale-légumineuse, l'augmentation de l'effet positif sur le prélèvement d'azote de la céréale en raison de la fixation de  $N_2$  par la légumineuse avec la diminution de la disponibilité en N a en effet été mis en évidence par de nombreuses études (Ghaley et al., 2005 ; Li et al., 2009 ; Bedoussac et al., 2010 ; Naudin et al., 2010). Le mécanisme proposé pour expliquer cette relation est l'augmentation de l'activité fixatrice de la légumineuse avec la diminution de la disponibilité en N. La gamme de variation de disponibilité testée a été fixée par les expérimentateurs mais il est légitime de se demander comment évoluerait la relation pour des conditions stressantes en N. De plus dans ces expérimentations seule la disponibilité en N est modifiée pour établir un gradient de stress, les autres nutriments étant présents en quantité considérée suffisante pour la croissance. Il serait aussi possible de complexifier le système et de faire varier des paramètres supplémentaires comme la disponibilité d'autres nutriments comme le P pour lequel il est admis que de faibles valeurs de disponibilité inhibent la fixation symbiotique. Certains auteurs ont donc tenté de redéfinir le concept afin de mettre fin au débat en soulignant que les contradictions tenaient plus à la formulation qu'au concept fondamental (Maestre et al., 2009). Ils soulignent la nécessité de préciser la nature du stress abiotique ainsi que de prendre en compte les caractéristiques des espèces en interaction afin de prédire comment la facilitation et la compétition évoluent le long d'un gradient de stress.

Cette démarche appliquée au cas du partage des nutriments nécessite de comprendre l'évolution des interactions entre espèces le long d'un gradient de disponibilité dans le cas de l'association d'espèces et de celle des cultures monospécifiques correspondantes. L'évaluation de l'effet de la disponibilité moyenne dans le sol sur les interactions rhizosphériques consiste ainsi en la comparaison du partage de la ressource entre individus de la même espèce à celui entre individus d'espèces différentes. Il s'agit dès lors de l'étude de la modification du partage d'un nutriment suivant la disponibilité moyenne du sol à l'échelle de la rhizosphère. Le « stress-gradient hypothesis » impliquerait dans ce cas que l'augmentation de biodisponibilité du nutriment pour l'espèce facilitée serait d'autant plus importante que la disponibilité moyenne du sol est faible. La vérification de ce modèle nécessite l'étude des variations du partage entre espèces (*i.e.* interspécifique) avec la disponibilité moyenne du sol ainsi que son effet sur l'augmentation de disponibilité par l'espèce facilitatrice. Le modèle de Raynaud et al. (2004) permet de simuler l'effet de la disponibilité sur le partage de la ressource pour un état d'équilibre. Leurs simulations montrent que la relation entre le partage d'un nutriment et ses paramètres de diffusion n'était que légèrement modifiée pour des valeurs élevées de disponibilité moyenne. Dans ce cas, l'occupation de l'espace par les racines aurait tendance à gagner en importance sur le contrôle du partage par rapport aux capacités de prélèvement. Les auteurs n'ont pas fait le choix de comparer l'évolution du partage pour différentes valeurs de disponibilité ni de prendre en compte leur effet sur les caractéristiques des facteurs supposés influencer le partage (*i.e.* occupation de l'espace et capacité de prélèvement). Afin d'intégrer l'influence des racines sur la disponibilité des nutriments et ainsi la facilitation, il serait également nécessaire de s'intéresser aux modifications des processus rhizosphériques avec la disponibilité. Les études relatives à l'effet de la disponibilité en nutriments sur le partage des nutriments à l'échelle de la rhizosphère sont peu nombreuses, essentiellement relatives au P et présentent souvent un nombre limité de niveaux de disponibilité testés (Li et al., 1999 ; Li et al., 2001 ; Li et al., 2007). L'interprétation de ces études reste limitée à l'évaluation de la biodisponibilité du nutriment étudié et à l'étude des interactions rhizosphériques par l'observation des processus racinaire sans prendre en compte les variations de disponibilité. De manière générale l'acquisition d'un nutriment le long d'un gradient de disponibilité dépend de nombreux facteurs dont la disponibilité des autres ressources. Cette complexité est difficile à prendre en compte expérimentalement et le développement des outils de modélisation permettant d'établir la relation entre interactions et disponibilité est encore rare. Des travaux semblent nécessaires afin de fournir des données supplémentaires permettant de clarifier les mécanismes impliqués.

#### **V. Associations céréale-légumineuse : interactions et facilitation de l'acquisition de P**

Ce paragraphe traite des interactions entre céréale et légumineuse en association pour l'acquisition de P et plus particulièrement de la facilitation. Ce sujet a fait l'objet d'une publication en 2011 dans la revue *Plant Physiology* et présenté ci-après.

## **P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species<sup>1</sup>**

Philippe Hinsinger<sup>a,\*</sup>, Elodie Betencourt<sup>a,b</sup>, Laetitia Bernard<sup>c</sup>, Alain Brauman<sup>c</sup>, Claude Plassard<sup>a</sup>, Jianbo Shen<sup>d</sup>, Xiaoyan Tang<sup>a,b</sup>, Fusuo Zhang<sup>d</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>b</sup> Montpellier SupAgro, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

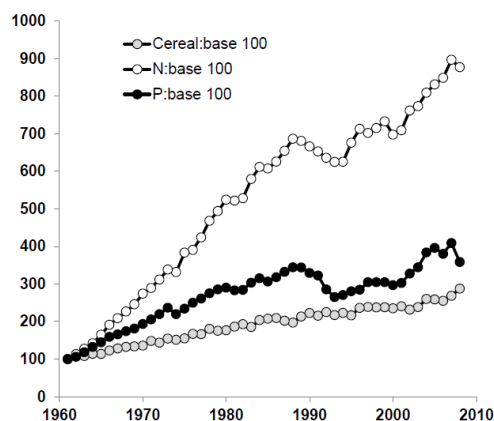
<sup>c</sup> IRD, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>d</sup> Department of Plant Nutrition, China Agricultural University, Key Laboratory of Plant-Soil Interactions, Ministry of Education, Beijing 100193, People's Republic of China

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 49; fax: +33 4 99 61 30 88.

E-mail address: [philippe.hinsinger@supagro.inra.fr](mailto:philippe.hinsinger@supagro.inra.fr) (P. Hinsinger).

Over the last 50 years, the use of nitrogen (N) and phosphorus (P) fertilizers has increased at a faster rate than global food production, resulting in substantial decreases of N and P efficiency in agriculture (Fig. 1.17). Thus, considerable amounts of N and P fertilizers have been wasted in agroecosystems, and the alteration of N and P biogeochemical cycles is among the most visible impacts of human activities on ecosystem services, far exceeding the hypothesized “planetary boundaries” for N and approaching those for P (Rockstroet al., 2009). Projections for the future suggest that a substantial further increase in N and P fertilizer use will occur to cope with increasing food demand (Tilman et al., 2001; Vance et al., 2003). Tilman et al. (2001) predicted that global consumption of fertilizer P will increase from 34.3 Tg year<sup>-1</sup> in 2000 to a mean projected value of 83.7 Tg year<sup>-1</sup> in 2050 (56.2–118 Tg year<sup>-1</sup> depending on the calculation scenario). Such increases in fertilizer consumption will further threaten the global N and P cycles. Bouwman et al. (2009) estimated that in 2000, the total input of fertilizer P in croplands amounted to 21 Tg year<sup>-1</sup>, of which 9 Tg was accumulated in soils and 1 Tg was lost to erosion. Their projections for 2050 for various scenarios of future agricultural development amounted to 29 to 46 Tg year<sup>-1</sup> total P fertilizer input and 10 to 23 and 3 to 5 Tg year<sup>-1</sup> accumulated in soil and lost to erosion, respectively. This suggests that even in the most optimistic scenario, the contribution of P fertilization of cropland to P movement by erosion will triple over the period 2000 to 2050. While further intensification of agroecosystems is clearly needed to cover the growing food demand over the next decades, we cannot afford to accept the “business as usual” scenario that relies on ever-increasing agricultural inputs and the resulting waste of nutrients in some regions of the world (Vitousek et al., 2009).



**Figure 1.17.** Relative increase in world annual production of cereals, and annual consumption of fertilizer-N and fertilizer-P over the 1961-2008 period. The 100-basis in 1961 corresponds to 876.874890 Tg cereals yr<sup>-1</sup>, 11.587748 Tg fertilizer-N yr<sup>-1</sup> and 4.770182 Tg fertilizer-P yr<sup>-1</sup>. In 2008, these reach 2520.699642 Tg cereals yr<sup>-1</sup>, 101,600000 Tg fertilizer-N yr<sup>-1</sup> and 17.101926 Tg fertilizer-P yr<sup>-1</sup> (data from FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>)

### V.1. What makes P so special?

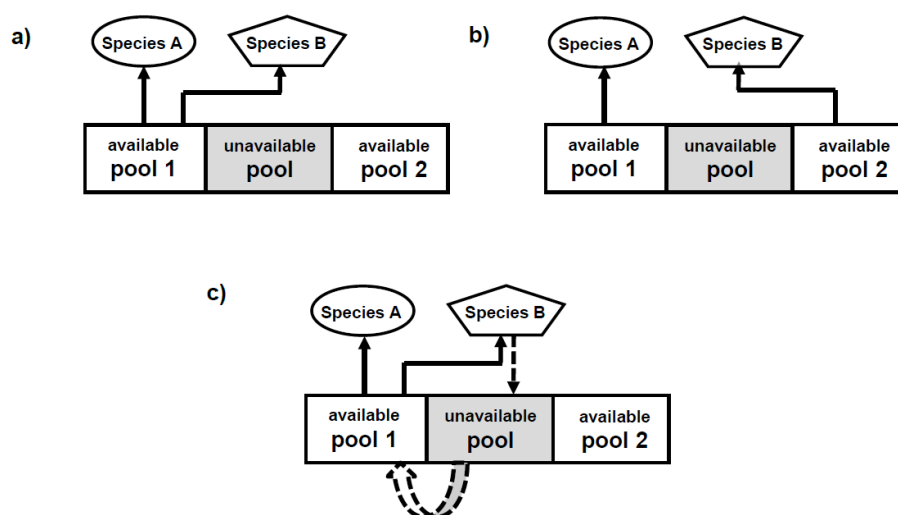
Contrary to N, P is reasonably abundant in the Earth's crust (1.2 g kg<sup>-1</sup> on average) and thus in soils, where it primarily occurs as inorganic P in apatite minerals derived from the bedrock. However, with soil formation and weathering, total P content decreases over time and organic P content builds up at the expense of inorganic P, as shown in soil chronosequences (Richardson et al., 2004). At early stages of development (in young soils), therefore, terrestrial ecosystems are primarily N limited, while at later stages of development (in older soils), they become P limited (Vitousek and Farrington, 1997). Thus, soil P scarcity is especially critical in the tropics, where deeply weathered soils dominate. In addition, unlike N (especially nitrate), phosphate ions are poorly mobile and present at low concentration in soil solution, due to strong and multiple interactions with soil constituents (Hinsinger, 2001). These comprise adsorption onto soil minerals (metal oxides and clay minerals), precipitation as P minerals (predominantly apatite-like minerals), and immobilization as various organic P compounds (soil organic matter and phytate, which is the P storage form in seeds). P limitation is thus widespread, estimated to affect about 5.7 billion ha worldwide (Gaume, 2000).

While, in spite of their considerable energy cost, the reservoir of atmospheric N<sub>2</sub> used for manufacturing N fertilizers is much larger than required, the situation for P is rather different. World reserves of P ores are indeed finite, and the exact time when their consumption will peak is a matter for debate. High-grade phosphate rocks are definitely expected to be exhausted within the next decades (Cordell et al., 2009), which calls into question the sustainability of current P fertilizer use in developed and emerging countries. Increasing P efficiency in crops without further increasing P inputs requires better exploration and exploitation of soil resources in agroecosystems. To achieve this, we must breed more P-efficient crop genotypes that will make better use of belowground (root architecture and rhizosphere-related traits (Vance et al., 2003; Lynch, 2007). Another

promising option for achieving ecological intensification of agroecosystems (Cassman, 1999) is to make better use of plant diversity, especially niche complementarity and facilitation occurring in the rhizospheres of intercropped species (Zhang et al., 2010).

**V.2. Better exploiting plant functional diversity in crop-based agroecosystems: the case of cereal-legume intercrops**

Enhanced productivity of multispecies agroecosystems (intercropping) compared with that of monospecific agroecosystems (each of the component species being grown alone) may be explained by two major processes that result in improved resource use: complementarity and facilitation (Fridley, 2001). Experimentally, these processes can be difficult to tease apart (Loreau and Hector, 2001). Complementarity may be defined as a decrease in interspecific competition and competitive exclusion through resource partitioning between intercropped species (Fig. 1.18). Species may use a given resource differently in time, in space, and in forms (Fridley, 2001). A well-known example is the complementarity of N use between cereals and N<sub>2</sub>-fixing legumes, where both species compete for the same pool of soil N, while only the legume can substantially access the additional pool of atmospheric N<sub>2</sub> through symbiotic fixation. Facilitation occurs when one species enhances the growth or survival of another (Callaway, 1995). This can occur through (1) direct positive mechanisms, such as favorable alteration of light, temperature, soil moisture, soil nutrients, etc., and (2) indirect mechanisms, such as beneficial changes in soil mycorrhizal or microbial communities. Hereafter, we use facilitation to mean positive interactions by which a species can modify the biotic/abiotic environment of its roots (rhizosphere), ultimately benefitting the intercropped species by increasing nutrient availability (Callaway, 2007). Direct, root-mediated processes altering P availability in the rhizosphere and indirect, microbially-mediated processes will be addressed.



**Figure 1.18.** Competition (a), complementarity (resource use partitioning; b), and facilitation (c) between two intercropped species. Pools represent different forms of a single resource (e.g. nutrient). Solid arrows indicate mechanisms by which species B can alter resource availability, increasing the size of the available pool at the expense of the unavailable pool (indicated by curved arrow), thereby improving the uptake of resource by the intercropped species A (facilitation).



Such positive interactions are particularly valuable when resources are limited, as occurs in low-input agroecosystems. For example, beneficial effects of intercropping have been observed at lower rates of P fertilizer application but were no longer significant at higher rates (Li et al., 2007). In ecology, the “stress gradient hypothesis” proposes that positive interactions (facilitation) increase in importance and intensity with increasing environmental stress (Bertness et Callaway, 1994; Brooker et al., 2003). For both natural and managed ecosystems, nutrient use in multispecies stands has been mainly studied for N and especially for cereal/legume intercropping systems. Few studies have focused on cereal-legume interactions with regard to soil P. Recently, this research field has attracted new interest with the reported evidence of enhanced P acquisition for cereals intercropped with legumes (Li et al., 2007).

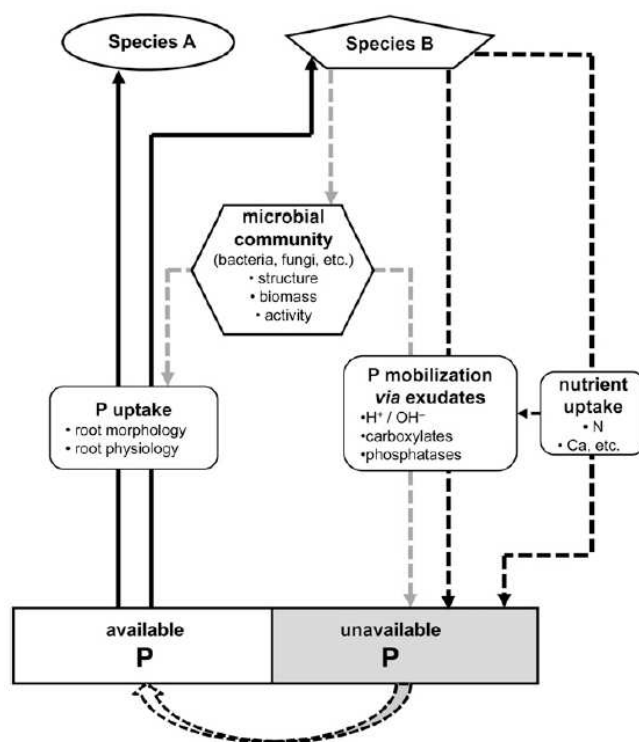
### V.3. Complementarity in space, time and soil P pools

Given the low mobility of phosphate ions in soils, the volume and geometry of the rhizosphere largely determines the pool of P readily accessible to plants. Spatial complementarity can occur (1) when the two species have contrasting root architecture, exploring different soil horizons, and/or (2) because of the plasticity of root systems, combined with possible avoidance strategies (Hauggaard-Nielsen and Jensen, 2005; Li et al., 2006; de Kroon, 2007). In both cases, intercropping may ultimately result in better exploration of the whole soil volume compared with monocropping. The role of root distribution in resource use in intercropping systems has been mostly documented for N. But the conclusion that cereal has better N uptake efficiency due to faster root growth may also apply to P. The discovery that plants can adjust root location depending on nutrient availability and the presence of neighboring plants within a single species (Gersani et al., 2001; Cahill et al., 2010) raises new questions about how soil P is shared in multispecies stands and how “root decisions” (Hodge, 2009) occur for intercropped species. In addition, intercropped species may exhibit contrasting adiatees (Rose et al., 2007) and/or growth periods (e.g. different sowing dates), which may result in differential P requirements over time (Li et al., 1999, 2007). Contrasted sowing/harvest dates may also reduce competition and increase P availability by mineralization of crop residue, which enhances P acquisition of the intercropping system.

Soil P occurs as various pools that require different biochemical or chemical reactions to release phosphate ions that are readily taken up by roots. Complementarity can thus occur for two intercropped species tapping into two distinct pools of soil P resources (e.g. inorganic and organic; Li et al., 2008). Intercropped species may also have access to different fractions of each of these pools (Turner, 2008). Cu et al. (2005) observed that wheat (*Triticum aestivum*) and intercropped white lupin (*Lupinus albus*) depleted two distinct inorganic P fractions. In Li et al. (2003a), chickpea (*Cicer arietinum*) mobilized soil organic P and left more inorganic P available to the intercropped wheat. Li et al. (2008) tested this hypothesis on a larger number of inorganic and organic P fractions for durum wheat (*Triticum durum*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*). Almost all values of soil P pools in

the rhizosphere of the two intercropped species were intermediate between those in the monocropped cereal or legume. As for Cu et al. (2005), the rhizospheres of the intercropped species were not dissociated to measure the changes in P fractions separately for each of the intercropped species.

#### V.4. Direct positive interactions



**Figure 1.19.** Root-induced (direct) and microbially mediated (indirect) positive interactions (facilitation) altering P availability in the rhizosphere of two intercropped species. Dotted arrows indicate how species B can mobilize P that is initially not available to species A, either directly or indirectly *via* soil microorganisms (gray arrows) such as bacteria and fungi, mycorrhizal or not. These processes result in increase in the size of the available P pool at the expense of the unavailable pool (indicated by curved arrow). Solid black arrows indicated P uptake by the two species from the available P pool.

Facilitation of P uptake is defined as the positive interactions that result from the ability of one species to increase soil P availability to the benefit of the intercropped species (Callaway, 2007). Thus, for example, the size of the pool of available P is increased at the expense of the pool that is unavailable to species A (Figs. 1.18c and 1.19) as a consequence of exudation by species B. This section will focus on how plant roots are able to directly change rhizosphere P availability through either P uptake or exudation of P-mobilizing compounds or as a consequence of interactions with the uptake of other nutrients (Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003; Devau et al., 2010). Root exudates play a major role in P bioavailability *via* several mechanisms: protons/hydroxyls and carboxylates solubilize inorganic P, while root-borne phosphatases hydrolyze organic P (Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003). Most cereal/legume intercropping studies implicitly assume that the cereal shall

benefit from the legume species (one-way facilitation), because legumes are known to excrete larger amounts of protons (Tang et al., 1997; Hinsinger et al., 2003), carboxylates (Neumann and Romheld, 1999; Vance et al., 2003; Pearse et al., 2006), and phosphatases (Nuruzzaman et al., 2006) in their rhizosphere. But cereals can also change rhizosphere P availability, and one could well expect the facilitation of legume P acquisition by P-efficient cereals or even two-way facilitation in intercropped cereal/legume systems. N uptake and the source of N used (ammonium, nitrate,  $N_2$ ) are known to play a key role in cation-anion uptake balance and subsequent changes in rhizosphere pH and P availability (Hinsinger et al., 2003). The intercropped cereal will presumably benefit from legume-mediated acidification due to  $N_2$  fixation in alkaline/neutral soils, where such acidification may increase P availability through dissolution of P minerals (Hinsinger, 2001). Several experiments have shown a lower rhizosphere pH in legumes than cereals, while rhizosphere pH of the intercropped cereal/legume is intermediate (Li et al., 2003a, 2008; Cu et al., 2005). However, none has established a causal relationship with plant performance. Li et al. (2008) reported a significant yield benefit when durum wheat was intercropped with common bean, relative to durum wheat grown alone, but they could not demonstrate the link with the observed changes of rhizosphere pH and acid-soluble P pools. These researchers, however, did show that proton release rate by the intercropped legume was significantly greater than that measured when the legume was grown alone. This likely occurred as a result of greater legume  $N_2$  fixation due to lower rhizosphere nitrate concentrations because of competition for soil N with the intercropped cereal, as documented elsewhere (Hauggaard-Nielsen et al., 2009). Indeed, when cropped alone, legumes tend to rely more on soil N when it is readily available due to the inhibiting effect of elevated nitrate concentration on  $N_2$  fixation. This provides an interesting case where competition for one resource (nitrate N) may stimulate facilitation for the acquisition of another resource (acid-soluble P).

Not only proton excretion but also hydroxyl release and subsequent increase in rhizosphere pH can substantially increase soil P availability. This occurs as a consequence of enhanced desorption of phosphate ions and changes in surface charges of iron oxides and clay minerals to which phosphate ions are bound (Hinsinger, 2001). Devau et al. (2010) both measured and modeled the substantial contribution of root-induced alkalization of the durum wheat rhizosphere to observed increases in P availability. These results were documented in a neutral soil but should occur for a broad range of soil types and initial pH values, provided that P availability is primarily constrained by adsorption/desorption processes. These findings suggest that cereals, which often exhibit improved N nutrition when intercropped (Bedoussac and Justes, 2010), may facilitate P acquisition by the intercropped legume.

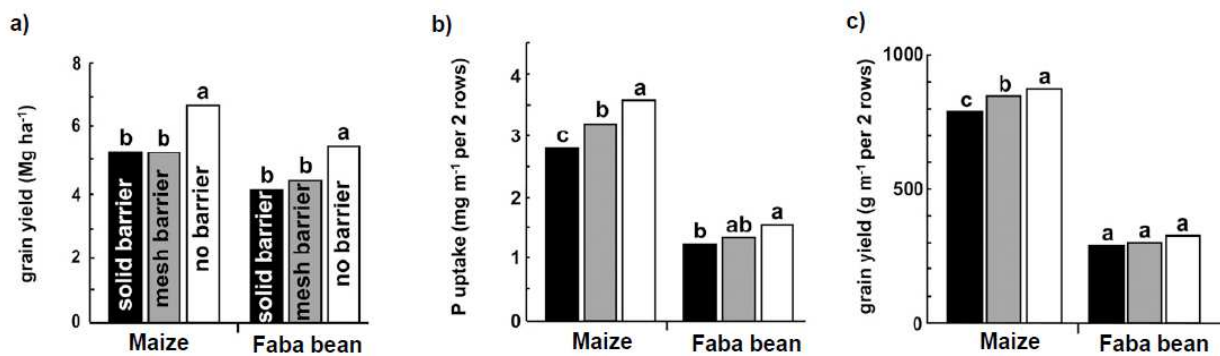
Carboxylates and other organic ligands exuded by roots can compete with phosphate ions for adsorption on charged surfaces, thereby inducing ligand exchange-promoted P desorption and enhanced P availability (Hinsinger, 2001). Carboxylate exudation rates are promoted under P-deficient conditions and vary considerably with plant species (Neumann

and Römheld, 1999; Neumann and Martinoia, 2002; Vance et al., 2003), being such smaller in cereals than in certain grain legumes such as chickpea and white lupin (Neumann and Römheld, 1999; Pearse et al., 2006). These species can exude massive amounts of malonate, malate, and citrate, which are some of the most efficient P-mobilizing carboxylates (Hinsinger, 2001). Thus, it is generally expected that legumes facilitate P acquisition of the intercropped cereal, although many legume species do not exude carboxylates at rates any greater than most cereals. Only one study (Li et al., 2010) focused on carboxylate composition and concentrations in the rhizosphere of intercropped species: maize (*Zea mays*) and white lupin or faba bean (*Vicia faba*). Intercropping affected carboxylate composition for maize but had no effect on carboxylate concentration, plant biomass, or P acquisition. The experiment was inconclusive, and additional work is needed to ascertain the significance of this process in intercropping systems.

Intercropping studies, which have investigated the potential role of P-mobilizing compounds, have mainly focused on phosphatase activity (Li et al., 2004; Inal et al., 2007; Wang et al., 2007a). Root-excreted phosphatases may enhance soil P availability through hydrolyzing organic P. Li et al. (2003a) reported increased P acquisition from organic sources (phytate) in wheat intercropped with chickpea compared with wheat grown with a solid barrier separating its roots from those of chickpea. They showed no such effect when the source of supplied P was inorganic ( $\text{FePO}_4$ ), which suggests that chickpea did facilitate P acquisition by the intercropped wheat as a consequence of its ability to hydrolyze the organic P supplied, presumably by phosphatase secretion. Li et al. (2004) observed both in hydroponics and soil-grown plants that higher phosphatase activity was observed for chickpea than for maize. Intercropping, however, did not affect the phosphatase activity of either species, although maize biomass and P acquisition were enhanced. The enhanced biomass and P acquisition of the cereal could not be related to increased phosphatase activity in intercropping compared with maize grown alone because it also occurred when only inorganic P was supplied. Wang et al. (2007a) conducted a similar experiment but with another soil, using different species and growth duration. No intercropping effect was observed when P was added in an organic form (phytate), but biomass, P acquisition, phosphatase activity, and P availability all increased when inorganic P was added. Relationships between rhizosphere processes such as phosphatase secretion and P facilitation have not been clearly established yet. It is important to note that a large proportion of phosphatase activity in the rhizosphere is not directly the consequence of the secretion of root-borne enzymes but rather derives from microbial activities (see below). None of the published work on intercropping systems has attempted to determine the origin of the measured phosphatase activities, due to methodological limitations. To a lesser extent, this also applies to rhizosphere pH and organic ligand concentrations.

All of the above-mentioned rhizosphere processes occur over rather small spatial scales. While protons/ hydroxyls can diffuse several millimeters away from root surface, carboxylates and most enzymes are expected to be strongly adsorbed onto soil particles and thus poorly mobile in the rhizosphere, rarely diffusing over distances greater than 1 mm

millimeter or so (Hinsinger et al., 2009). Thus, in the absence of long root hairs or effective mycorrhizal symbiosis, root proximity is required for the occurrence of positive interactions that involve the release of P-mobilizing exudates. Thus, in contrast to spatial niche separation, intimate intermingling of roots of the two intercropped species is needed for P facilitation to occur. This is supported by root barrier experiments, either in the field or in pot culture (Fig. 1.20), which have consistently shown that better growth and/or P acquisition is achieved when there is no physical barrier between the roots of intercropped species. Using an elegant modeling approach, Raynaud et al. (2008) demonstrated that under conditions where the diffusion of citrate is spatially restricted, as would be expected to occur in most soils, only the few neighboring roots of the non-exuding species could benefit from the increased P availability due to citrate released by roots of the exuding species. This spatial restriction not only stems from the poor mobility of P-mobilizing compounds released by roots, such as protons/hydroxyls, but especially carboxylates or phosphatases. It is also necessary for the released phosphate ions to be able to diffuse back toward the roots of the facilitated species. The need for close proximity (within millimeters) between roots may be offset by long root hairs and more so mycorrhizal symbiosis, which can confer access to P resources farther away from roots of the facilitated, intercropped species. Besides spatial considerations, temporal variations of either uptake or release of P-mobilizing compounds should be accounted for, as the age of a root segment can considerably influence its physiology. This has been especially documented for the release of protons and carboxylates in cluster roots of white lupin (Neumann and Martinoia, 2002).



**Figure 1.20.** Maize-faba bean intercropping performance in two field experiments with three barrier treatments: a solid, impermeable plastic sheet preventing root contact and solute transfers between the species (black bars); a nylon mesh that prevented root contact but enabled solute transfer (gray bars); and no barrier between the root system (white bars). (a), grain yield of maize and faba bean from Li et al. (2007), reprinted with permission from the National Academy of Science of the United States. (b) and (c), grain yield (b) and P uptake (c) of maize and faba bean from Li et al. (1999, 2003b), reprinted with permission from Springer Science+Business Media. For each species, different letters indicate significant differences among barrier treatments ( $P < 0.05$ ).

Besides the exudation of P-mobilizing compounds, other processes may also induce changes in rhizosphere P availability as a consequence of interactions with the uptake of other nutrients, as for example N uptake and its effect on rhizosphere pH. The potential role of calcium (Ca) uptake has been recently demonstrated by Devau et al. (2010). Increased P availability in the rhizosphere of durum wheat could not be explained fully by P uptake combined with rhizosphere alkalization due to nitrate nutrition. However, when accounting for Ca uptake, Devau et al. (2010) obtained a good agreement between measured and may thereby facilitate P acquisition of the intercropped cereal.

Unfortunately, we have little experimental evidence to support the facilitation of P acquisition in intercropping. Causal relationships between increased P acquisition and rhizosphere processes altering P availability are often lacking, in contrast with the well-documented role of N facilitation in cereal/legume intercropping. Only a few studies have attempted to measure both rhizosphere processes and changes in P availability (Song et al., 2007; Wang et al., 2007a; Li et al., 2008) or P acquisition in intercropping systems. In addition, rhizosphere processes may vary greatly with soil type and plant species (Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2009), and P availability in the rhizosphere of intercropped species has been mostly studied in alkaline/neutral soils. These complex interactions need to be examined in a range of soil types including acidic soils (Wang et al., 2007a, 2007b; Li et al., 2010). For instance, the hypothesis of facilitation of cereal P acquisition due to legume-mediated rhizosphere acidification has only been tested in alkaline/neutral soils (Li et al., 2003a, 2008; Cu et al., 2005). It should also be tested in acidic soils, where alkalization might prove more efficient at increasing P availability.

#### **V.5. Microbially mediated rhizosphere interactions**

Besides direct root-induced chemical processes in the rhizosphere, facilitation can also occur as a consequence of shifts in the microbial community structure, biomass, or activity (Fig. 3). Plant species exert a selective influence on rhizosphere microbial communities due to differences in amounts and composition of root exudates and rhizodeposits (Hartmann et al., 2009; Dennis et al., 2010). For instance, differences in fungal community structure in the rhizosphere of white lupin were attributed to citric acid, while differences in bacterial community structure were attributed to the presence of cis-aconitic, citric, and malic acids (Marschner et al., 2002). In addition, roots exude a range of secondary metabolites and signaling molecules that shape microbial communities and are implicated in root-root and root-microbe communication (Walker et al., 2003). Rhizosphere communities can thus vary with plant species (Marschner et al., 2001, 2006; Smalla et al., 2001) and/or plant genotype-soil interactions (Marschner et al., 2001, 2004). In addition to the selective effect of rhizodeposition, there is increasing evidence that soil chemical properties such as pH have a major influence on the structure of soil microbial communities (Philippot et al., 2009; Rousk et al., 2010). To what extent this would apply to rhizosphere pH changes remains an open question (Hinsinger et al., 2009), which would be worth testing in cereal/legume intercropping systems.

Several studies have shown significant changes in microbial community structure in the rhizosphere of intercropped species compared with those of sole crops (Song et al., 2007; Wang et al., 2007a; Li et al., 2010). Intermingling of roots of the intercropped species can result in a common microbial community structure, which might simply be a mixture of the respective communities of each of the two species (Wang et al., 2007a). However, in the rhizosphere of intermingled roots, a greater diversity of organic compounds could be expected if there are differences in root adiate composition between the intercropped species. In that case, the microbial community of intercropped species would not be a simple mixture of the communities of each of the two species. So far, effects of intercropping on microbial community structure are contradictory. Fan et al. (2011) found little effect of maize/faba bean intercropping on the community structure of ammonia oxidizers. The sampling technique and growth stage may also explain discrepancies among studies.

Changes in microbial community structures alone are not as important as changes in microbial biomass and activity, which can influence plant growth by altering root growth via hormone production or nutrient availability through mineralization (Song et al., 2007; Richardson et al., 2009; Fan et al., 2011). Marschner et al. (2006) observed a correlation between microbial P and acid phosphatase activity under P-limiting conditions. However, there is often a weak link between microbial community composition and activity, because many of these functions are carried out by a wide range of microorganisms, which form substrate guilds (Zak et al., 1994). The consequence of such functional redundancy is that changes in the abundance of a single species often have little effect on a given function (Miethling et al., 2003). However, even for functional communities with low levels of redundancy, like nitrifiers (ammonia-oxidizing archea and bacteria), their community structure was not modified by intercropping (Fan et al., 2011). Nevertheless, there are indications that changes in overall microbial community composition can be correlated with changes in certain microbial activities, including phosphatase activities (Kandeler et al., 2002).

In order to assess the effect of microbial community structure on P acquisition of intercropped species, specific functional groups of microorganisms should be targeted, such as those implicated in the mobilization of inorganic or organic P pools in soils. The capacity to increase the availability of inorganic P is widespread across soil microorganisms, as it originates in the production of protons, organic acids, and ligands, which are ubiquitous physiological traits among rhizosphere P-solubilizer microorganisms (Richardson et al., 2009). Besides P-solubilizer microorganisms, numerous microorganisms also use phytate, an important pool of soil organic P (Turner et al., 2002), presumably through the production of phytases (Jorquera et al., 2008). These authors found that the proportion of phytase-mobilizing bacteria from the rhizosphere of graminaceous species (wheat, 19.6%; oat [*Avena sativa*], 17%) was twice that found for a legume (yellow lupin [*Lupinus luteus*], 8.2%). Although their approach was based on culturable bacteria only, these results suggest that intercropping species such as cereals and legumes may select different functional bacterial

populations, resulting in varying capacities to mobilize phytate in the rhizosphere. To confirm this hypothesis, it will be necessary to develop molecular tools to probe microbial phytase genes, whether from bacterial or fungal origin. Unfortunately, phytases belong to four classes (Mullaney and Ullah, 2007), and molecular tools have been designed so far only for one class, the b-propeller phytases (Jorquera et al., 2011), corresponding to alkaline phytases found only in bacteria (Lim et al., 2007).

Another potential indirect effect in the rhizospheres of intercropped species is enhanced nutrient mineralization due to the priming effect. The priming effect is defined as the change in soil organic matter (SOM) decomposition rates, resulting from the addition of fresh organic matter (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2008). Thus, it can occur in the rhizosphere via root turnover and rhizodeposition (Cheng, 2009). Fontaine et al. (2011) suggested that microorganisms use the energy from this fresh material to decompose SOM in order to release organic N when inorganic N is limiting. P limitation has never been proven to provoke a priming effect, but it may be likely in ecosystems that are primarily P limited, such as in the tropics. A positive priming effect (stimulation of SOM mineralization) should lead to the recycling of organic N and P and may ultimately enhance plant growth (Kuzyakov et al., 2000). Decomposition of the recalcitrant SOM is not accessible to all microorganisms and is in fact restricted to populations endowed with special enzymatic capacities. All those microorganisms have not yet been clearly identified, but a few phylogenetic groups are suspected to share this function (Bernard et al., 2007; Fontaine et al., 2011). As a consequence, the priming effect is dependent on both the microbial community composition and the quality of the fresh organic substrate. Actually, highly labile substrates would be used rapidly by populations that allocate their energy to growth rather than enzymatic machinery. Polymerized or aromatic compounds are more prone to generate some priming effect than Glc (Fontaine et al., 2011). The quantity and the quality of rhizodeposits may thus influence the structure and the diversity of the rhizosphere microbial community, and priming effect intensity should vary accordingly. Cheng (2009) indeed measured a 2-fold larger priming effect in the rhizosphere of pea (*Pisum sativum*) than in that of wheat. The priming effect has never been measured in the context of cereal/legume intercropping, but theoretically, rhizodeposits of one of the intercropped species that might release P in SOM could benefit the growth of the associated plant species via their intermingled rhizospheres.

The existence of interconnected, common mycorrhizal networks (CMN) bridging the roots of two plants may also increase P availability to intercropped species. Direct transfer of nutrients between the intercropped species via CMN has been documented for N but not yet for P. Using  $^{15}\text{N}$  tracer, Li et al. (2009) showed that there was little transfer of N to the intercropped species when the donor was the cereal (rice [*Oryza sativa*]), with no significant role of CMN. In contrast, the transfer of N was much increased by the development of CMN when the donor species was the legume (mung bean [*Vigna adiate*]), which contributed up to 16% of the N taken up by rice.



## V.6. Conclusion

Current evidence for improved growth and nutrition in cereal/legume intercropping systems holds great promise for ecological intensification of agroecosystems. Much of our knowledge of nutrient efficiency in such systems has concerned N, especially with regard to legume N<sub>2</sub> fixation. Studies on P are rare, and few of these distinguish between complementarity and facilitation or provide convincing evidence that a specific rhizosphere process explains the improved P efficiency when cereals and legumes are intercropped. Additional research is needed to confirm whether positive interactions occur in intercropped cereals and legumes, which could be manipulated to improve P acquisition efficiency for both low input and intensive agroecosystems (Zhang et al., 2010). Experiments need to be specifically designed for such purposes. Given the complexity of the underlying mechanisms, mechanistic modeling should also be further developed and tested.

## References

- Bedoussac, L., Justes E. 2010. The efficiency of a durum wheat-winter pea intercrop to improve yield and wheat grain protein concentration depends on N availability during early growth. *Plant and Soil* 330:19–35.
- Bernard, L., Mougél C., Maron P.A., Nowak V., Leveque J., Henault C., Haichar F.Z., Berge O., Marol C., Balesdent J., Gibiat F., Lemanceau P., Ranjard L. 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from <sup>13</sup>C-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology* 9:752–764.
- Bertness, M. D., Callaway R. 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9:191-193.
- Blagodatskaya, E., Kuzyakov Y. 2008. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biology and Fertility of Soils* 45:115–131.
- Bouwman, A.F., Beusen A.H.W., Billen G. 2009. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970–2050. *Global Biogeochemical Cycles* 23:1-16.
- Cahill, J.F., Mc Nickle G.G., Haag J.J, Lamb E.G., Nyanumba S.M., St Clair C.C. 2010. Plants integrate information about nutrients and neighbors. *Science* 328:1657.
- Callaway, R.M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61:306–349
- Callaway, R.M. 2007. Direct mechanisms for facilitation. In RM Callaway, ed, *Positive Interactions and Interdependence in Plant Communities*. Springer, Dordrecht, The Netherlands:15–59.
- Cassman, K.G. 1999. Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA* 96:5952–5959.
- Cheng, W. 2009. Rhizosphere priming effect: its functional relationships with microbial turnover, evapotranspiration, and C-N budgets. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1795–1801.
- Cordell, D., Drangert J.O., White S. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292–305.

- Cu, S.T.T, Hutson J., Schuller K.A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143–151.
- De Kroon, H. 2007. Ecology: how do roots interact? *Science* 318: 1562–1563
- Dennis, P.G., Miller A.J., Hirsch P.R. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72:313–327.
- Devau, N, Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183–1197.
- Fan F, Zhang F., Lu, Y. 2011. Linking plant identity and interspecific competition to soil nitrogen cycling through ammonia oxidizer communities. *Soil Biology and Biochemistry* 43:46–54.
- Fontaine, S., Henault C., Aamor A., Bdioui N., Bloor J.M.G., Maire V., Mary B., Revalliot S., Maron P.A. 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. *Soil Biology and Biochemistry* 43:86–96.
- Fridley, J.D. 2001. The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* 93:514–526.
- Gaume, A., 2000. Low-P tolerance of various maize cultivars: the contribution of the root exudation. PhD thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
- Gersani, M., Brown J.S., O'Brien E.E., Maina G.M., Abramsk Z. 2001. Tragedy of the commons as a result of root competition. *Journal of Ecology* 89:660–669.
- Hartmann, A., Schmid M., van Tuinen D., Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235–257.
- Hauggaard-Nielsen, H., Gooding M., Ambus P., Corre-Hellou G., Crozat Y., Dahlmann C., Dibet A., von Fragstein P., Pristeri A., Monti M., Jensen E.S. 2009. Pea-barley intercropping for efficient symbiotic N<sub>2</sub>-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crops Research* 113:64–71.
- Hauggaard-Nielsen, H., Jensen E.S. 2005. Facilitative root interaction in intercrops. *Plant and Soil* 274:237–250.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173–195.
- Hinsinger, P., Bengough A.G., Vetterlein D., Young I.M. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321:117–152.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. 2003. Origins of root-induced pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248:43–59.
- Hodge, A. 2009. Root decisions. *Plant Cell and Environment* 32:628–640.
- Inal, A., Gunes A., Zhang F., Cakmak I. 2007. Peanut/maize intercropping induced changes in rhizosphere and nutrient concentrations in shoots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:350–356.
- Jorquera, M.A., Crowley D.E., Marschner P., Greiner R., Fernandez M.T., Romero D., Menezes-Blackburn D., De La Luz Mora M. 2011. Identification of b-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. From the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiol Ecol* 75:163–172.
- Jorquera M.A., Hernandez M.T., Rengel Z., Marschner P., Mora M.L. 2008. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-

- solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils* 44:1025–1034.
- Kandeler, E., Marschner P., Tschirko D., Gahoonia T.S., Nielsen NE. 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil* 238:301–312.
- Kuzyakov, Y., Friedel J.K., Stahr K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1485–1498.
- Li, H., Shen J., Zhang F, Clairotte M., Drevon J.J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139–150.
- Li, H.G., Shen J.B., Zhang F.S., Marschner P., Cawthray G., Rengel Z. 2010. Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil. *Biology and Fertility of Soils* 46:79–91.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceeding National Acadademy of Science of the USA* 104:11192–11196.
- Li, L, Sun J., Zhang F., Guo T., Bao X., Smith F.A., Smith S.E. 2006. Root distribution and interactions between intercropped species. *Oecologia* 147:280–290.
- Li, L, Tang, C, Rengel Z, Zhang F. 2003a. Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat from an organic phosphorus source. *Plant and Soil* 248:297–303.
- Li, L., Yang S., Li X., Zhang F., Christie P.1999. Interspecific complementary and competitive interactions between intercropped maize and faba bean. *Plant and Soil* 212:105–114.
- Li, L., Zhang F., Li X., Christie P., Sun J., Yang S., Tang C. 2003b. Interspecific facilitation of nutrient uptake by intercropped maize and faba bean. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65:61–71.
- Li, S.M., Li L., Zhang F.S., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297–303.
- Li, Y.F., Ran W., Zhang R.P., Sun S.B., Xu G.H. 2009. Facilitated legume nodulation, phosphate uptake and nitrogen transfer by arbuscular inoculation in an upland rice and mung bean intercropping system. *Plant and Soil* 315:285–296.
- Lim, B.L., Yeung P., Cheng C., Hill J.E. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *ISME J* 1:321–330.
- Loreau, M., Hector A. 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412:72–76.
- Lynch, J.P. 2007. Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany* 55:493–512.
- Maestre, F. T., Callaway R. M., Valladares F., Lortie C. J. 2009. Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97:199-205.
- Marschner, P., Crowley D., Yang C.H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261:199–208.
- Marschner, P., Neumann G., Kania A., Weiskopf L., Lieberei R. 2002. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* 246:167–174.

- Marschner, P., Solaiman Z., Rengel Z. 2006. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* 283:11–24.
- Marschner, P., Yang C.H., Lieberei R., Crowley D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1437–1445.
- Miethling, R., Ahrends K., Tebbe C.C. 2003. Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1405–1410.
- Mullaney, E.J., Ullah A.H.J. 2007. Phytases: attributes, catalytic mechanisms and applications. In Turner, B.L., Richardson A.E., Mullaney E.J. eds. *Inositol Phosphates: Linking Agriculture and the Environment*. CAB International, Wallingford, UK:97–110.
- Neumann, G., Martinoia E. 2002. Cluster roots: an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* 7:162–167.
- Neumann, G., Romheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211:121–130.
- Nuruzzaman, M., Lambers H., Bolland M.D.A., Veneklaas E.J. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* 281:109–120.
- Pearse, S.J., Veneklaas E.J., Cawthray G.R., Bolland M.D.A., Lambers H. 2006. Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant and Soil* 288:127–139.
- Philippot, L., Cuhel J., Saby N.P.A., Cheneby D., Chronakova A., Bru D., Arrouays D., Martin-Laurent F., Simek M. 2009. Mapping field-scale spatial patterns of size and activity of the denitrifier community. *Environmental Microbiology* 11:1518–1526.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P.W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: a modeling approach. *American Naturalist* 171:44–58.
- Richardson, A.E., Barea J.M., McNeill A.M., Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305–339.
- Richardson, S.J., Peltzer D.A., Allen R.B., McGlone M.S., Parfit R.L. 2004. Rapid development of phosphorus limitation in temperate rainforest along the Franz Josef soil chronosequence. *Oecologia* 139:267–276.
- Rockstrom, J., Steffen W., Noone K., Persson A., Chapin F.S. III, Lambin E.F., Lenton T.M., Scheffer M, Folke C., Schellnhuber H.J., Nykvist B., de Wit C.A., Hughes T., van der Leeuw S., Rodhe H., Sörlin S., Peter K., Snyder P.K, Costanza R, Svedin, U, Falkenmark M, Karlberg L, Corell R.W, Victoria J., Fabry V.J., Hansen J., Walker B., Liverman D., Richardson K, Crutzen P, Fole, J.A. 2009. A safe operating space for humanity. *Nature* 461:472–475.
- Rose, T.J., Rengel Z., Ma Q., Bowden J.W. 2007. Differential accumulation patterns of phosphorus and potassium by canola cultivars compared to wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 170:404–411.
- Rousk, J., Baath E., Brookes P.C., Lauber C.L., Lozupone C., Caporaso J.G., Knight R., Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4:1340–1351.
- Smalla, K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient

- gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environmental Microbiology* 67:4742–4751.
- Song, Y.N., Zhang F.S., Marschner P., Fan F.L., Gao H.M., Bao X.G., Sun J.H., Li L. 2007. Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 43:565–574.
- Tang, C., Mc Lay, C.D.A., Barton, L. 1997. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37:563–570.
- Tilman, D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Dobson A., Howarth R., Schindler D., Schlesinger, W.H., Simberloff D., Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292:281–284.
- Turner B.L. 2008. Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of Ecology* 96:698–702.
- Turner, B.L., Paphazy M.J., Haygarth P.M., Mc Kelvie I.D. 2002. Inositol phosphates in the environment. *Philosophical Transaction of the Royal Society of Biological Sciences* 357:449–469.
- Vance, C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157:423–447.
- Vitousek, P.M., Farrington H. 1997. Nutrient limitation and soil development: experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry* 37:63–75.
- Vitousek, P.M., Naylor R., Crews T., David M.B., Drinkwater L.E., Holland E., Johnes P.J., Katzenberger J., Martinelli L.A., Matson, P.A., Nziguheba G., Ojima D., Palm C. A., Robertson G. P., Sanchez P. A., Townsend A. R., Zhang F. S. 2009. Nutrient imbalances: pollution remains response. *Science* 326:665–666.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E., Vivanco, J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132:44–51.
- Wang, D., Marschner P., Solaiman Z., Rengel Z. 2007a. Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology and Biochemistry* 39:249–256.
- Wang, D.M., Marschner P., Solaiman Z., Rengel Z. 2007b. Belowground interactions between intercropped wheat and Brassicas in acidic and alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39:961–971.
- Zak, J.C., Willig M.R., Moorhead D.L., Wildman H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26:1101–1108.
- Zhang, F., Shen J., Zhang J., Zuo Y., Li L., Chen X. 2010. Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity: implications for China. *Advances in Agronomy* 107:1–32.

### Références de la synthèse bibliographique hors article

- Ashton, I. W., Miller A. E., Bowman W. D., Suding K. N. 2008. Nitrogen preferences and plant-soil feedbacks as influenced by neighbors in the alpine tundra. *Oecologia* 156:625–636.
- Ashton, I. W., Miller A. E., Bowman W. D., Suding K. N. 2010. Niche complementarity due to plasticity in resource use: plant partitioning of chemical N forms. *Ecology* 91:3252–3260.
- Bais, H. P., T. L. Weir, Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233–266.
- Baligar, V. C., Fageria N. K., He Z. L. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32:921–950.
- Bao, S. J., An L. J., Su S., Zhou Z. J., Gan Y. B. 2011. Expression patterns of nitrate, phosphate, and sulfate transporters in *Arabidopsis* roots exposed to different nutritional regimes. *Botany-Botanique* 89:647–653.
- Barber, S.A. 1984. Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. Wiley, New York 398pp.
- Barber, S. A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. Wiley, New York 384pp.
- Bates, T. R., Lynch J. P. 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell and Environment* 19:529–538.
- Baudoin, E., Benizri E., Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1183–1192.
- Bedoussac, L. Justes E. 2010. Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. *Plant and Soil* 330:37–54.
- Berger, U., Piou C., Schiffers K., Grimm V. 2008. Competition among plants: Concepts, individual-based modeling approaches, and a proposal for a future research strategy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9:121–135.
- Bertness, M. D., Callaway R. 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9:191–193.
- Bidel, L. P. R., Renault P., L. Pages, Riviere L. M. 2001. An improved method to measure spatial variation in root respiration: application to the taproot of a young peach tree *Prunus persica*. *Agronomie* 21:179–197.
- Blossfeld, S., Gansert D., Thiele B., Kuhn A. J., Loesch R. 2011. The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of *Juncus* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 43:1186–1197.
- Bolan, N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134:189–207.
- Bolan, N. S., Elliott J., Gregg P. E. H., Weil S. 1997. Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 24:169–174.
- Bonser, A. M., Lynch J., Snapp S. 1996. Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 132:281–288.
- Borch, K., T. Bouma J., Lynch J. P., Brown K. M. 1999. Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell and Environment* 22:425–431.

- Bowen, G. D., Rovira A. D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102.
- Bravin, M.N., Travassac F., Le Floch M., Hinsinger P., Garnier J-M., 2008. Oxygen input controls the spatial and temporal dynamics of arsenic at the surface of a flooded paddy soil and in the rhizosphere of lowland rice (*Oryza sativa* L.) : a microcosm study. *Plant and Soil* 312:207–218.
- Bravin, M. N., Tentscher P., Rose J., Hinsinger P. 2009. Rhizosphere pH Gradient Controls Copper Availability in a Strongly Acidic Soil. *Environmental Science and Technology* 43:5686-5691.
- Brooker, R.W., Maestre F.T., Callaway R.M., Lortie C.L., Cavieres L.A. , Kunstler G., Liancourt P., Tielborger K., Travis, J.M.J., Anthelme F., Armas C., Coll L., Corcket E., Delzon S., Forey E., Kikvidze Z., Olofsson J., Pugnaire F., Quiroz C.L., Saccone P., Schiffers K., Seifan M., Touzard B., Michalet R. 2003. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* 96:18-34.
- Brune, A., Frenzel P., Cypionka H. 2000. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *Fems Microbiology Reviews* 24:691-710.
- Bruno, J.F. Stachowicz J.J., Bertness M.D. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 119-125.
- Cahill, J.F., Mc Nickle G.G. 2011. The Behavioral Ecology of Nutrient Foraging by Plants. *Annual Review Ecology Evolution Systems* 42:289-311.
- Caldwell, M.M., Manwaring J.H., Durham S.L. 1996. Species interactions at the level of fine roots in the field: influence of soil nutrient heterogeneity and plant size. *Oecologia* 106:440-447.
- Callaway, R.M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61: 306-349.
- Callaway, R.M., Pnning S.C., Richards C.L. 2003. Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* 84:1115-1128.
- Caravaca, F., M. Aiguacil M., Torres P., Roldan A. 2005. Plant type mediates rhizospheric microbial activities and soil aggregation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma* 124:375-382.
- Carminati, A., Moradi A. B., Vetterlein D., Vontobel P., Lehmann E., Weller U., Vogel H.J., Oswald S. E. 2010. Dynamics of soil water content in the rhizosphere. *Plant and Soil* 332: 163-176.
- Casper, B.B., Jackson R.B. 1997. Plant competition underground. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:545–70.
- Casper, B.B., Schenk H.J., Jackson R.B. 2003. Defining a plant's belowground of influence. *Ecology* 84:2313-2321.
- Cesco, S., Rombola A. D., Tagliavini M., Varanini Z., Pinton R. 2006. Phytosiderophores released by graminaceous species promote Fe-59-uptake in citrus. *Plant and Soil* 287:223-233.
- Chabbi, A., McKee K. L., Mendelssohn I. A. 2000. Fate of oxygen losses from *Typha domingensis* (Typhaceae) and *Cladium jamaicense* (Cyperaceae) and consequences for root metabolism. *American Journal of Botany* 87: 1081-1090.
- Chen, Y. F., Wang Y., Wu W. H. 2008. Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 50:835-848.
- Clarkson, D. T. 1985. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 36:77-115.
- Corre-Hellou, G., Y. Crozat. 2005. Assessment of root system dynamics of species grown in

- mixtures under field conditions using herbicide injection and  $^{15}\text{N}$  natural abundance methods: A case study with pea, barley and mustard. *Plant and Soil* 276:177-192.
- Corre-Hellou, G., Fustec J., Crozat Y. 2006. Interspecific competition for soil N and its interaction with  $\text{N}_2$  fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant and Soil* 282:195-208.
- Craine, J. M., Fargione J., Sugita S. 2005. Supply pre-emption, not concentration reduction, is the mechanism of competition for nutrients. *New Phytologist* 166:933-940.
- Cu, S. T. T., Hutson J., Schuller K. A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.
- Curl, E. A., Truelove B. 1986. *The rhizosphere*. Springer, Berlin, 288pp
- Czaran, T., Bartha S. 1992. Spatiotemporal dynamic-models of plant populations and communities. *Trends in ecology and environment* 7: 38-42.
- Czarnes, S., Hiller S., Dexter A. R., Hallett P. D., Bartoli F. 1999. Root : soil adhesion in the maize rhizosphere: the rheological approach. *Plant and Soil* 211:69-86.
- Czarnes, S., Hallett P. D., Bengough A. G., Young I. M. 2000. Root- and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport. *European Journal of Soil Science* 51:435-443.
- Dakora, F. D., Phillips D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*: 245:35-47.
- Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 156:1-20.
- Darrah, P. R., Jones D. L., Kirk G. J. D., Roose T. 2006. Modelling the rhizosphere: a review of methods for 'upscaling' to the whole-plant scale. *European Journal of Soil Science* 57:13-25.
- Da Silva, E.V., de Moraes Gonçalves J.L., de Freitas Coelho S.R., Moreira e Moreira de Miranda Mello S.L., Bouillet J.P., Jourdan C., Laclau J.P. 2009. Dynamics of fine root distribution after establishment of monospecific and mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. *Plant and Soil* 325:305-318.
- Daufresne, T., Hedin L. O. 2005. Plant coexistence depends on ecosystem nutrient cycles: Extension of the resource-ratio theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9212-9217.
- de Graaff, M.A., Van Kessel C., Six J. 2009. Rhizodeposition-induced decomposition increases N availability to wild and cultivated wheat genotypes under elevated  $\text{CO}_2$ . *Soil Biology and Biochemistry* 41:1094-1103.
- de Kroon, H., Hendriks M., van Ruijven J., Ravenek J., Padilla F. M., Jongejans E., Visser E. J. W., Mommer L. 2012. Root responses to nutrients and soil biota: drivers of species coexistence and ecosystem productivity. *Journal of Ecology* 100:6-15.
- Dennis, P.G., Miller A.J., Hirsch P.R. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbial Ecology* 72:313–327.
- Dexter, A. R. 1987. Compression of soil around roots. *Plant and Soil* 97:401-406.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gerard F. 2011. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil*



- 348:203-218.
- Dong, D. F., Peng X. X., Yan X. L. 2004. Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. *Physiologia Plantarum* 122:215-222.
- Dunbabin, V. M., Diggle A. J., Rengel Z. 2002. Simulation of field data by a basic three-dimensional model of interactive root growth. *Plant and Soil* 239:39-54.
- Dunbabin, V. M., McDermott S., Bengough A. G. 2006. Upscaling from rhizosphere to whole root system: Modelling the effects of phospholipid surfactants on water and nutrient uptake. *Plant and Soil* 283:57-72.
- Egerton-Warburton, L. M., N. C. Johnson, and E. B. Allen. 2007. Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: A cross-site test in five grasslands. *Ecological Monographs* 77:527-544.
- Eissenstat, D. M. Yanai R. D. 1997. The ecology of root lifespan. *Advances in Ecological Research* 27:1-60.
- Eissenstat, D. M., Wells C. E., Yanai R. D., Whitbeck J. L. 2000. Building roots in a changing environment: implications for root longevity. *New Phytologist* 147: 33-42.
- Esser, H. G., Carminati A., Vontobel P., Lehmann E. H., Oswald S. E. 2010. Neutron radiography and tomography of water distribution in the root zone. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173:757-764.
- Fan, X.H., Tang C., Rengel Z. 2002. Nitrate uptake, nitrate reductase distribution and their relation to proton release of five nodulated grain legumes. *Annals of Botany* 90:315-323.
- Fan, F., Zhang F., Song Y., Sun J., Bao X., Guo T., Li L. 2006. Nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) interacting with a non-legume in two contrasting intercropping systems. *Plant and Soil* 283:275-286.
- Fang, S., Gao X., Deng, Y., Chen X., Liao H. 2011. Crop root behavior Coordinates phosphorus status and neighbors: from field studies to three-dimensional in situ. Reconstruction of Root System Architecture. *Plant Physiology* 155:1277-1285.
- Fargione, J., Tilman D. 2005. Niche differences in phenology and rooting depth promote coexistence with a dominant C-4 bunchgrass. *Oecologia* 143: 598-606.
- Finlay, R. D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59:115-1126.
- Forde, B., Lorenzo H. 2002. The nutritional control of root development. Interactions in the root environment: an integrated approach. Proceedings of the Millennium Conference on Rhizosphere Interactions, IACR-Rothamsted, UK, 10-12 April 2001.
- Fransen, B., H., de Kroon, Berendse F. 1998. Root morphological plasticity and nutrient acquisition of perennial grass species from habitats of different nutrient availability. *Oecologia* 115:351-358.
- Fransen, B., de Kroon H. 2001. Long-term disadvantages of selective root placement: root proliferation and shoot biomass of two perennial grass species in a 2-year experiment. *Journal of Ecology* 89:711-722.
- Fridley, J.D. 2001. The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* 93: 514-526.
- Fustec, J., Lesuffleur F., Mahieu S., Cliquet J.B. 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30:57-66.
- Gahoonia, T.S., Claassen N., Jungk A. 1992. Mobilization of phosphate in different soils by

- ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant and Soil* 140:241–248.
- Gahoonia, T.S., Nielsen N.E. 1997. Variation in root hairs of barley cultivars doubled soil phosphorus uptake. *Euphytica* 98: 177-182.
- Gahoonia, T.S., Nielsen N.E. 1998. Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus ( $^{32}\text{P}$ ) uptake from soil. *Plant and Soil* 198:147-152.
- Gahoonia, T.S., Nielsen N.E. 2004. Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. *Plant and Soil* 260: 47–57.
- Gao, Y., Duan A., Qiu X., Liu Z., Sun J., Zhang J., Wang H. 2010. Distribution of roots and root length density in a maize/soybean strip intercropping system. *Agricultural Water Management* 98:199-212.
- Gaume, A., Mächler F., De León C., Narro, L. Frossard, E., 2001. Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. *Plant and Soil* 228:253–264.
- Ge, Z., Rubio G., Lynch J.P. 2000. The importance of root gravitropism for inter-root competition and phosphorus acquisition efficiency: results from a geometric simulation model. *Plant Soil* 218:159–171.
- Geelhoed, J. S., van Riemsdijk W. H., Findenegg G. R. 1999. Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. *European Journal of Soil Science* 50:379-390.
- George, T. S., Turner B. L., Gregory P. J., Cade-Menun B. J., Richardson A. E. 2006. Depletion of organic phosphorus from Oxisols in relation to phosphatase activities in the rhizosphere. *European Journal of Soil Science* 57: 47-57.
- George, T. S., Gregory P. J., Hocking P., Richardson A. E. 2008. Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilization of organic P substrates in vitro, but does not explain differences in the P-nutrition of plants when grown in soils. *Environmental and Experimental Botany* 64:239-249.
- Ghaley, B. B., Hauggaard-Nielsen H., Høgh-Jensen H., Jensen E. S. 2005. Intercropping of wheat and pea as influenced by nitrogen fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 73:201-212.
- Giaveno, C., Celi L., Richardson A. E., Simpson R. J., Barberis E. 2010. Interaction of phytases with minerals and availability of substrate affect the hydrolysis of inositol phosphates. *Soil Biology and Biochemistry* 42:491-498.
- Godlewski, M., Adamczyk B. 2007. The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 657-664.
- Gojon, A., Nacry P., Davidian J.C. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:328-338.
- Goldberg, DE. 1990. Components of resource competition in plant communities. In Grace J.B., Tilman D. eds. *Perspectives on Plant Competition* San Diego: Academic 1990pp:27–65.
- Gonkhamdee, S., Pierret A., Maeght J.L., Serra V., Pannengpetch K., Doussan C., Pages L. 2010. Effects of corn (*Zea mays* L.) on the local and overall root development of young rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muel. Arg). *Plant and Soil* 334:335-351.
- Gordon, W. S., Jackson R. B. 2000. Nutrient concentrations in fine roots. *Ecology* 81:275-280.
- Graham, P. H., Vance C. P. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research* 65:93-106.
- Grayston, S.J., Vaughan D., Jones. D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial

- activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5:29-56.
- Gregory, P. J. 2006. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *European Journal of Soil Science* 57:2-12.
- Griffiths, B. S., Ritz K., Ebbelwhite N., Dobson G. 1999. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31:145-153.
- Gross, K. L., Peters A., Pregitzer K. S. 1993. Fine root growth and demographic responses to nutrient patches in 4 old-field plant species. *Oecologia* 95: 61-64.
- Grime, J. P. 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. Wiley, Chichester 456pp.
- Gruntman, M., A. Novoplansky. 2004. Physiologically mediated self/non-self discrimination in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3863-3867.
- Guidi, G., Poggio G., Petruzzelli G. 1985. The porosity of soil aggregates from bulk soil and from the soil adhering to roots. *Plant and Soil* 87: 311-314.
- Hägström, J., James W. M., Skene K. R. 2001. A comparison of structure, development and function in cluster roots of *Lupinus albus* L. under phosphate and iron stress. *Plant and Soil* 232: 81-90.
- Haichar, F. e. Z., Marol C., Berge O., Rangel-Castro J. I., Prosser J. I., Balesdent J., Heulin T., Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *Isme Journal* 2:1221-1230.
- Harmsen., 2007. Measuring bioavailability: from a scientist approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36: 1420-1428.
- Hartmann, A., Schmid M., van Tuinen D., Berg G. 2009. Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil* 321: 235-257.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus P., Jensen E. S. 2001. Temporal and spatial distribution of roots and competition for nitrogen in pea-barley intercrops - a field study employing P-32 technique. *Plant and Soil* 236:63-74.
- Hayes, J.E., Richardson A.E., Simpson R.J. 2000. Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biology and Fertility of Soils* 32:279-286.
- Hell, R., Stephan U. W. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216: 541-551.
- Herben T., Novoplansky A. 2010. Fight or flight: plastic behavior under self-generated heterogeneity. *Evolutionary Ecology* 24:1521-1536.
- Hill, J. O., Simpson R. J., Moore A. D., Chapman D. F. 2006. Morphology and response of roots of pasture species to phosphorus and nitrogen nutrition. *Plant and Soil* 286: 7-19.
- Hiltner, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Grundüngung und Brache. *Arbeiten der Deutsche Landwirtschaftliche Gesellschaft* 98:59-78.
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advance in Agronomy* 64:225-265.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248:43-59.
- Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W. 2005. Rhizosphere geometry and

- heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168: 293–303.
- Hinsinger, P., A. G. Bengough, D. Vetterlein, and I. M. Young. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* 321:117-152.
- Hinsinger, P., Brauman A., Devau N., Gérard F., Jourdan C., Laclau J-P., Le Cadre E., Jaillard B. 2011. Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? *Plant and Soil* 348:203-218.
- Hodge, A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* 162:9-24.
- Hodge, A. 2009. Root decisions. *Plant Cell and Environment* 32: 628-640.
- Hodge, A., Berta G., Doussan C., Merchan F., Crespi M. 2009. Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil* 321:153-187.
- Hoffland, E., G., Findenegg R., Nelemans J. A. 1989. Solubilization of rock phosphate by rape. 2. Local root exudation of organic-acids as a response to P-starvation. *Plant and Soil* 113:161-165.
- Hoffland, E., Wei C., Wissuwa M. 2006. Organic anion exudation by lowland rice (*Oryza sativa* L.) at zinc and phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 283:155-162.
- Høgh-Jensen, H., J. K. Schjoerring, and J. F. Soussana. 2002. The influence of phosphorus deficiency on growth and nitrogen fixation of white clover plants. *Annals of Botany* 90: 745-753.
- Hooper, D. U., Dukes J. S. 2004. Overyielding among plant functional groups in a long-term experiment. *Ecology Letters* 7:95-105.
- Huston, M. A., De Angelis D. L. 1994. Competition and coexistence: the effects of resource transport and supply rates. *American Naturalist* 144:954–977.
- Hutchinson, G. E. 1957. Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22: 415-42.
- Isaac, M. E., J. Harmand M., Drevon J. J. 2011. Growth and nitrogen acquisition strategies of *Acacia senegal* seedlings under exponential phosphorus additions. *Journal of Plant Physiology* 168:776-781.
- Jakobsen, I., Abbott L.K., Robson A.D. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium-subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120:371-380.
- Jakobsen, I., Chen B., Munkvold L., Lundsgaard T., Zhu Y.G. 2005. Contrasting phosphate acquisition of mycorrhizal fungi with that of root hairs using the root hairless barley mutant. *Plant Cell and Environment* 28:928–938.
- James, J. J., Davies K. W., Sheley R. L., Aanderud Z. T. 2008. Linking nitrogen partitioning and species abundance to invasion resistance in the Great Basin. *Oecologia* 156:637-648.
- Jensen, E. S. 1996. Barley uptake of N deposited in the rhizosphere of associated field pea. *Soil Biology and Biochemistry* 28:159-168.
- Jobbágy, E.G. Jackson R.B. 2001. The distribution of soil nutrients with depth: Global patterns and the imprint of plants. *Biogeochemistry* 53:51–77.
- Jones, D.L., Darrah P.R. 1995. Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere C flow. *Plant and Soil* 173: 103-109.
- Jones, D. L. 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* 205:25-44.
- Jones, D.L., Dennis P.G., Owen A.G., van Hees P.A.W., 2003. Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil* 248:31-41.

- Jones, D. L., Nguyen C., Finlay R. D. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil* 321:5-33.
- Jungk, A. 2002. Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. *Plant Roots : The Hidden Half*, 3<sup>rd</sup> edn. New York, USA: Marcel Dekker 587-616.
- Kabir, Z., Koide R. T. 2000 The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential, soil aggregation and yield of maize. *Agriculture Ecosystems and Environment* 78:167-174.
- Keerthisinghe, G., Hocking P. J., Ryan P. R., Delhaize E. 1998. Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell and Environment* 21:467-478.
- Kelty, M. J. 2006. The role of species mixtures in plantation forestry. *Forest Ecology and Management* 233:195-205.
- Khalil, K., Mary B., Renault P. 2004. Nitrous oxide production by nitrification and denitrification in soil aggregates as affected by O<sub>2</sub> concentration. *Soil Biology and Biochemistry* 36:687-699.
- Kirk, G. J. D. and J. B. Bajita. 1995. Root-induced iron oxydation, pH changes and zinc solubilization in the rhizosphere of lowland rice. *New Phytologist* 131:129-137.
- Kirk, G. J. D., Santos E. E., Santos M. B. 1999. Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice growing in aerobic soil: rates of excretion and decomposition, effects on rhizosphere pH and effects on phosphate solubility and uptake. *New Phytologist* 142: 185-200.
- Kirk, G. J. D. 2003. Rice root properties for internal aeration and efficient nutrient acquisition in submerged soil. *New Phytologist* 159:185.194.
- Kirkby, E. A., Mengel, K. 1967. Ionic balance in different tissues of the tomato plants in relation to nitrate, urea and ammonium nutrition. *Plant Physiology* 42:6-14.
- Kirkby E.A., Knight A.H. 1977. Influence of the Level of Nitrate Nutrition on Ion Uptake and Assimilation, Organic Acid Accumulation and Cation-Anion Balance in Whole Tomato Plants. *Plant Physiology* 60:349-353.
- Kutschera, L., Lichtenegger E. 1992. *Wurzelatlas mitteleuropaischer Griinlandpflanzen*. Band 2: Pteridophyta und Dicotyledoneae, Teil 1: Morphologie, Anatomie, Okologie, Verbreitung, Soziologie, Wirtschaft. Gustav Fischer, Stuttgart 849pp.
- Kuzyakov, Y. Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 163: 421-431.
- Lambers, H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J., Veneklaas, E.J. 2006. Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Annals of Botany* 98:693-713.
- Lamont, B. B. 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters - a review. *Plant and Soil* 248:1-19.
- Laugier, E., Bouguyon E., Mauries A., Tillard P., Gojon A., Lejay L. 2012. Regulation of High-Affinity Nitrate Uptake in Roots of Arabidopsis Depends Predominantly on Posttranscriptional Control of the NRT2.1/NAR2.1 Transport System. *Plant Physiology* 158:1067-1078.
- Le Roux, P. C., McGeoch M. A. 2010. Interaction intensity and importance along two stress gradients: adding shape to the stress-gradient hypothesis. *Oecologia* 162:733-745.
- Leidi, E. O., D. N. Rodriguez-Navarro. 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. *New Phytologist* 147:337-346.

- Leitner, D., Klepsch S., Bodner G., Schnepf A. 2010. A dynamic root system growth model based on L-Systems. *Plant and Soil* 332:177-192.
- Leuschner, C., Coners H., Büttner V., 2001. Root competition between beech and oak: a hypothesis. *Oecologia* 126:276-284.
- Li, M., Osaki M., Rao I.M., Toshiaki Tadano, T. 1997. Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant and Soil* 195:161–169.
- Li, L., Yang S. C., Li X. L., Zhang F. S., Christie P. 1999. Interspecific complementary and competitive interactions between intercropped maize and faba bean. *Plant and Soil* 212:105-114.
- Li, L., Sun J. H., Zhang F. S., Li X. L., Yang S. C., Rengel Z. 2001. Wheat/maize or wheat/soybean strip intercropping I. Yield advantage and interspecific interactions on nutrients. *Field Crops Research* 71:123-137.
- Li, S.M., Li L., Zhang F., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94: 297-303.
- Li, L., Sun J., Zhang F., Guo T., Bao X., Smith F.A., Smith S.E. 2006. Root distribution and interactions between intercropped species. *Oecologia*, 147:280-290.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11192-11196.
- Li, H., J. Shen, Zhang F., Clairotte M., Drevon J. J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139-150.
- Li, Y.-Y., Yu C.B., Cheng X., Li C.J., Sun J.H., Zhang F.S., Lambers H., Li L. 2009. Intercropping alleviates the inhibitory effect of N fertilization on nodulation and symbiotic N<sub>2</sub> fixation of faba bean. *Plant and Soil* 323:295-308.
- Liao, H., X. L. Yan. 2001. Genotypic variation in root morphological characteristics of common bean in relation to phosphorus efficiency. *Acta Botanica Sinica* 43:1161-1166.
- Lindsay, W.L. 1979. *Chemical equilibria in soils*. John Wiley & Sons, New York, USA, 449pp.
- Liu, Y., Mi G. H., Chen F. J., Zhang J. H., Zhang F. S. 2004. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. *Plant Science* 167:217-223.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramirez A., Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287.
- Loreau, M. 1998. Biodiversity and ecosystem functioning: A mechanistic model. *Proceeding National Academy of Science of the US* 95:5632-5636.
- Loreau, M., Hector A. 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412:72-76.
- Loreau, M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., J. P. Grime J.P., Hector A., D. U. Hooper D.U., Huston M.A., D. Raffaelli, D., Schmid, B., Tilman, D., Wardle, D. A., 2001. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current knowledge and Future Challenges. *Science* 294:804-808.
- Loreau, M. 2010. Linking biodiversity and ecosystems: towards an unifying ecological theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences* 365:49-60.

- Louw-Gaume, A. E., Rao I. M., Gaume A. J., Frossard E. 2010. A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. *Plant and Soil* 328: 155-164.
- Lynch, J.P. 1995. Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* 109:7-13.
- Lynch, J. P., Brown K. M. 2001. Topsoil foraging - an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237:225-237.
- Lynch, J.P, 2007. Roots of the Second Green Revolution. *Australian Journal of Botany* 55:493-512.
- Ma, W., Li X.X., Li C.J. 2011. Modulation of Soil Particle Size and Nutrient Availability in the Maize Rhizosphere. *Pedosphere* 21:483-490.
- Maestre, F. T., Callaway R. M., Valladares F., Lortie C. J. 2009. Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97:199-205.
- Malamy, J. E. 2005. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell and Environment* 28:67-77.
- Marschner, H., Romheld V. 1994. Strategies of plant for acquisition of iron. *Plant and Soil* 165:261-274.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Ed 2. Academic Press, London 889pp.
- Marschner, H., Römheld V. 1996. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* 165 261-274.
- Marschner, P., Yang C. H., Lieberei R., Crowley D. E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1437-1445.
- Marschner, P., Solaiman Z., Rengel Z. 2006. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil* 283:11-24.
- Mc Kane, R.B., Johnson L.C., Shaver G.R., Nadelhoffer K.J., Rastetter E.B., Fry, B., Giblin A.E., Kiellandk K., Kwiatkowski B.L., Laundre J.A., Murray G., 2002. Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature* 415:68-71.
- Meding, S. M., Zasoski R. J. 2008. Hyphal-mediated transfer of nitrate, arsenic, cesium, rubidium, and strontium between arbuscular mycorrhizal forbs and grasses from a California oak woodland. *Soil Biology and Biochemistry* 40:126-134.
- Meinen, C., Leuschner C., Ryan N.T., Dietrich Hertel D., 2009. No evidence of spatial root system segregation and elevated fine root biomass in multi-species temperate broad-leaved forests. *Trees* 23:941-950.
- Miller, A.E., Bowman W.D., 2003. Alpine plants show species-level differences in the uptake of organic and inorganic nitrogen. *Plant and Soil* 250, 283–292.
- Miller, A. J., Cramer M. D. 2005. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274:1-36.
- Miller, A.E., Bowman W.D., Nash Suding K. 2007. Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: neighbor identity matters. *Ecology* 88:1832-1840.
- Mollier, A., Pellerin S. 1999. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* 50:487-497.
- Mommer, L., van Ruijven J., de Caluwe, H., Annemiek E. Smit-Tiekstra A.E., Cornelis A.M. Wagemaker, C.A.M., Joop Ouborg N.J., Bogemann G.M., van der Weerden G.M., Frank Berendse F., de Kroon H., 2010. Unveiling below-ground species abundance in a biodiversity experiment: a test of vertical niche differentiation among grassland

- species. *Journal of Ecology* 98:1117-1127.
- Moradi, A. B., Carminati A., Vetterlein D., Vontobel P., Lehmann E., Weller U., Hopmans J. W., Vogel H.J., Oswald S. E. 2011. Three-dimensional visualization and quantification of water content in the rhizosphere. *New Phytologist* 192:653-663.
- Morel, J. L., Habib L., Plantureux S., Guckert A. 1991. Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. *Plant and Soil* 136:11-119.
- Moreno-Espindola, I. P., Rivera-Becerril F., Ferrara-Guerrero M. d. J., De Leon-Gonzalez F. 2007. Role of root-hairs and hyphae in adhesion of sand particles. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2520-2526.
- Morgan, J. A. W., Bending G. D., White P. J. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56:1729-1739.
- Müller, M., Schmidt W. 2004. Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1409-1419.
- Näsholm, T., Kielland K., Ganeteg U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist* 182: 31-48.
- Naudin, C., Corre-Hellou G., Pineau S., Crozat Y., Jeuffroy M.H. 2010. The effect of various dynamics of N availability on winter pea-wheat intercrops: Crop growth, N partitioning and symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Field Crops Research* 119:2-11.
- Neumann, G., Römheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211:121-130.
- Neumann, G., Massonneau A., Martinoia E., Romheld V. 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208:373-382.
- Neumann, G., Martinoia E. 2002. Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* 7:162-167.
- Novoplansky, A. 2009. Picking battles wisely: plant behaviour under competition. *Plant Cell and Environment* 32:726-741.
- Nye, P. H. 1966. The effect of the nutrient intensity and buffering power of a soil, and the absorbing power, size and root hairs of a root, on nutrient absorption by diffusion. *Plant and Soil* 24:81-105.
- Nye, P. H. 1983. The diffusion of 2 interacting solutes in soil. *Journal of Soil Science* 34:677-691.
- Oburger, E., Jones D. L., Wenzel W. W. 2011. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant and Soil* 341:363-382.
- Ong, C. K., Leakey R. R. B. 1999. Why tree-crop interactions in agroforestry appear at odds with tree-grass interactions in tropical savannahs. *Agroforestry Systems* 45:109-129.
- Pearse, S.J., Veneklaas E.J., Cawthray G., Bolland M.D.A., Lambers H. 2006. *Triticum aestivum* shows a greater biomass response to a supply of aluminium phosphate than *Lupinus albus* despite releasing fewer carboxylates into the rhizosphere. *New Phytologist* 169:515-524.
- Peek, C. S., Robson A. D., Kuo J. 2003. The formation, morphology and anatomy of cluster root of *Lupinus albus* L. as dependent on soil type and phosphorus supply. *Plant and Soil* 248:237-246.
- Péret, B., Clement M., Nussaume L., Desnos T. 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* 16:442-450.



- Pregitzer, K. S., Zak D. R., Curtis P. S., Kubiske M. E., Teeri J. A., Vogel C. S. 1995. Atmospheric CO<sub>2</sub>, soil-nitrogen and turnover of fine roots. *New Phytologist* 129:579-585.
- Provorov, N. A., Tikhonovich I. A. 2003. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:89-99.
- Purnell, H.M. 1960 Studies of the family *Proteaceae*. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. *Australian Journal of Botany* 8:38 – 50.
- Quiquampoix, H., Burns R.G. 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* 3:401-406.
- Raynaud, X., Leadley P.W. 2004. Soil characteristics play a key role in modeling nutrient competition in plant communities. *Ecology* 85:2200-2214.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P.W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. *The American Naturalist* 171:44-59.
- Raynaud, X. 2010. Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model. *Soil Biology and Biochemistry* 42:210-219.
- Read, D. B., Bengough A. G., Gregory P. J., Crawford J. W., Robinson D., Scrimgeour C. M., Young I. M., Zhang K., Zhang X. 2003. Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytologist* 157:315-326.
- Reed, S. C., Seastedt T. R., Mann C. M., Suding K. N., Townsend A. R., Cherwin K. L. 2007. Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentrations in a restored prairie. *Applied Soil Ecology* 36:238-242.
- Remans, T., Nacry P., Pervent M., Filleur S., Diatloff E., Mounier E., Tillard P., Forde B. G., Gojon A. 2006a. The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:19206-19211.
- Remans, T., Nacry P., Pervent M., Girin T., Tillard P., Lepetit M., Gojon A. 2006b. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140:909-921.
- Remy, E., Cabrito T. R., Batista R. A., Teixeira M. C., Sa-Correia I., Duque P. 2012. The Pht1;9 and Pht1;8 transporters mediate inorganic phosphate acquisition by the *Arabidopsis thaliana* root during phosphorus starvation. *New Phytologist* 195:356-371.
- Rengel, Z. 2002a. Genetic control of root exudation. *Plant and Soil* 245:59-70.
- Rengel, Z. 2002b. Breeding for better symbiosis. *Plant and Soil* 245:147–162.
- Rengel, Z., Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168:305-312.
- Rentsch, D., Schmidt S., Tegeder M. 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *Febs Letters* 581: 2281-2289.
- Revsbech, N. P., Pedersen O., Reichardt W., Briones A. 1999. Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* 29:379-385.
- Richardson, A. E., Hadobas P. A., Hayes J. E. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant Journal* 25:641-649.
- Richardson, A.E., Barea J.M., McNeill A.M., Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of

- phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305–339.
- Richardson, A. E., Simpson R. J. 2011. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability. *Plant Physiology* 156:3989-3996.
- Richardson, A.E., Lynch J.P., Ryan P.R., Delhaize E., Smith F.A., Smith S.E., Harvey P.R., Ryan M.H., Veneklaas E.J., Lambers H., Astrid Oberson A., Culvenor R.A., Simpson R.J. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and soil* 349:121-156.
- Riley, D., Barber S.A. 1971. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes at the root–soil interface. *Soil Science Society of American Proceeding* 35:301–306.
- Robin, A., Vansuyt G., Hinsinger P., Meyer J. M., Briat J. F., Lemanceau P. 2008. Iron dynamics in the rhizosphere consequences for plant health and nutrition. *Advances in Agronomy* 99:183-225.
- Robinson, D. 1994. The response of plants to nonuniform supplies of nutrients. *New Phytologist* 127:635-674.
- Robinson, D., Hodge A., Griffiths B.S., Fitter AH. 1999. Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *Proceeding of the Royal Society of London B* 266: 431-435.
- Robinson, D. 2001. Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants in patchy soil. *Plant and Soil* 232:41–50.
- Rubio, G., Walk T., Ge Z. Y., Yan X. L., Liao H., Lynch J. P. 2001. Root gravitropism and below-ground competition among neighbouring plants: A modelling approach. *Annals of Botany* 88:929-940.
- Ryan, P. R., Delhaize E., Jones D. L. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:527-560.
- Ryser, P. 1996. The importance of tissue density for growth and life span of leaves and roots: A comparison of five ecologically contrasting grasses. *Functional Ecology* 10:717-723.
- Ryser, P. 2006. The mysterious root length. *Plant and Soil* 286:1-6.
- Sanon, A., Andrianjaka Z. N., Srin, Y., Bally R., Thioulouse, J., Comte G., Duponnois R. 2009. Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. *Plant and Soil* 321:259-278.
- Schenk, H.J., Jackson R.B., 2002. The global biogeography of roots. *Ecological Monographs* 72:311-328.
- Schenk, H.J. 2006. Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology* 94:725–739.
- Schmid, I., Kazda M. 2002. Root distribution of Norway spruce in monospecific and mixed stand on different soils. *Forest Ecology and Management* 159:37-47.
- Schmidt, W. 2003. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in Plant Science* 8: 188-193.
- Schnepf, A., Roose T., Schweiger P. 2008. Impact of growth and uptake patterns of arbuscular mycorrhizal fungi on plant phosphorus uptake - a modelling study. *Plant and Soil* 312:85-99.
- Semchenko, M., John, E.A., Hutchings, M.J., 2007. Effects of physical connection and genetic identity of neighbouring ramets on root-placement patterns in two clonal species. *New Phytologist* 176:644-654.

- Skene, K. R. 1998. Cluster roots: some ecological considerations. *Journal of Ecology* 86:1160-1164.
- Smalla, K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4742-4751.
- Smith, V. H. 1992. Effects of nitrogen-phosphorus supply ratios on nitrogen-fixation in agricultural and pastoral ecosystems. *Biogeochemistry* 18:19-35.
- Smith, F. W., S. R. Mudge, A. L. Rae, and D. Glassop. 2003. Phosphate transport in plants. *Plant and Soil* 248:71-83.
- Svistoonoff, S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L., Blanchet A., Nussaume L., Desnos T. 2007. Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* 39:792-796.
- Sylvia, D. M., Neal L. H. 1990. Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. *New Phytologist* 115:303-310.
- Tang, C., Barton L., Rapheal C. 1997. Pasture legume species differ in their capacity to acidify a low-buffer soil. *Australian Journal of Agriculture Research* 49:53-58.
- Tang, C., Unkovich M.J., Bowden J.W. 1999. Factors affecting soil acidification under legumes. III. Acid production by N<sub>2</sub>-fixing legumes as influenced by nitrate supply. *New Phytologist* 143:513-521.
- Tang, C., Drevon J. J., Jaillard B., Souche G., Hinsinger P. 2004. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant and Soil* 260:59-68.
- Tilman, D. 1988. *Plant strategies and the dynamics and structure of plant communities*. Princeton University Press, Princeton, NJ. 376pp
- Tilman, D., Reich P. B., Knops J. 2007. Ecology - Diversity and stability in plant communities - Reply. *Nature* 446:E7-E8.
- Tinker, B.T., Nye P.H. 2000. *Solute Movement in the Rhizosphere*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Treseder, K. K., Allen M. F. 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. *New Phytologist* 155:507-515.
- Treseder, K. K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO<sub>2</sub> in field studies. *New Phytologist* 164: 347-355.
- Venterink, H.O. 2011. Legumes have a higher root phosphatase activity than other forbs, particularly under low inorganic P and N supply. *Plant and Soil* 347:137-146.
- Vitousek, P. M., Cassman K., Cleveland C., Crews T., Field C. B., Grimm N. B., Howarth R. W., Marino R., Martinelli L., Rastetter E. B., Sprent J. I. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57:1-45.
- Violle, C., Garnier E., Leconteur J., Roumet C., Pothier C., Blanchard A., Navas M. L. 2009. Competition, traits and resource depletion in plant communities. *Oecologia* 160:747-755.
- Voisin, A. S., Salon C., Munier-Jolain N. G., Ney B. 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 243:31-42.
- von Felten S., Schmid B. 2008. Complementarity among species in horizontal versus vertical rooting space. *Journal of Plant Ecology* 1:33-41.
- von Felten, S., Hector A., Buchmann N., Niklaus P. A., Schmid B., Scherer-Lorenzen M. 2009.

- Belowground nitrogen partitioning in experimental grassland plant communities of varying species richness. *Ecology* 90:1389-1399.
- Walch-Liu, P., Ivanov, I., Filleur S., Gan Y. B., Remans T., Forde B. G. 2006. Nitrogen regulation of root branching. *Annals of Botany* 97:875-881.
- Walker, T. S., Bais H. P., Grotewold E., Vivanco J. M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132: 144-151.
- Wang, B. Qiu Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299-363.
- Wang, X., Tang C., Guppy C. N., Sale P. W. G. 2008. Phosphorus acquisition characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) under P deficient conditions. *Plant and Soil* 312:117-128.
- Watt, M., McCully M. E., Jeffree C. E. 1993. Plant and bacterial mucilages of the maize rhizosphere - comparison of their soil binding-properties and istochemistry in a model system. *Plant and Soil* 151:151-165.
- Watt, M., Evans J.R. 1999. Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* 121:317-323.
- Whalley, W. R., Riseley B., Leeds-Harrison P. B., Bird N. R. A., Leech P. K., Adderley W. P. 2005. Structural differences between bulk and rhizosphere soil. *European Journal of Soil Science* 56:353-360.
- Williamson, L. C., Ribrioux S., Fitter A. H., Leyser H. M. O. 2001. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 875-882.
- Wilson, J. B. 1988. A review of evidence on the control of shoot-root ratio, in relation to models. *Annals of Botany* 61:433-449.
- Wilson, G. W. T., Hartnett D. C., Rice C. W. 2006. Mycorrhizal-mediated phosphorus transfer between tallgrass prairie plants *Sorghastrum nutans* and *Artemisia ludoviciana*. *Functional Ecology* 20: 427-435.
- Wouterlood, M., Cawthray G. R., Scanlon T. T., Lambers H., Veneklaas E. J. 2004. Carboxylate concentrations in the rhizosphere of lateral roots of chickpea (*Cicer arietinum*) increase during plant development, but are not correlated with phosphorus status of soil or plants. *New Phytologist* 162:745-753.
- Xiao, Y. B., Li L., Zhang F. S. 2004. Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and fababean using direct and indirect N-15 techniques. *Plant and Soil* 262:45-54.
- Yadav, R. S., Tarafdar J. C. 2001. Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils* 34:140-143.
- Yao, Q., Li X. L., Ai W. D., Christie P. 2003. Bi-directional transfer of phosphorus between red clover and perennial ryegrass via arbuscular mycorrhizal hyphal links. *European Journal of Soil Biology* 39:47-54.
- Young, I. M. 1995. Variation in moisture contents between bulk soil and the rhizosheath of wheat (*Triticum aestivum* L. c.v Wembley). *New Phytologist* 130: 135-139.
- Yun, S. J., Kaeppler S. M. 2001. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant and Soil* 237:109-115.
- Zhang, F. S., Ma J., Cao Y. P. 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant and Soil* 196:196261-196264

- Zhang, F., Zhang S., Zhang J., Zhang R., Li, F. 2004. Nitrogen fertilization on uptake of soil inorganic phosphorus fractions in the wheat root zone. *Soil Science Society of America Journal* 68: 1890-1895.
- Zuo, Y. M., Zhang F. S., Li X. L., Cao Y. P. 2000. Studies on the improvement in iron nutrition of peanut by intercropping with maize on a calcareous soil. *Plant and Soil* 220: 13-25.
- Zuo, Y., Zhang F. 2008. Effect of peanut mixed cropping with gramineous species on micronutrient concentrations and iron chlorosis of peanut plants grown in a calcareous soil. *Plant and Soil* 306: 23-36.

## CHAPITRE II

### Objectifs et stratégie de recherche

#### I. Objectifs de recherche

Les connaissances présentées précédemment sur l'acquisition du phosphore (P) ont essentiellement été obtenues à l'échelle de plantes isolées ou en peuplements monospécifiques. Bien que des preuves expérimentales aient mis en évidence le potentiel des cultures associées céréale-légumineuse pour améliorer l'acquisition de P, la connaissance des mécanismes rhizosphériques sous-jacents reste encore très parcellaire. Il a ainsi été proposé que l'amélioration de l'acquisition du P en association soit liée (i) à une diminution des interactions de type compétition par une complémentarité de l'acquisition dans le temps, dans l'espace ou dans les formes chimiques de P, diminuant ainsi la compétition et/ou (ii) l'occurrence d'interactions de type facilitation, consistant en l'augmentation de la disponibilité en P dans la rhizosphère d'une espèce profitant *in fine* aussi à l'espèce associée.

Il a été suggéré que les augmentations de disponibilité de P dans le cas de l'association d'espèces soit le résultat d'une modification des propriétés physico-chimiques de la rhizosphère induite par l'activité racinaire essentiellement *via* l'exsudation de composés mobilisateurs de P par l'espèce dite « facilitatrice » et/ou la stimulation de microorganismes du sol. Parmi les composés exsudés par les racines et susceptibles de modifier la disponibilité de P, l'implication de l'exsudation de protons ( $H^+$ ) et d'hydroxyles ( $OH^-$ ) a très peu été suivie. L'exsudation de ces composés par les racines, facteur déterminant le pH de la rhizosphère, est considérée comme étant essentiellement le résultat du maintien de l'équilibre cation-anion et, de ce fait, comme étant largement gouvernée par les formes d'azote (N) prélevées. Bien qu'il ait été proposé pour des sols neutres à alcalins que l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse en lien avec son activité fixatrice de  $N_2$  soit impliquée dans l'amélioration du prélèvement en P de la céréale associée, très peu d'études ont été publiées à ce sujet.

De plus, des travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence qu'en plus de l'acidification, une alcalinisation de la rhizosphère associée à d'autres processus rhizosphériques permettait également d'augmenter la disponibilité de P dans le sol. Les interactions pour l'acquisition de P entre céréale et légumineuse impliquant le pH dépendraient ainsi des modifications de pH induites par chacune des espèces, la facilitation pouvant survenir à la fois suite à une diminution (pour la légumineuse) ou une augmentation (pour la céréale) du pH rhizosphérique. Autrement dit cela suggère que la facilitation n'opérerait pas à sens unique, de la légumineuse vers la céréale, comme proposé implicitement dans de nombreuses études.

L'objectif majeur de ce travail de thèse a ainsi été d'évaluer l'influence des interactions rhizosphériques entre plantes associées sur l'acquisition de P, dans le cas de l'association céréale-légumineuse. Plus précisément cette thèse a consisté en l'évaluation de l'effet des interactions sur la disponibilité de P dans la rhizosphère des espèces associées et, *in fine*, sur le partage de la ressource en P du sol. L'hypothèse centrale de ce travail a été que les modifications de pH induites par les racines agissent comme un mécanisme de facilitation déterminant pour l'acquisition de P par les espèces associées. Cet objectif général a été décliné selon plusieurs étapes pour lesquels différents paramètres pouvant influencer les interactions ont été testés (Fig. 2.1) :

(i) il a ainsi été question dans un premier temps de tester l'hypothèse de facilitation de l'acquisition de P en lien avec l'acidification de la rhizosphère de la légumineuse. De plus, comme proposé en écologie par le « stress gradient hypothesis » et observé dans le cas de la disponibilité en N pour les associations céréale-légumineuse, les interactions positives seraient d'autant plus importantes/intenses que les conditions de l'environnement seraient contraignantes. Les interactions pour le P entre la céréale et la légumineuse ont ainsi été testées pour différents niveaux de contraintes en termes de disponibilité en P du sol.

(ii) dans la mesure où il était attendu qu'une diminution de pH tout autant qu'une augmentation de pH par les racines puisse influencer positivement la disponibilité en P, l'influence de la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> et celle de la disponibilité de N inorganique du sol sous forme de nitrate sur les interactions pour le P ont été testées.

(iii) de telles interactions pour le P impliquent la diffusion de solutés entre les racines des deux espèces associées et un certain degré de recouvrement de leurs rhizosphères respectives. Bien que les protons/hydroxydes puissent diffuser sur plusieurs millimètres, les ions phosphates sont en revanche très peu mobiles. Les effets de la distance entre les racines des deux espèces associées et du degré de recouvrement de leurs rhizosphères sur les interactions, en lien avec les modifications de pH et de disponibilité de P du sol, ont ainsi été testés.

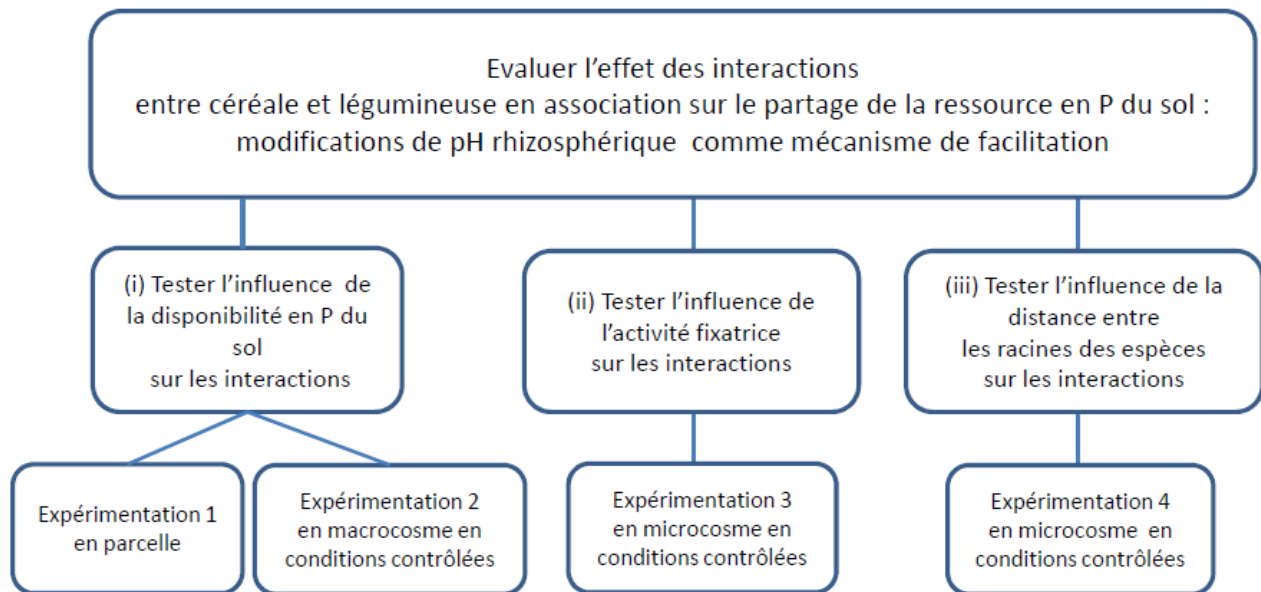


Figure 2.1 : Objectifs et stratégie de recherche

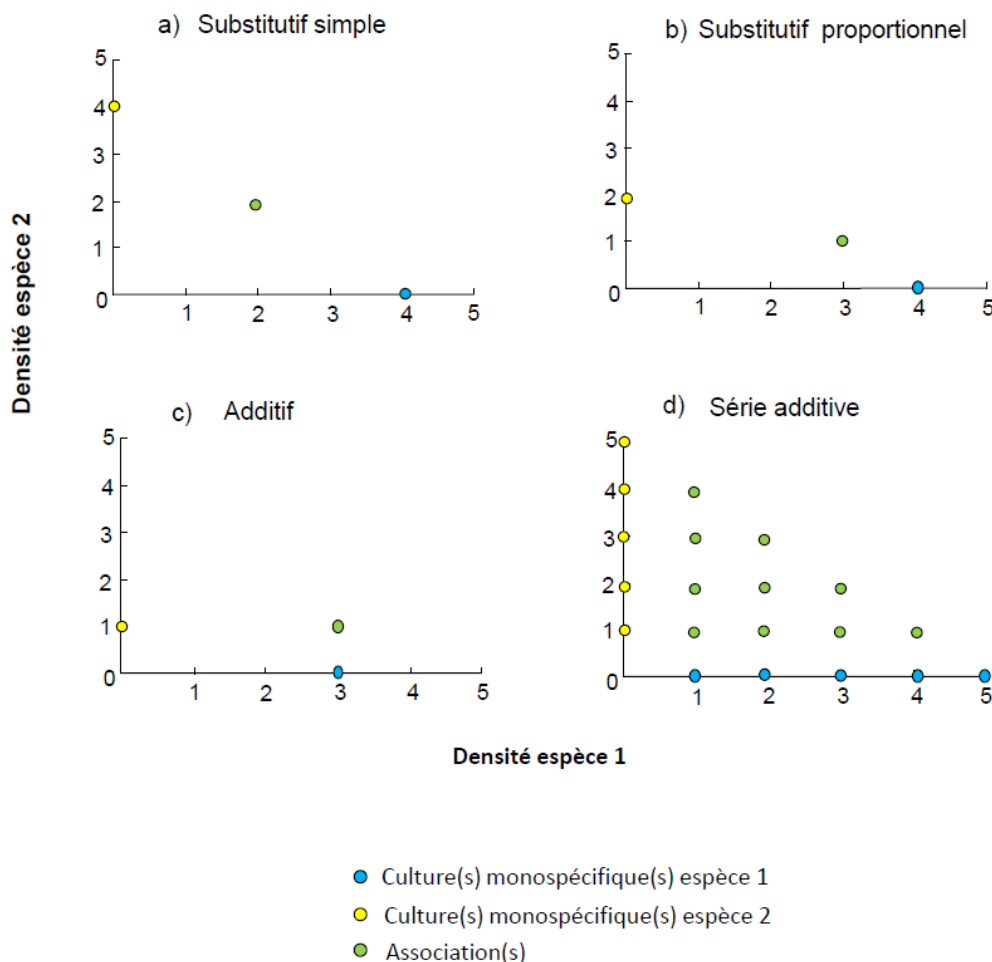
## II. Stratégie de recherche

Les paragraphes suivants décrivent la stratégie globale qui a été employée pour répondre à nos questions de recherche. Ces informations permettent d'explicitier la démarche globale choisie et viennent en complément des sections « matériel et méthodes » indiquées dans chaque chapitre relatif aux différentes expérimentations.

### II.1. Analyse des interactions entre espèces/choix des ratios de densité

L'évaluation du fonctionnement des agroécosystèmes plurispécifiques comme, dans notre cas, les cultures associées céréale-légumineuse consiste en la comparaison de leurs performances à celles des cultures monospécifiques des espèces correspondantes. Les interactions entre espèces (*i.e.* interactions interspécifiques) sont ainsi évaluées en référence aux interactions entre individus d'une même espèce (*i.e.* interactions intraspécifiques). Différents designs expérimentaux ont été définis afin de répondre à des objectifs variant de l'optimisation de la productivité des cultures associées à l'analyse des interactions et de leurs mécanismes. Il est ainsi possible de citer trois grands types de designs expérimentaux, chacun présentant des variations : (i) les designs de type substitutif (« substitutive design » ou « replacement design »), (ii) les designs de type additif (« additive design ») et (iii) ceux de type « série additive »





**Figure 2.2 :** Designs d'association d'espèce. Exemple de design substitutif simple (a), design substitutif (b), design additif (c), série additive (d).

### II.1.1. Les designs de type substitutif

Le design substitutif « simple/strict » est couramment utilisé en écologie pour déterminer les mécanismes d'interaction entre plantes. Il consiste à conserver une densité totale constante entre la culture associée et les cultures monospécifiques correspondantes. En association, la densité de chaque espèce correspond à une proportion de celle en culture monospécifique dont la somme est égale à 1. Ainsi dans le cas d'une culture associée comprenant 2 espèces, la figure 2.2a représente le cas où la densité de chacune, en association, correspond à la moitié de celle en culture monospécifique.

Le design substitutif « proportionnel » est plus adapté aux questionnements en agronomie. Comme précédemment les densités des espèces en association correspondent à une proportion de celles en culture monospécifique et leur somme est égale à 1. Les densités totales peuvent cependant différer entre chaque culture monospécifique. Celles des cultures monospécifiques correspondent généralement aux densités permettant d'optimiser les performances dans ces conditions. Dans le cas d'association de deux espèces,

leur densité respective en association correspond souvent à la moitié de celle en culture monospécifique (Fig.2.2b).

### II.1.2. Les dispositifs de type additif

En association, la densité de chaque espèce est la même que celle en culture monospécifique. Le design de type « pair-wise » (Fig. 2.2c) peut être considéré comme un cas particulier du design de type additif, présentant des densités égales pour chaque espèce.

Une des difficultés associée à ces différents designs expérimentaux est de distinguer l'effet de la densité totale de chaque espèce de celui relatif à la proportion de chacune sur les interactions (Gibson et al. 1999 ; Jolliffe, 2000). Il a ainsi été proposé des designs expérimentaux plus complexes, souvent lourds à mettre en place, correspondant aux « séries additives ». Elles consistent en la mise en place d'associations suivant le design « substitutif » pour différentes proportions de chacune des espèces (Fig. 2.2d).

A l'heure actuelle il n'existe pas de réel consensus quant au choix d'un design, chacun présentant des avantages et des limites suivant les questions abordées et les objectifs scientifiques (voir les synthèses de Gibson et al., 1999 ; Jolliffe, 2000 ; Connolly et al., 2001). Le choix final dépend des objectifs fixés et des contraintes expérimentales. Dans notre cas, les dispositifs choisis ont été de type substitutif, mais adaptés suivant nos différents sous-objectifs.

Le design expérimental appliqué dans le cas de l'expérimentation en parcelles au champ correspondait ainsi au type substitutif proportionnel. L'objectif majeur était d'évaluer le partage des ressources en P du sol entre les espèces en association en conditions « réelles » au champ. Les densités des cultures monospécifiques correspondaient à celles évaluées comme optimales pour la productivité de chaque espèce. En association la densité de chaque espèce représentait la moitié de celles en culture monospécifique (ratio 50:50 par rapport aux cultures monospécifiques).

Dans le cas de l'expérimentation en macrocosme (*i.e.* pot) en conditions contrôlées (*i.e.* serre), nous avons choisi un design substitutif simple. L'objectif était alors en effet de déterminer les mécanismes impliqués dans le partage des ressources en P entre les espèces. La même densité suivant les types de culture (association vs cultures monospécifiques) a été choisie dans le but d'attribuer au départ la même quantité de ressource du sol (nutriments, eau) à chaque plante. Les densités totales et les proportions de chaque espèce en association ont été cependant déterminées pour rester au plus proche des pratiques de terrain. Compte tenu des écarts importants de densité entre céréale et légumineuses à graines pratiqués par les agriculteurs, notre choix s'est porté sur une valeur réaliste pour la céréale, mais plus forte que la valeur d'usage pour la légumineuse.

Dans le cas de l'expérimentation en minirhizobox relative à l'évaluation de l'effet de la fixation symbiotique sur les interactions pour l'acquisition de P du sol, le design retenu correspondait au type substitutif proportionnel si l'on considère le nombre de plantes. Une nuance doit être ici introduite quant au choix du design. Il a été ici choisi de maintenir non

pas un nombre de plantes constant mais une surface de racines équivalente entre les deux espèces.

Dans le cas des minirhizobox mises en place pour évaluer l'effet de la distance entre les racines sur les interactions entre espèces pour l'acquisition de P, le design expérimental choisi était cette fois-ci de type substitutif simple. Ce choix a été imposé par le dispositif dont la faible surface de sol en contact avec la surface racinaire a restreint le nombre de plantes susceptibles d'être utilisées.

## II.2. Choix des dispositifs de culture et échantillonnage de la rhizosphère

### II.2.1. Choix des dispositifs de culture

Le choix des différents dispositifs de culture a été adapté aux questionnements de recherche. La première étape dite « exploratoire » a eu pour but d'évaluer les interactions pour le P du sol entre espèces associées, et a été suivie d'une seconde étape dite d'« approfondissement » visant à préciser les mécanismes rhizosphériques impliqués, ainsi que les déterminants du partage du P. Les dispositifs, ont correspondu successivement à des expérimentations en parcelle et en macrocosme puis en microcosme en conditions contrôlées. La pertinence du choix des dispositifs de culture a été évaluée en tenant compte de leurs avantages ainsi que leurs limites (Tableau 2.1).

**Tableau 2.1** : Avantages et limites des dispositifs de cultures

	Dispositif	Avantages	Limites
1 <sup>ère</sup> étape	Parcelle expérimentale	Conditions réelles	Nombreux facteurs environnementaux non contrôlés (biotiques et abiotiques) → interprétation des interactions difficile
	Macrocosme en conditions contrôlées (i.e. pots en serre)	Isolement de facteurs environnementaux	Méthodes d'échantillonnage de la rhizosphère et faibles quantité de sol → interprétation des mécanismes rhizosphériques limitée
2 <sup>ème</sup> étape	Microcosmes en conditions contrôlées (i.e. « minirhizobox » en chambre de culture/serre)	Isolement de facteurs environnementaux Echantillonnage de la rhizosphère facilité	Appréciation des variations des paramètres plante limitée en particulier pour le prélèvement en nutriments (détermination imprécise)

### II.2.2. Échantillonnage de la rhizosphère

L'objectif principal était d'étudier les interactions entre plantes pour l'acquisition de P et l'effet de l'association d'espèces. Plus précisément, il s'est agi d'évaluer les variations de

disponibilité dans la rhizosphère des plantes ainsi que le partage de la ressource en P du sol. Il s'est donc avéré pertinent d'étudier la rhizosphère de chacune des espèces séparément. Ce choix a impliqué le développement de méthodologies adaptées aux dispositifs employés, ainsi qu'aux conditions de prélèvement. L'échantillonnage comprend (i) la séparation des espèces, (ii) puis la récupération de leur rhizosphère. Afin d'évaluer l'effet de l'activité des racines sur la disponibilité en P et les variations de pH induites par les racines dans la rhizosphère, il a été nécessaire d'échantillonner du sol témoin sans plante (*i.e.* sol non rhizosphérique ou « bulk soil »). Il a tout d'abord fallu définir opérationnellement la rhizosphère qui correspond au volume de sol entourant les racines vivantes qui est affecté par l'activité de ces dernières (Darrah, 1993 ; Hinsinger, 1998). Nous avons ainsi choisi de définir l'étendue de cette zone à environ 1 mm de la surface des racines en référence à la zone d'appauvrissement couramment admise pour P (Hinsinger, 2001).

Dans le cas de l'expérimentation en parcelle et de celle en pots, la séparation des racines des espèces a été faite selon des critères morphologiques, évalués visuellement. Lors de l'expérimentation en parcelle au champ, l'humidité du sol n'a pu être contrôlée afin de faciliter l'échantillonnage. Ainsi, la texture du sol associée à son humidité élevée au moment de l'échantillonnage sur le terrain a contraint de récupérer le sol par lavage des racines à l'eau déminéralisée puis séchage du surnageant à l'étuve (*i.e.* sol + eau). Afin de limiter le risque de modification des propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol par humidification puis séchage, une méthode alternative a pu être développée dans le cas de l'expérimentation en pots. Ce dispositif nous a en effet permis de contrôler l'humidité du sol avant la récolte afin d'obtenir des conditions plus favorables à la récolte du sol rhizosphérique, réalisée dans ce cas par brossage doux du sol adhérent aux racines (*i.e.* agrégats < 2-3 mm de diamètre correspondant à une distance à la surface de la racine de 1 à 1.5 mm) à l'aide d'un pinceau. Une limite de cette méthode est la faible quantité de sol récupérée par plante (500 mg pour le minimum), contraignant par la suite les types d'analyses réalisables et leur nombre. La suite des expérimentations a donc été effectuée avec des dispositifs de type « minirhizobox ». Le principe de ce dispositif est de faciliter la récolte du sol qui est maintenu séparé des racines par une toile en polyamide à fine maille laissant exclusivement passer l'eau, les solutés, les poils racinaires et éventuels hyphes de champignons mycorhiziens, mais pas les racines, même les plus fines. Li et al., (2008) ont appliqué ce type de dispositif à l'étude de la dynamique du P dans la rhizosphère de cultures en association. Dans ce cas, une couche centrale de sol de 1 mm d'épaisseur représentait une rhizosphère commune qui dans le traitement relatif à l'association séparait les racines des espèces placées de part et d'autre. Afin d'étudier séparément la rhizosphère de chaque espèce, nous avons adapté ce modèle de « minirhizobox », dans un cas (i) en séparant la couche centrale en deux sous couches de 1 mm (voir Chapitre IV Fig.4.1), et dans l'autre cas (ii) en échantillonnant à la récolte le sol par couche successives de 1mm d'épaisseur pour différents scénarios fixant la distance entre les racines des deux espèces, *i.e.* l'épaisseur totale de la couche de sol entre les deux espèces (voir Chapitre V Fig.5.1).

### II.3. Choix des espèces et cultivars

L'étude des interactions entre espèces a été réalisée dans le cas de l'association d'une céréale et de différentes légumineuses. La céréale retenue, le blé dur (*Triticum turgidum durum* L.) a été associée à différentes légumineuses : le pois protéagineux (*Pisum sativum* L.), la féverole (*Vicia faba* L) et le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). L'expérimentation en parcelle au champ constitue un cas particulier de mon projet de recherche : les données présentées dans ce manuscrit sont relatives à des mesures sur la rhizosphère effectuées dans le cadre d'une expérimentation agronomique menée par l'équipe de recherche de l'UMR AGIR Auzeville-Toulouse s'intéressant à l'évaluation des performances agronomiques de différentes associations céréale-légumineuse. Dans ce cadre, le choix des espèces et cultivars n'a pas été de notre ressort. L'essentiel des travaux ayant été menés dans le cadre de cette thèse sont relatifs à l'association du blé dur au pois chiche.

#### II.3.1. Choix du blé dur

Le choix du blé dur a été motivé par des critères socio-économiques. La culture du blé dur nécessite des apports en fertilisants importants en particulier d'azote afin d'atteindre les seuils de teneurs en protéines des grains (13 à 14%) nécessaires à leur valorisation essentiellement sous forme de pâtes alimentaires. La culture de blé dur reste toutefois minoritaire à l'échelle française avec 5.5 % de la surface totale en céréales contre 53% en blé tendre en 2010 et reste très minoritaire en agriculture biologique avec 2.7% (Agence Bio, 2011). Le Languedoc Roussillon est une région traditionnelle de production de blé dur qui représente la majorité des surfaces cultivées en céréales et place la région au 3<sup>ième</sup> rang français (AGRESTE, 2012). Ainsi, dans un contexte de transition vers des systèmes de culture à bas niveau d'intrants le choix a été arrêté sur le blé dur dans le but d'évaluer le potentiel de l'association avec des légumineuses comme pratique alternative à l'apport massif de fertilisants.

#### II.3.2. Choix des cultivars de blé dur

L'expérimentation en parcelle au champ a concerné deux cultivars de blé dur chacun spécifiquement associé à une légumineuse, le pois protéagineux et la féverole. Dans cette expérimentation, un cultivar de blé dur différent a été choisi pour chaque légumineuse sur la base des traits fonctionnels relatifs aux parties aériennes de ces espèces. L'objectif a été d'associer des espèces aux caractéristiques contrastées, dans le but d'optimiser l'acquisition de l'énergie lumineuse (*i.e.* « complémentarité pour la lumière). Dans ce contexte, les cultivars Acalou et LA1823 ont ainsi été retenus. Les expérimentations suivantes formant le cœur du questionnement de recherche visant à approfondir la compréhension des interactions rhizosphériques impliquée dans le partage du P du sol ont été réalisées avec un même cultivar de blé dur et une même espèce de légumineuse. Le cultivar de blé dur LA1823, précédemment utilisé dans le cadre de l'expérimentation en parcelle au champ a été retenu pour son efficience d'utilisation du N et du P et sa productivité à bas niveau

d'intrants (Dominique Desclaux, communication personnelle). Il est le résultat d'une sélection participative en agriculture biologique, où il est courant de conduire les céréales en l'absence d'intrants fertilisants.

### II.3.3. Choix des espèces de légumineuse

Le choix des espèces de légumineuses relatives à l'expérimentation en parcelle au champ a été motivé par des critères socio-économiques. Le pois protéagineux et la féverole sont les principaux protéagineux cultivés en France avec 61% de la surface occupée par le pois protéagineux. Par la suite, le choix du pois chiche comme espèce modèle a essentiellement été motivé par des raisons scientifiques en lien avec les hypothèses que j'avais formulées dans le cadre de ma thèse.

### II.3.4. Choix du pois chiche et des cultivars

L'objectif central de mon travail de thèse était d'analyser les interactions pour le P dans le cas de l'association d'une céréale à une légumineuse. L'hypothèse principale était que les modifications de pH induites par les racines jouaient un rôle déterminant dans le partage de la ressource en P entre les espèces associées, notamment *via* des mécanismes de facilitation liés à l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse. Le pois chiche a donc été retenu en raison de sa capacité à prélever une grande partie de son azote de l'air N<sub>2</sub> (*i.e.* fraction d'azote fixée) et par conséquent sa capacité à modifier le pH de sa rhizosphère par l'exsudation de H<sup>+</sup> (Tang, 1997 ; Carranca et al ; 1999 ; Tang et al. 1999). Néanmoins les capacités d'une espèce peuvent varier suivant les cultivars. Suite à l'expérimentation en pot le premier cultivar (ILC 5566 (Elmo)) que nous avons utilisé s'était avéré peu efficace en termes d'activité fixatrice. Il a ainsi été nécessaire de revoir le choix du cultivar. Le choix, dont les critères ont été la vitesse d'apparition des nodosités ainsi que l'exsudation de protons, a été fait parmi 20 cultivars fournis par l'ICARDA. A cette occasion, le cultivar ILC 1302 a été retenu (Annexe A.1).

## II.4. Choix du sol

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur un même sol issu de l'essai de fertilisation phosphatée de longue durée de l'INRA d'Auzeville-Toulouse. L'organisation de l'essai a été décrite de manière exhaustive par Colomb et al. (2007). L'essai est constitué de 4 niveaux de fertilisation P disposés de façon aléatoire. Les 4 niveaux de fertilisation P correspondent à des apports contrastés depuis 40 ans : P0 (absence de fertilisation), P1 (fertilisation supposée compenser les exportations), P2 et P4 (fertilisation supposée représenter 2 et 4 fois (initialement, puis à partir de 1991, 3 fois) les exportations annuelles moyennes des cultures). Depuis 1991, le P a été appliqué selon les quantités suivantes: 0, 11, 22 et 33 kg P ha<sup>-1</sup> an<sup>-1</sup> pour P0, P1, P2 and P4, respectivement. L'essai est malheureusement caractérisé par un gradient de carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) perpendiculaire aux traitements P

répartissant de manière équilibrée les blocs sur la partie pauvre en  $\text{CaCO}_3$  (blocs 1 et 2) et la partie carbonatée (blocs 3 et 4) (Colomb et al., 2007).

L'expérimentation relative aux associations blé dur-pois et blé dur-féverole a été menée sur cet essai, en considérant uniquement les niveaux de fertilisation P0, P1 et P4. De précédentes expérimentations avaient en effet mis en évidence que le traitement P2 induisait des réponses des cultures proches de celle de P4. Par la suite, les expérimentations *ex situ* ont été réalisées sur le sol provenant des deux traitements les plus contrastés : P0 et P4. L'objectif étant de suivre les variations de pH, le sol a été prélevé dans la partie non carbonatée afin de limiter l'effet tampon du  $\text{CaCO}_3$  dont la dissolution consomme des ions  $\text{H}^+$ . Les propriétés physico-chimiques de ce Luvisol pour les deux traitements P (P0, P4) sont proches (texture du sol, pH,...) et avaient été étudiées de manière exhaustive par Devau et al. (2011). Les travaux de ces auteurs sur ce sol ont permis de mettre en évidence la relation entre le pH et la disponibilité de P mesurée dans des extraits à l'eau et au  $\text{CaCl}_2$ . Ces valeurs expérimentales ont par la suite été confirmées par modélisation géochimique, en prenant en compte uniquement les processus d'adsorption-désorption des ions phosphates sur les différents constituants du sol. Notre objectif principal était d'évaluer l'influence des modifications de pH induites par les racines dans les variations de disponibilité en P du sol et le partage de la ressource entre espèces associées. La réponse positive de la disponibilité en P dans ce sol à la fois à des diminutions de pH et des augmentations a motivé le choix de ce sol. Les deux traitements P présentant des valeurs de disponibilité très contrastées ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  et  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  mesurées après extraction par la méthode Olsen (Olsen et al., 1954), respectivement, pour P0 et P4), ce sol nous a paru particulièrement intéressant pour évaluer les interactions entre plantes impliquées dans l'acquisition de P en culture associée.

### II.5. Choix du stade phénologique de récolte

Dans l'hypothèse de l'acidification de la rhizosphère comme mécanisme de facilitation permettant l'amélioration de l'acquisition de P par l'association céréale-légumineuse nous avons fait le choix de récolter les plantes et le sol au moment où l'activité fixatrice est considérée comme proche du maximum avant de décliner, *i.e.* à la pleine floraison de la légumineuse (Peña-Cabriales et al., 1993 ; Kyei-Boahen et al., 2002). Ce stade phénologique marque également la fin de la période végétative durant laquelle il est admis que se fait l'essentiel de l'acquisition de P. Ce choix a pu être appliqué pour l'expérimentation en parcelle au champ, comme pour celle en pot. Le dispositif en minirhizobox étant très contraignant pour la croissance, les plantes ont été récoltées à un stade végétatif moins avancé, *i.e.* en début de floraison pour la légumineuse.

### II.6. Mesures sol et plante

Les informations développées ici représentent uniquement les méthodes et techniques employées hormis les mesures de routine (*e.g.* mesure de concentration en P dans les

extraits végétaux) ; ces informations sont fournies dans le matériel et méthode des chapitres relatifs aux différentes expérimentations.

### II.6.1. Mesure du P disponible du sol

La disponibilité du P dans un sol correspond à la quantité de P potentiellement accessible à la plante qui représente une petite fraction du P total du sol (Lanno et al., 2002 ; Harmsen et al., 2007). La stratégie usuelle de détermination de la disponibilité en P correspond à l'extraction chimique des formes de P dans le sol. De nombreuses méthodes ont été développées afin d'évaluer cette fraction de P potentiellement accessible aux plantes et d'utiliser cet indicateur en agronomie pour gérer les apports de fertilisant. Ces extractions chimiques modifient toutefois les propriétés chimiques du sol et influencent toutefois les processus biogéochimiques déterminant la disponibilité en P. Leur effet est ainsi influencé par les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. La pertinence des différentes extractions chimiques est évaluée en mettant en relation la concentration en P mesurée dans les extraits au contenu en P des plantes ou à la production de biomasse (*i.e.* rendement). Certaines extractions chimiques sont ainsi adaptées à des gammes de sol plus ou moins larges (Delgado et Torrent, 1997 ; Tang et al. 2009 ; Delgado et al., 2010). Parmi les différentes méthodes, nous avons fait le choix d'extractions selon la méthode Olsen (Olsen et al., 1954) et d'extractions à l'eau.

La méthode d'extraction Olsen est largement utilisée pour des sols non acides (Olsen et al., 1954 ; Sims, 2000) et s'est avérée adaptée à certains sols acides (Fixen et Grove, 1990 ; Horta et Torrent, 2007). Les extractions à l'eau ont été proposées pour permettre l'évaluation de la disponibilité en P sur une large gamme de sols (Van der Paauw, 1971 ; Sonneveld et al., 1990 ; Morel et al., 2000 ; Masson et al., 2001 ; Mc Dowell et Sharpley, 2001). De plus, les références sur la disponibilité en P du sol sur lequel les expérimentations ont été menées étaient essentiellement relatives à des extractions à l'eau (voir les travaux antérieurs de Devau et collaborateurs).

### II.6.2. Mesure des variations de pH

Parmi les différentes méthodes de mesure de pH du sol nous avons retenu celle standardisée par une norme ISO (NF ISO 10390) consistant en la mesure à l'aide de pH-mètre associée à une électrode en verre dans des extraits à l'eau similaires à ceux utilisés pour la mesure de disponibilité en P. Cette méthode permet une mesure ponctuelle, dans notre cas à la récolte. Afin d'avoir une mesure des variations de pH au cours du temps, une méthode innovante a été appliquée dans le cas de ma dernière expérimentation en mini-rhizobox (Chapitre V). Cette dernière à consister en l'utilisation d'optodes correspondant à des senseurs optiques sensibles au pH basés sur des mesures de fluorescence. Les signaux émis sont ensuite captés par une caméra ou une fibre optique (Blossfeld et Gansert, 2007). Ces optodes se présentent sous la forme de membranes qui placées dans les dispositifs de culture tels que les mini-rhizobox permettent de fournir une mesure quantitative et non



destructive du pH au cours du temps. Par faute de temps, ces données n'ont pu être exploitées totalement, quelques premiers résultats sont présentés dans l'annexe 2.

### II.6.3. Mesure de la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>

Une hypothèse centrale était que les modifications de pH induites par les racines et, en particulier, que l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse liée à la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> contribuait au processus de facilitation. La mesure de la fixation symbiotique étant associée à de nombreuses difficultés méthodologiques, elle a uniquement été possible dans le cas de l'expérimentation en pots. Différentes méthodes sont disponibles afin d'estimer la fixation symbiotique d'azote chez les plantes, et leur usage reste encore débattu (*e.g.* activité acétylène, mesure isotopique) (Ledgard et Steele, 1992 ; Unkovitch et al. 2008). Nous avons fait le choix de la mesure par méthode isotopique au <sup>15</sup>N donnant une évaluation de la fixation symbiotique sur l'ensemble de la période de culture. Deux déclinaisons de cette méthode sont disponibles, l'enrichissement artificiel au <sup>15</sup>N du sol ou l'abondance naturelle. Souhaitant travailler dans le contexte de faibles apports d'azote, nous avons fait le choix de la méthode isotopique en abondance naturelle.

### Références bibliographiques

- Blossfeld, S., Gansert D. 2007. A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH dynamics in the rhizosphere of plants. *Plant Cell and Environment* 30:176-186.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J. M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Connolly, J., Goma H. C., Rahim K. 2001. The information content of indicators in intercropping research. *Agriculture Ecosystems and Environment* 87: 191-207.
- Darrah, P. R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition-A quantitative approach. *Plant and Soil* 155:1-20.
- Delgado, A., Torrent J. 1997. Phosphate-rich soils in the European Union: estimating total plant available phosphorus. *European Journal of Agronomy* 6: 205-214.
- Delgado, A, Campillo C., Torrent J. 2010. Limitations of the Olsen method to assess plant-available phosphorus in reclaimed marsh soils. *Soil Use and Management* 26:133-140.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Colomb B., Gerard F. 2011. Fertilization and pH effects on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 75:2980-2996.
- Fixen, PE, Grove JH. 1990. Testing soils for phosphorus. In: Westerman RL (ed) *Soil testing and plant analysis*, 3<sup>rd</sup> edn, chap 7. Soil Science Society of America, Madison:141-180.

- Gibson, D. J., Connolly J., Hartnett D. C., Weidenhamer J. D. 1999. Designs for greenhouse studies of interactions between plants. *Journal of Ecology* 87:1-16.
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64:225-265.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Jolliffe, P. A. 2000. The replacement series. *Journal of Ecology* 88:371-385.
- Kyei-Boahen, S., Slinkard A. E., Walley F. L. 2002. Time course of N<sub>2</sub> fixation and growth of chickpea. *Biology and Fertility of Soils* 35:441-447.
- Lanno, R., Wells J., Conder J., Bradham K., Basta N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57:39-47.
- Masson, P., Morel C., Martin E., Oberson A., Friesen D. 2001. Comparison of soluble P in soil water extracts determined by ion chromatography, colorimetric, and inductively coupled plasma techniques in PPB range. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32:2241-2253.
- Mc Dowell, R. W., Sharpley A. N. 2001. Approximating phosphorus release from soils to surface runoff and subsurface drainage. *Journal of Environmental Quality* 30:508-520.
- Morel, C., P. Tunney, D. Plenet, and S. Pellerin. 2000. Transfer of phosphate ions between soil and solution: Perspectives in soil testing. *Journal of Environmental Quality* 29:50-59.
- Olsen, S.R., Cole C.V., Watanabe W.S., Dean L.A. 1954. Estimation of Available Phosphorus in Soil by Extraction with Sodium Bicarbonate. USDA Circular 939. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Peña-Cabriales , J. J., Gragedacabrera O. A., Kola V., Hardarson G. 1993. Time course of N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 152:115-121.
- Sims, J. T., Edwards A. C., Schoumans O. F., Simard R. R. 2000. Integrating soil phosphorus testing into environmentally based agricultural management practices. *Journal of Environmental Quality* 29: 60-71.
- Sonneveld, C. 1990. Estimating quantities of waer-soluble nutrients in soils using a specific 1-2 by volume extract. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21:1257-1265.
- Tang X., Ma Y., Hao X., Li X., Li J., Huang S., Yang X. 2009. Determining critical values of soil Olsen-P for maize and winter wheat from long-term experiments in China. *Plant and Soil* 323:143-151.
- Unkovich, M., Baldock J. 2008. Measurement of asymbiotic N<sub>2</sub> fixation in Australian agriculture. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2915-2921.
- van der Paauw, F. 1970. An effective water extraction method for the determination of plant-available soil phosphorus. *Plant and soil* 34:467-481.

## CHAPITRE III

**Interactions entre céréale et légumineuse en culture associée  
et acquisition de phosphore : influence de la disponibilité en P du sol**

Un nombre croissant d'études tendent à montrer l'avantage des cultures associées céréale-légumineuse pour l'acquisition de P en comparaison des cultures monospécifiques (Li et al., 2007 ; Hinsinger et al., 2011). Il a été proposé que le bénéfice de ces agroécosystèmes plurispécifiques résulte (i) de la diminution de la compétition par une différenciation de l'acquisition du phosphore, autrement désignée comme complémentarité de niche et/ou (ii) implique la mise en place de mécanismes de facilitation permettant l'augmentation de la disponibilité en P. Cette augmentation sous-entend une modification des propriétés physiques, chimiques et/ou biologiques de la rhizosphère des espèces en association, suite à leur activité racinaire. L'essentiel des études relatives aux processus rhizosphériques potentiellement impliqués dans les interactions au sein de cultures associées se sont intéressées au rôle des enzymes de type phosphatase exsudées par les racines (Li et al., 2004), des carboxylates (Li et al., 2010) ou des microorganismes du sol (Wang et al., 2007, 2012). L'implication des modifications de pH induites par les racines a, quant à elle, été peu étudiée (Cu et al., 2005 ; Li et al., 2008). Dans le cas des modifications de pH induites par les racines l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse en lien avec la fixation de N<sub>2</sub> est habituellement proposée comme mécanisme de facilitation. Cette hypothèse a été formulée dans le cas de sols neutres à alcalins pour lesquels des travaux récents ont mis en évidence qu'outre une diminution de pH, une augmentation de ce dernier pouvait également influencer positivement la disponibilité en P (Devau et al., 2009, 2010).

Ces processus rhizosphériques sont influencés par l'état nutritionnel des plantes, et certains sont déclenchés ou stimulés en réponse à de faibles valeurs de disponibilité en P du sol (Hinsinger, 2001 ; Rengel et Marschner, 2005). En écologie, le « stress gradient hypothesis » propose que la part relative de la compétition et de la facilitation soit influencée par l'environnement abiotique avec la prédominance d'interactions positives pour les conditions les plus stressantes pour la croissance des plantes (Bertness et Callaway, 1994 ; Brooker et al., 2003). Dans le cas du P cela revient à proposer la prédominance des interactions de type facilitation pour de faibles valeurs de disponibilité en P. Cela a été précédemment suggéré par Li et al. (2007) rapportant une diminution du bénéfice de l'association maïs (*Zea mays* L.)-féverole (*Vicia faba* L.) en comparaison de l'association maïs (*Zea mays* L.)-blé tendre (*Triticum aestivum* L.) avec l'apport de doses croissantes de fertilisants phosphatés.

Compte tenu de ces résultats antérieurs, les modifications de pH induites par les racines des espèces en associations seraient potentiellement impliquées dans des mécanismes de facilitation et aboutiraient *in fine* à une amélioration de l'acquisition de P par les cultures associées par rapport aux cultures monospécifiques. Ce bénéfice serait d'autant plus important pour de faibles valeurs de disponibilité en P du sol.

Les objectifs de ce chapitre sont donc les suivants :

(i) évaluer l'effet des interactions entre espèces sur la disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces en association dans le cas du blé dur associé à différentes légumineuses et le partage de la ressource en P du sol,

(ii) évaluer l'implication des processus rhizosphériques et plus particulièrement les modifications de pH induites par les racines dans les interactions pour l'acquisition de P entre les espèces en association,

(iii) évaluer l'influence de la disponibilité en P initiale du sol sur les interactions entre les espèces associées pour l'acquisition de P.

Afin de répondre à ces objectifs les interactions rhizosphériques entre le blé dur (*Triticum turgidum durum* L.) et différentes légumineuses pour des niveaux contrastés de disponibilité en P ont été abordées selon deux démarches expérimentales, au champ en parcelle d'essai agronomique et en pot en conditions contrôlées. Le premier article intitulé « Enhanced P availability in the rhizosphere of cereal-legume intercrops : evidence from a long term P fertilizer trial » se rapporte à l'expérimentation sur les parcelles d'un essai de fertilisation longue durée pour lequel des apports contrastés de fertilisants P ont été effectués pendant 40 ans (Colomb et al., 2007). Le deuxième article intitulé « Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil », concerne une expérimentation réalisée en pot sur le même sol pour les deux traitements de fertilisation extrêmes afin de permettre l'analyse plus fine des processus rhizosphériques impliqués dans les interactions pour l'acquisition du P. Le blé dur a ainsi été associé au pois (*Pisum sativum* L.) et à la féverole dans l'essai au champ (article 1), tandis qu'il a été associé au pois chiche (*Cicer arietinum* L.) dans l'essai en pot (article 2). Le deuxième article a été publié dans la revue *Soil Biology and Biochemistry*, tandis que le premier article sera soumis à la revue *Plant and Soil*.

### Références bibliographiques

- Bertness, M. D., Callaway R. 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9:191-193.
- Brooker, R.W., Maestre F.T., Callaway R.M., Lortie C.L., Cavieres L.A., Kunstler G., Liancourt P., Tielborger K., Travis J.M.J., Anthelme F., Armas C., Coll L., Corcket E., Delzon S., Forey E., Kikvidze Z., Olofsson J., Pugnaire F., Quiroz C.L., Saccone P., Schiffers K., Seifan M., Touzard B., Michalet R. 2003. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* 96:18-34.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J. M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Cu, S. T. T., Hutson J., Schuller K. A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.

- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P, Jaillard B., Gerard F. 2009. Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Applied Geochemistry* 24:2163-2174.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J., Tang, X., Zhang F. 2011a. P for two, sharing a scarce resource e soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Li, S. M., Li L., Zhang F. S., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297-303.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G, Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11192-11196.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Clairotte M., Drevon J. J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139-150.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Marschner P., Cawthray G., Rengel Z. 2010. Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil. *Biology and Fertility of Soils* 46:79-91.
- Li, S. M., Li L., Zhang F. S., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297-303.
- Rengel, Z., Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168:305-312.
- Wang, D., Marschner P., Solaiman Z., Rengel Z. 2007. Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology and Biochemistry* 39:249-256.
- Wang, Y., Marschner P., Zhang F. 2012. Phosphorus pools and other soil properties in the rhizosphere of wheat and legumes growing in three soils in monoculture or as a mixture of wheat and legume. *Plant and Soil* 354:283-298.

## I. Enhanced P availability in the rhizosphere of cereal-legume intercrops: evidence from a long term P fertilizer trial

Elodie Betencourt <sup>a, b</sup>, Fanny Cordier <sup>a, b</sup>, Eric Justes<sup>c</sup>, Philippe Hinsinger <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>b</sup> Montpellier SupAgro, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>c</sup> INRA, UMR 1248 AGIR (INRA-ENSAT), 31326 Castanet Tolosan, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 49; fax: +33 4 99 61 30 88.

E-mail address: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr (P. Hinsinger).

### Abstract

Intercropping of cereal and legume can improve the use of resources for crop growth compared to sole crops. Enhanced soil phosphorus availability by root activity of intercropped species has been proposed as a mechanism of facilitation. It has also been proposed that facilitation prevails over competition when resources are more limiting for crop growth. Crop growth, P offtake and changes in organic and inorganic phosphorus availability were investigated in the field of a long-term phosphorus fertilizer trial. Cereal and legumes were cultivated as sole crops or intercropped: one cultivar of durum wheat was intercropped with pea and another with faba bean. Phosphorus fertilization treatments consisted of three rates of supply of phosphorus fertilizer: no fertilization for the P0 treatment and increasing rates for P1 and P4 treatments. Enhanced availability of inorganic phosphorus in the rhizosphere was systematically observed, most notably for the legumes, but there was no significant effect of intercropping. Above ground parameters indicated higher competitive ability of durum wheat on legumes. Enhanced total biomass and phosphorus offtake were observed in intercrops relative to durum wheat in sole crop. No specific trend was observed for organic phosphorus. No clear influence of soil phosphorus fertilizer supply on interactions was observed either for belowground or aboveground parameters. Our results confirmed that cereal and legumes can positively interact and increase soil phosphorus availability in their rhizosphere.

Key words: Rhizosphere, intercrop, P availability, long-term fertilization

### I.1. Introduction

Phosphorus (P) is a major nutrient limiting crop growth in many soils (Raghothama, 1999; Lynch, 2007; Richardson et al., 2011). Until now, the optimization of the production of agroecosystem mainly relies on the heavy use of fertilizers. However the sustainability of such a practice is questionable (Tilman, 1999; Tilman et al., 2001; Vance, 2001). Indeed, P fertilizers derive mainly from mined phosphate rocks which are a finite resource and, as for oil, a peak of P fertilizer production is expected in a rather short time scale, *i.e.* several decades (Cordell et al. 2009; Dawson and Hilton, 2011). Massive use of P fertilizers is also recognized to have a negative impact on the quality of aquatic ecosystems through loss of soil P by erosion inducing eutrophication processes in particular for lakes (Schindler, 1974 ; Carpenter and Bennett, 2011; Mc Donald et al., 2011). Therefore, new alternatives are needed to better exploit soil resources either through the selection of efficient cultivars or strategies of management of agroecosystems to optimize P acquisition of crops (Vance et al., 2003 ; Lambers et al., 2006; Richardson et al., 2011).

Intercropping attracted renewed attention for the frequently observed benefits on crop growth and productivity compared to conventional cropping systems based on single-species stands, thereafter called sole cropping. Intercropping can be defined as the growth of two or more species simultaneously in the same field and is based on the manipulation of plant interactions and the use of functional diversity (Willey, 1979, Ofori and Stern, 1987; Hauggaard -Nielsen et Jensen 2005). Those assumptions derive from ecological concepts proposing that increasing diversity promotes resource acquisition through two major mechanisms: (i) reduction of competition *via* resource partitioning due to niche differentiation, (ii) enhanced resource availability *via* facilitation (Fridley, 2001; Loreau, 2001). Resource partitioning in the case of nutrients, thereafter called complementarity, occurs when the nutrient uptake by the intercropped species differs either in time, in space or considering the chemical form of the nutrient that is taken up (Fridley, 2001). Facilitation stands for positive interaction by which one plant species increases the growth, reproduction and/or survival of another plant species through altering its biotic/abiotic environment, ultimately resulting in increased amount of the fraction of a resource that is accessible to plants (*i.e.* resource availability) (Callaway, 1995). Such positive interaction may be enhanced with increasing environmental stress (*e.g.* decrease in nutrient availability), as proposed by the “stress gradient hypothesis”, and should therefore be particularly valuable in low-input agroecosystems (Maestre et al., 2009 ; Le Roux and Mc Geoch, 2010).

Cereal-legume intercropping have been particularly promoted for their beneficial effect on nitrogen (N) nutrition but recent studies reported similar results for P (Li et al. 2007 ; Hauggaard-Nielsen et al., 2009; Hinsinger et al. 2011a). While complementary use of N chemical forms between the cereal and the N<sub>2</sub>-fixing legume is considered to be the main mechanism explaining the resulting overyielding, little is known about P. In the field, interactions for P acquisition between plant species have been mainly studied through the measurement of nutrient accumulation in the aboveground biomass, *i.e.* nutrient offtake (Li

et al., 1999, 2001, 2003, Hauggaard-Nielsen et al., 2009). To understand the mechanisms determining the partition of nutrients between plants of different species, one needs to focus on belowground interactions in the zone of soil around the roots that is affected by root activity, *i.e.* the rhizosphere (Darrah, 1993). To increase P availability, plant species have evolved different strategies: enhancing the volume of soil explored by roots which ultimately increase the size of the rhizosphere and/or enhancing the amount of available P in the rhizosphere either directly through exudation of P-mobilizing compounds or indirectly through the activity of microorganisms (Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003; Rengel and Marschner, 2005). Most of the studies on rhizosphere interactions for P acquisition in intercrops have been conducted in controlled conditions to determine the root-induced mechanisms possibly involved in the changes of P availability in the rhizosphere, as reviewed by Hinsinger et al. (2011a). To our knowledge, so far only Song et al. (2007) reported information on chemical (*e.g.* P and N concentrations) properties of the rhizosphere measured in the field.

Li et al. (2007) reported in their field experiment a decrease of positive interactions between species on maize grain yield intercropped with faba bean with increasing P fertilization rate. Those results are in agreement with “the stress gradient hypothesis” (Le Roux and Mc Geoch, 2010). Some other experiments tested the effect of P fertilization, sometimes in combination with N fertilization but the results remain unclear (Li et al., 1999, 2001; Kimaro et al., 2009).

The aim of this study was two-fold. First we evaluated the effect of intercropping (i) on P availability in the rhizosphere of different species and (ii) on crop performance in terms of P offtake and yield. We assumed that plant interactions will be modified by the crop species and cropping treatment (*i.e.* intercrop vs sole crop). Second, we tested whether the initial soil P availability influenced such interactions between intercropped species. We assumed that the positive impact of species interactions in intercrop would be more pronounced at low P availability, according to the “stress gradient hypothesis”.

Plant interactions were evaluated for two intercrops with two cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.), one being intercropped with pea (*Pisum sativum* L.) and the other with faba bean (*Vicia faba* L.). To test the effect of P availability, these crops were grown in a long term P fertilized field trial at 3 rates of P fertilization.

## **I.2. Materials and methods**

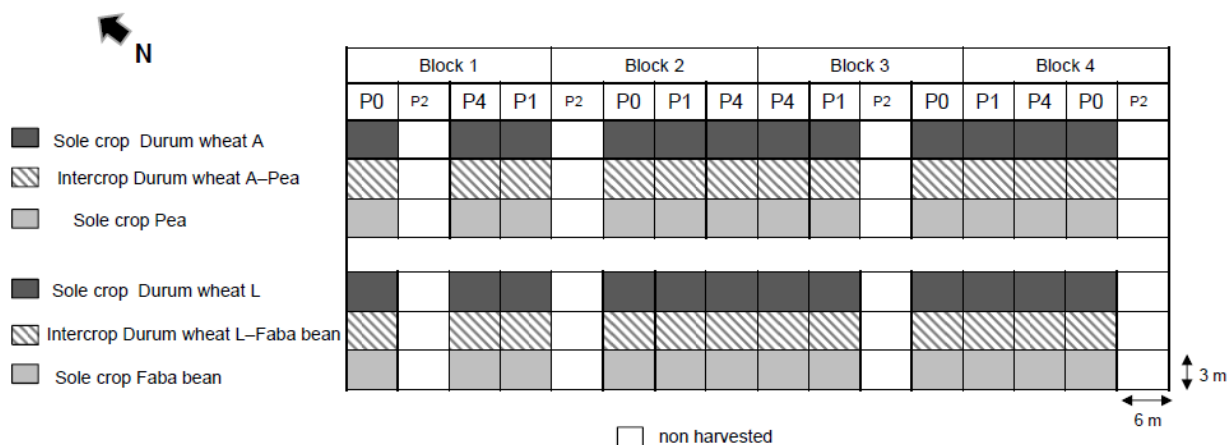
### **I.2.1. Field site and soil**

The experiment was carried out in the long term P fertilisation trial of the INRA Research center at Auzéville (SW France 43°31'N, 1°30'E), near Toulouse in South Western France in 2009. The mean annual rainfall was 650 mm, while mean annual temperature was 13.7°C, with maximum and minimum daily air temperature of 21.9°C (August) and 6.0°C (January). The soil was a deep alluvial soil (Typic Hapludalf, USDA, 1999), with 258 g kg<sup>-1</sup> clay, 168 g kg<sup>-1</sup> fine silt, 167 g kg<sup>-1</sup> coarse silt, 198 g kg<sup>-1</sup> fine sand and 164 g kg<sup>-1</sup> coarse sand (Colomb et al.,



2007). Before sowing, additional soil properties were measured for each individual experimental plot at 0-30 cm depth, with mineral N amounting to  $2.2 \text{ mg kg}^{-1}$  and organic C to  $8.8 \text{ g kg}^{-1}$  (see Colomb et al. 2007 for additional data). The field trial is characterized by a  $\text{CaCO}_3$  concentration gradient and a pH gradient, which range, respectively, from 0 to  $73 \text{ g kg}^{-1}$  and from 6.6 to 8.4 (1:10 soil:water ratio), with roughly equal distribution of the plots in both calcareous and non-calcareous areas of the experiment (Colomb et al., 2007).

### I.2.2. Experimental design



**Figure 3.1.** Field experimental design. In the experiment, the different sole crops and intercrops were sown for the four P regimes but only harvested for P0, P1 and P4 treatments.

The field experiment derived from a split-plot design. It consisted in four P regimes as main plot arranged in four randomized blocks along the  $\text{CaCO}_3$  gradient. The four P regimes correspond to distinct fertilization rates since 1968 (Colomb et al., 2007): P0 (no fertilization), P1 (fertilization rate supposed to balance the mean annual P offtake of crops), P2 and P4 (fertilization rates supposed to represent two- and four-fold (initially, but currently three-fold) the mean annual P offtake of crops). Since 1991, P has been applied at the following rates: 0, 11, 22 and  $33 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  for P0, P1, P2 and P4, respectively. The field was divided into 3 strips parallel to the  $\text{CaCO}_3$  gradient. For the experiment only 2 experimental strips (B and C) were used and 3 out of 4 P regimes were sampled: P0, P1 and P4, as P2 and P4 exhibited similar performance. Two cereal-legume intercrops were tested, each in one of the experimental strips (Fig. 3.1). Each experimental strip comprised three crop treatments: the two intercropped species and the corresponding species grown as sole crops. The actual size of each experimental plot was 6 m x 3 m, with an outer band of 1 m width in between plots. The intercrop design was based on the replacement principle (or substitutive design) with durum wheat and grain legume sown to yield half the densities achieved in sole crops. To ensure sufficient plant emergence, the sowing density in sole crop was higher than crop recommendation. Due to a wet winter, the crops were sown in February 2009. In one experimental strip, durum wheat (*Triticum turgidum durum* L., cv

Acalou), thereafter called durum wheat A, was intercropped with pea (*Pisum sativum* L., cv Livia). When intercropped the plants were sown at the same time in the same row (rows being 0.175 m apart) for maximizing belowground plant interactions, with 250 grains m<sup>-2</sup> for durum wheat and 75 grains m<sup>-2</sup> for pea. When grown as sole crops, the plants were sown in distinct rows 0.175 m apart at 400 grains m<sup>-2</sup> for durum wheat A and 100 grains m<sup>-2</sup> for pea. In the second experimental strip, durum wheat (cv LA1823), thereafter called durum wheat L, was intercropped with faba bean (*Vicia faba* L. cv Lady). As sole crops, durum wheat L was grown as for durum wheat A, while faba bean was sown in rows that were 0.352 m apart, with 35 grains m<sup>-2</sup>. When intercropped, durum wheat L and faba bean were sown at the same time in distinct rows to reduce faba bean competition on durum wheat. Durum wheat L was then sown in rows that were 0.175 m apart with 250 grains m<sup>-2</sup> and every third row was replaced by a faba bean row (thus resulting in an inter-row distance of 0.352 m between two consecutive faba bean rows) with 15 grains m<sup>-2</sup> (Supplementary data Fig. 3A.1).

Phosphorus was applied as Triple Superphosphate (Superphosphate 45) in September 2008, immediately after the harvest of the preceding sunflower crop (*Helianthus annuus* L, cv Melody). Sole crops and intercrops of durum wheat received distinct N fertilization as liquid fertilizer (1/2 urea, 1/2 ammonium nitrate 36% N) twice, according to wheat stages identified with the Zadocks wheat scale (Zadoks et al., 1974). A first N fertilization rate was applied at the “1st ear” (Zadocks 30) stage, with 40 kg N ha<sup>-1</sup> in intercrop and 80 kg N ha<sup>-1</sup> in sole crop to avoid inhibition of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by the legume. A second fertilization rate was applied at the “flag leaf visible” (Zadocks 37) stage, with 40 kg N ha<sup>-1</sup>. The field was irrigated twice, to secure crop emergence and fertilizer efficiency after N fertilization. Weeds were controlled manually during crop growth and pea was treated against peawill (*Sitona lineatus*) at plant emergence and green aphid (*Acyrtosiphon pisum*) at flowering.

#### I.2.3. Plant sampling and measurements

Plants were harvested in May 2009 at the legume flowering stage, which corresponded to heading for durum wheat. Plants were sampled in each plot on two adjacent rows over 1-m length. For durum wheat L intercropped with faba bean, one adjacent row of each species was sampled. In the intercropping treatment, the plants of each species were separated to obtain two distinct samples. Shoots were oven-dried at 80°C for 2 days and weighed for dry biomass determination. Shoots were then ground and subsamples were digested in a microwave oven (ETHOS, Milestone) with concentrated HNO<sub>3</sub> (65%) at 180°C and 2 MPa. Phosphorus content was determined using the vanado-molybdate method (AFNOR, 1969).

#### I.2.4. Soil/rhizosphere sampling and measurements

The sampling strategy for aboveground parameters was different for the rhizosphere or bulk soil and for aboveground plant parameters. Whole plants (from 3 to 10 depending on their size and species) were collected including roots from the topsoil (0-20 cm), which were excavated randomly in each sub-plot (corresponding to one P treatment and one crop

treatment). The roots and adhering soil were then separated from the shoots. For each plot, the soil free of roots was considered as bulk soil. For the intercropping treatment, a common bulk soil was sampled for the two species. In each sub-plot, all the plants sampled were pooled to collect the rhizosphere. In the intercropping treatment, the roots of each species were distinguished and sampled separately. Such strategy was chosen to compare the rhizosphere of each species grown either as sole crop or intercropped. Roots with adhering soil were gently shaken to remove the loosely attached soil aggregates and particles, and only keep the finer aggregates (< 3-5 mm) strongly adhering to roots. Because of the texture of the soil and its elevated water content at sampling, it was impossible to brush the roots in order to collect the rhizosphere. Instead, the roots were thus washed in deionised water at a water:root biomass ratio of 2:1. The collected suspension of soil strongly adhering to roots, operationally defining the rhizosphere, was then oven-dried at 60°C during 5 days. The bulk soil was processed similarly for adequate comparison of bulk soil and rhizosphere samples. The dry soil samples were then ground before analyses.

Soil P availability was determined by  $\text{NaHCO}_3$  extraction according to the Olsen method (Olsen et al., 1954). This fraction, thereafter called Olsen-P for simplicity, is often used as an indicator of P availability over the course of crop growth (Johnson et al., 2003). Given the small size of some the rhizosphere samples, 500 mg of soil were shaken with  $\text{NaHCO}_3$  solution (0.5 M pH=8.5) for 30 minutes. These were then centrifuged at 25,000 g for 10 minutes. Phosphorus concentrations in the extract solutions were measured with the malachite green method (Ohno and Zibilske, 1991).

#### 1.2.5. Statistical analyses

Differences between P concentration in the rhizosphere and bulk soil for each species within a P fertilization treatment and for one crop treatment were evaluated with Student-tests at the probability level of 0.05. Considering the sampling strategy, paired samples Student-test were used and because of the inequality of the variance, tests were performed for data with non-homogeneous variance. We performed analyses of variance (ANOVA) to test the effects of crop treatment (sole crop vs intercrop) and P fertilization treatment as well on aboveground biomass, P concentration and P offtake for each species. We used similar test when analyzing total aboveground biomass and P offtake of intercrops and respective sole crops with crop treatments relative to intercrop, sole crop durum wheat and sole crop legume. We used linear regression to examine the relationship between P concentration in the rhizosphere and in the bulk soil and analyses of covariance (ANCOVA) to evaluate the effect of species on such relationship. The ANCOVA was also used to examine the effect of crop treatment (*i.e.* intercrop vs sole crop) and P fertilization treatment, as well as their interaction. Regressions between P concentration in rhizosphere and the bulk soil were performed without intercept, *i.e.* were forced through the origin. Considering the low number of data, the hypothesis concerning residuals was seldom confirmed. When such a case was observed significant differences were assessed for probability values strictly

smaller than 0.01. The 2.13.2 version of R software (R development Core Team 2011) was used for statistics.

### I.3. Results

#### I.3.1. Crop growth and phosphorus use

**Table 3.1.** Aboveground biomass (dry weight) at sampling for durum wheat A and pea (a) and durum wheat L and faba bean (b) in different treatments. Values represent the means  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and P fertilization regime stars indicate significant difference between crop treatment (sole crop vs intercrop) or between total above ground dry weight (observed vs expected) with \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Values of probability of two-ways ANOVA (crop treatment x P fertilization) were indicated for aboveground dry weight for each species and values of probability of a two-way ANOVA (Crop treatment x P fertilization) were indicated for total aboveground biomass in intercrop compared to the respective sole crops of each species. The probability values related to the *F*- test are indicated, n.s. means not significant ( $p \geq 0.05$  and  $p \geq 0.01$  when the assumptions of the ANOVA were met or not, respectively).

a)	P fertilization	Crop treatment	Durum wheat A	Pea	Total in intercrop
Dry weight (t ha <sup>-1</sup> )	P0	Sole crop	0.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2
		Intercrop	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	
	P1	Sole crop	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.3
		Intercrop	0.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	
	P4	Sole crop	1.5 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.2
		Intercrop	0.8 $\pm$ 0.1*	1.9 $\pm$ 0.3	
Crop treatment			<0.01	n.s.	<0.01
P fertilization			<0.01	<0.01	<0.01
Crop treatment x P fertilization			n.s.	n.s.	n.s.

b)	P fertilization	Crop treatment	Durum wheat L	Faba bean	Total in intercrop	
Dry weight (t ha <sup>-1</sup> )	P0	Sole crop	0.9 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	
		Intercrop	0.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1		
	P1	Sole crop	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1**	1.4 $\pm$ 0.2
		Intercrop	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	
	P4	Sole crop	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1***	1.7 $\pm$ 0.2
		Intercrop	0.9 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	
Crop treatment			n.s.	<0.01	<0.01	
P fertilization			n.s.	<0.01	0.05	
Crop treatment x P fertilization			n.s.	n.s.	n.s.	

Table 3.1 shows aboveground biomass of crops at sampling, *i.e.* legume flowering stage and heading stage for durum wheat. For the durum wheat A-pea intercrop, the aboveground biomass of the cereal was lower when intercropped with pea and increased with P fertilization regimes. For pea, the aboveground biomass increased with P fertilization regime and was similar to that observed when intercropped with durum wheat A. In the case of durum wheat L no biomass difference was observed either when intercropped with faba bean or when P was added. The aboveground biomass of faba bean was significantly lower when intercropped especially for the two highest P fertilization regimes (P1 and P4). The total biomass produced in intercrop was systematically higher than the respective sole crops. The total biomass produced by the intercrops was 21% to 83% greater than that achieved by the sole crops of durum wheat. The P fertilization regimes affected aboveground biomass similarly for sole crops and intercrops with significantly higher values for P4 than P0.

Table 3.2 reported P concentration and offtake in crops for each species and treatment. For P concentrations, no differences were observed for durum wheat A when intercropped while for pea, P concentrations were lower when intercropped especially for P0 and P4 fertilization regimes, with values 0.7 and 0.8 times lower respectively. For the two species, P concentrations increased with P fertilization regime. Contrary to P concentrations in aboveground biomass, the effect of intercrop on P offtake was only observed for durum wheat with values 0.7 times lower in intercrop than in sole crop. For pea, no difference was observed except for the treatment without fertilization (P0) where values in intercrop were 0.4 times lower than in sole crop. For the two species P offtake increased with P fertilization regimes. For the durum wheat L, no difference in P concentration was observed when intercropped with faba bean. For faba bean, P concentrations when intercropped with durum wheat L decreased 0.8 and 0.7 times for P1 and P4 treatments, respectively. The P concentration increased with P fertilization regimes only for durum wheat L, especially between the two extreme treatments (P0 and P4). For faba bean in sole crop, P concentrations tended to increase with P fertilization regime, but when intercropped such differences were no longer observed. When considering P offtake, neither crop treatment nor P fertilization regime did influence the P offtake of durum wheat. For faba bean, P offtake increased with increasing P supply similarly as for P concentration in aboveground biomass. As for the biomass, values of total P offtake were higher in intercrop compared to species in sole crop and even more so for the legumes. Total P offtakes in intercrop were 21% to 64% higher than for legume in sole crop, with significant difference for faba bean. The P fertilization regime affected P offtake similarly for sole crops and intercrops.

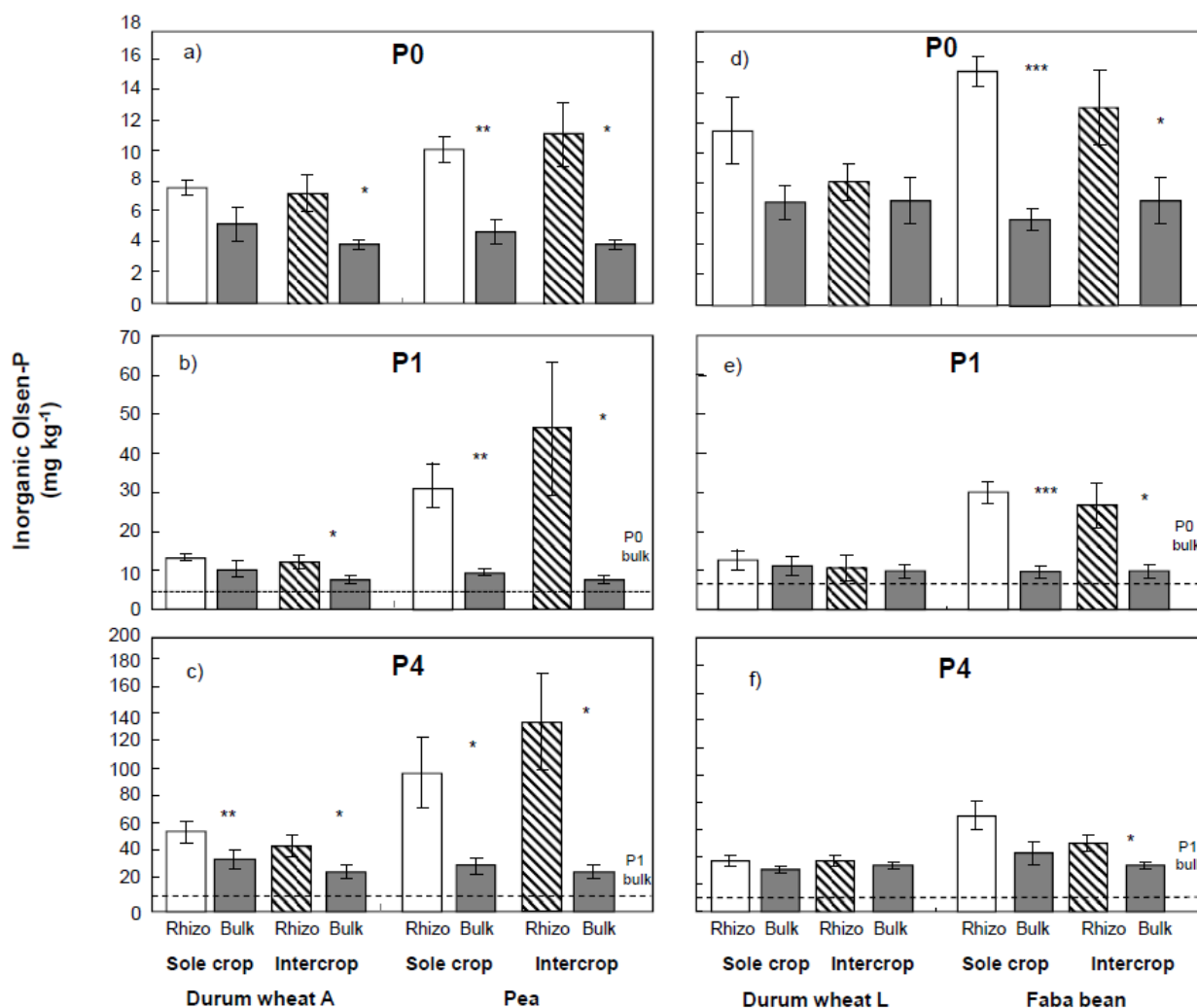
**Table 3.2.** P concentration in dry aboveground biomass and P offtake at sampling for durum wheat A and pea (a) and durum wheat L and faba bean (b) in different treatments. For the meaning of total P offtake of the intercrops either observed or expected, see *material and methods*. Values represent the means  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and P fertilization regime stars indicate significant difference between crop treatment (sole crop vs intercrop) or between total yields (observed vs expected) with \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ). Values of probability of two-ways ANOVA (Crop treatment x P fertilization) were indicated for P concentration and P off-take for each species and values of probability of a two-way ANOVA (Crop treatment x P fertilization) were indicated for total P offtake in intercrop compared to the respective sole crops of each species. The probability values related to the *F*-test are indicated, n.s. means not significant ( $p \geq 0.05$  and  $p \geq 0.01$  when the assumptions of the ANOVA were met or not, respectively).

a)	P fertilization	Crop treatment	Durum wheat A		Pea		Total in intercrop
<b>P concentration (%)</b>	P0	Sole crop	0.22 $\pm$ 0.02		0.18 $\pm$ 0.01*		
		Intercrop	0.21 $\pm$ 0.01		0.13 $\pm$ 0.01		
	P1	Sole crop	0.34 $\pm$ 0.05		0.22 $\pm$ 0.02		
		Intercrop	0.24 $\pm$ 0.05		0.19 $\pm$ 0.02		
	P4	Sole crop	0.42 $\pm$ 0.03		0.32 $\pm$ 0.01**		
		Intercrop	0.46 $\pm$ 0.03		0.26 $\pm$ 0.01		
<b>P offtake (kg ha<sup>-1</sup>)</b>	P0	Sole crop	1.5 $\pm$ 0.4		1.4 $\pm$ 0.2*		1.7 $\pm$ 0.3
		Intercrop	1.0 $\pm$ 0.2		0.6 $\pm$ 0.1		
	P1	Sole crop	3.9 $\pm$ 0.4**		2.5 $\pm$ 0.6		4.1 $\pm$ 0.5
		Intercrop	2.1 $\pm$ 0.2		2.0 $\pm$ 0.4		
	P4	Sole crop	6.0 $\pm$ 0.7*		6.7 $\pm$ 1.9		8.5 $\pm$ 0.4
		Intercrop	3.5 $\pm$ 0.4		5.0 $\pm$ 0.7		
<b>ANOVA</b>			P concentration	P offtake	P concentration	P offtake	P offtake
Crop treatment			n.s	<0.01	<0.01	n.s	<0.01
P fertilization			<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	n.s
Crop treatment x P fertilization			n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

b)	P fertilization	Crop treatment	Durum wheat		Faba bean		Total in intercrop
			L				
<b>P concentration (%)</b>	P0	Sole crop	0.35 ± 0.07		0.21 ± 0.02		
		Intercrop	0.25 ± 0.02		0.26 ± 0.05		
	P1	Sole crop	0.35 ± 0.06		0.29 ± 0.01**		
		Intercrop	0.35 ± 0.02		0.24 ± 0.01		
	P4	Sole crop	0.47 ± 0.04		0.38 ± 0.01**		
		Intercrop	0.48 ± 0.03		0.26 ± 0.02		
<b>P offtake (kg ha<sup>-1</sup>)</b>	P0	Sole crop	2.7 ± 0.8		1.3 ± 0.2		3.0 ± 0.8
		Intercrop	1.8 ± 0.5		1.2 ± 0.5		
	P1	Sole crop	3.3 ± 0.5		3.5 ± 0.4**		4.6 ± 1.0
		Intercrop	3.5 ± 0.9		1.1 ± 0.2		
	P4	Sole crop	4.7 ± 0.9		5.2 ± 0.3***		6.3 ± 0.7
		Intercrop	4.3 ± 0.5		2.0 ± 0.3		
<b>ANOVA</b>			P		P		
			concentration	P offtake	concentration	P offtake	P offtake
Crop treatment			n.s	n.s	n.s	<0.01	0.01
P fertilization			<0.01	n.s	n.s	<0.01	0.02
Crop treatment x P fertilization			n.s	n.s	<0.01	<0.01	n.s

### 1.3.2. Phosphorus availability in the rhizosphere and bulk soil

Phosphorus availability was evaluated through the P concentration in Olsen-extracts for the rhizosphere and bulk soil. Considering the heterogeneity of the soil across the field trial, we compared for each rhizosphere sample the corresponding bulk soil. Figure 3.2 shows the values of inorganic P concentrations in Olsen-extracts in the rhizosphere and in the bulk soil obtained for the various crop treatments at the three P fertilization regimes. Comparisons between rhizosphere and bulk soil were done for each species within each crop treatment (sole crop vs intercrop). For durum wheat A, changes of P concentration were observed with increased values in the rhizosphere compared to bulk soil at all P fertilization regimes (Fig. 3.2a, b and c).



**Figure 3.2.** Inorganic phosphorus concentration in Olsen extracts in the rhizosphere and in the bulk soil for durum wheat A and pea grown as sole crops or intercropped at P0 (a), P1 (b) and P4 (c), and for durum wheat L and faba bean grown as sole crops or intercropped at P0 (d), P1 (e) and P4 (f). For P1 and P4 treatments, dashed line indicates the mean value of bulk soil for the P regime below (e.g. value of P0 for P1).

For the two lowest P fertilization levels (P0 and P1), such increase of available P concentration in the rhizosphere of durum wheat A was significant only when intercropped with pea. For the highest P fertilization level, *i.e.* P4 treatment (Fig. 3.2c) the increase of P availability in the rhizosphere of durum wheat A was significant either when intercropped or when grown as sole crop. For pea, available P concentrations were always significantly higher in the rhizosphere than in the bulk soil, whatever the crop treatment and P fertilization regime (Fig. 3.2a, b and c). Such increase of available P in the rhizosphere of pea tended to be larger when intercropped with durum wheat A, the increase ranging from 1.9- to 5.2-fold while it ranged from 1.2- to 2.5-fold when in sole crop. In comparison, the observed changes of P availability in the rhizosphere of durum wheat A were less than 1.9-fold, relative to the bulk soil. For the durum wheat L, no significant changes in available P concentration were found in the rhizosphere, while significant increases were observed for



faba bean. For the two lowest P fertilization levels (P0 and P1), the available P concentrations increased significantly in the rhizosphere of faba bean for both crop treatments, while at the highest P fertilization level (P4, Fig. 3.2f), a significant increase was only found when intercropped with durum wheat L. When grown as sole crop available P was 1.6- to 2.7-fold larger in the rhizosphere of faba bean than in the bulk soil, while the increase ranged from 1.5- to 3.1-fold when intercropped with durum wheat L. Contrary to the durum wheat A-pea intercrop, the relative increase of inorganic P concentration in the rhizosphere of faba bean tended to be higher in sole crop than when intercropped with durum wheat.

**Table 3.3.** Organic phosphorus concentration in Olsen extracts in the rhizosphere and in the bulk soil for the different P fertilization regimes for durum wheat A and pea grown as sole crops or intercropped (a) and for durum wheat L and faba bean grown as sole crops or intercropped (b). Values represent the means  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and P fertilization regime stars indicate significant difference between crop treatment (sole crop vs intercrop) with \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ).

a)	P fertilization	Crop treatment	Durum wheat A		Pea	
			Rhizosphere	Bulk Soil	Rhizosphere	Bulk Soil
			<b>Olsen-Po (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	P0	Sole crop	8 $\pm$ 1
		Intercrop	9 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1
	P1	Sole crop	9 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2
		Intercrop	8 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	20 $\pm$ 11	11 $\pm$ 2
	P4	Sole crop	1 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2	0 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1
		Intercrop	5 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1	10 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1

b)	P fertilization	Crop treatment	Durum wheat L		Faba bean	
			Rhizosphere	Bulk Soil	Rhizosphere	Bulk Soil
			<b>Olsen-Po (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	P0	Sole crop	9 $\pm$ 1
		Intercrop	12 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
	P1	Sole crop	9 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0	12 $\pm$ 1
		Intercrop	10 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	9 $\pm$ 2
	P4	Sole crop	9 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	10 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2
		Intercrop	6 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1

Table 3.3 shows the values of organic P concentrations in Olsen-extracts in the rhizosphere and in the bulk soil obtained for the various crop treatments at the three P fertilization regimes. Comparisons between rhizosphere and bulk soil were done for each species within each crop treatment (sole crop vs intercrop). For durum wheat A-pea intercrop, values tended to be lower in the rhizosphere compared to bulk soil especially for the lowest P fertilization regime (P0) for the two species in sole crop. More precisely, the decrease in organic P concentration in the rhizosphere of the cereal tended to be larger

compared to that observed for the legume, with decreases by 0.52- and 0.34-fold for durum wheat A and pea, respectively. For durum wheat L-faba bean intercrop no differences were observed between organic P concentrations measured in the rhizosphere and in the bulk soil.

The effect of the plant species on the relationship between available P concentrations in the rhizosphere and in the bulk soil was tested for inorganic and organic fractions with an ANCOVA (Table 3.4). For inorganic P, the results indicated a significant relationship between P concentrations in the rhizosphere and in the bulk soil, and also a significant interaction with the plant species. For durum wheat A intercropped with pea, there was also a significant effect of the plant species, indicating that the observed positive relationship between P concentration in the rhizosphere and the bulk soil was significantly different in durum wheat A and pea. Concerning the durum wheat L-faba bean intercrop, there was no such significant effect of the plant species (Table 3.4). Actually, the slope of the relationship was the same irrespective of the plant species, but the value of the intercept was different for faba bean and durum wheat L. For organic P, the relationship between values in the rhizosphere and in the bulk soil was observed only for durum wheat L-faba bean intercrop and was the same for the two species.

**Table 3.4.** Results of ANCOVA analyses for soil data considering the influence of the plant species on the relationship between values of inorganic Olsen-P (Olsen-Pi) or organic Olsen-P (Olsen-Po) concentrations in the rhizosphere and bulk soil for each intercrop separately. The probability values related to the *F*- test are indicated, n.s. means not significant ( $p \geq 0.05$  and  $p \geq 0.01$  when the assumptions of the ANOVA were met or not, respectively).

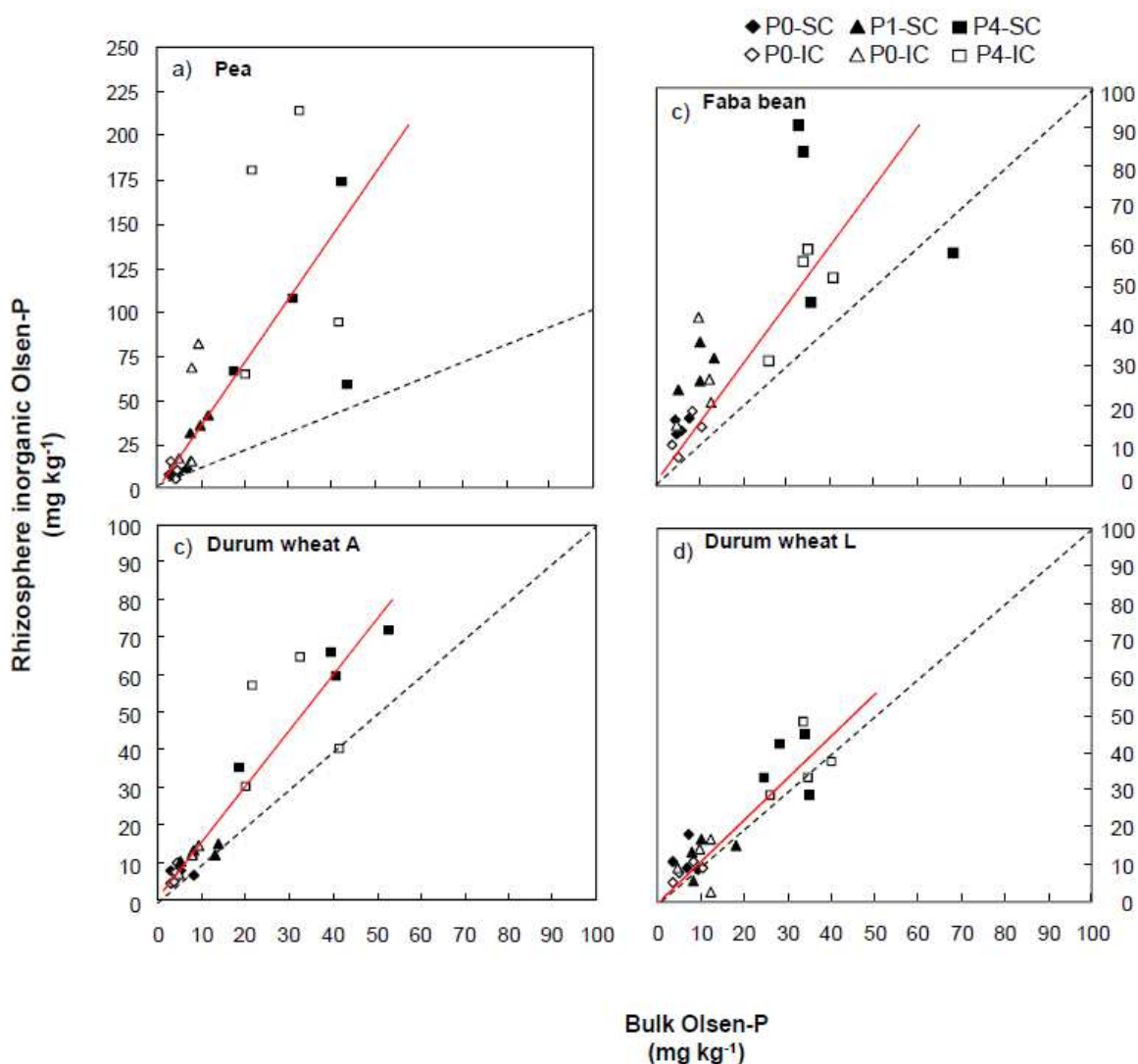
	Durum wheat A – Pea intercrop	Durum wheat L – Faba bean intercrop
<b>Rhizosphere Olsen-Pi</b>		
Bulk soil Olsen-Pi	<0.01	<0.01
Species	<0.01	n.s.
Bulk soil Olsen-Pi x Species	<0.01	<0.01
<b>Rhizosphere Olsen- Po</b>		
Bulk soil Olsen-Po	n.s.	<0.01
Species	n.s.	n.s.
Bulk soil Olsen- Po x Species	n.s.	n.s.

Same type of statistical analyses was performed to evaluate the effect of the crop treatment and P fertilization regime on the relationship between P concentration in Olsen extracts in the rhizosphere and in the bulk soil. The results of this ANCOVA are reported in Table 3.5. No significant effect of the crop treatment and P fertilization regime was detected for any of the plant species or durum wheat genotype either for inorganic or organic P.

**Table 3.5.** Results of ANCOVA analyses for soil data considering the influence of the crop treatment (sole crop vs intercrop), P fertilization regime (P0, P1 and P4) and their interaction on the relationship between values of inorganic Olsen-P (Olsen-Pi) or organic Olsen-P (Olsen-Po) concentrations in the rhizosphere and bulk soil. The probability values related to the *F*- test are indicated, n.s. means not significant ( $p \geq 0.05$  and  $p \geq 0.01$  when the assumptions of the ANOVA were met or not, respectively).

	Durum wheat A	Pea	Durum wheat L	Faba bean
<b>Rhizosphere Olsen-Pi</b>				
Bulk Olsen-Pi	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Crop treatment	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bulk Olsen-Pi x Crop treatment	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bulk Olsen-Pi x P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Crop treatment x P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bulk Olsen-Pi x Crop treatment x P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Rhizosphere Olsen-Po</b>				
Bulk Olsen-Po	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Crop treatment	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bulk Olsen-Po x Crop treatment	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bulk Olsen-Po x P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Crop treatment x P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bulk Olsen-Po x Crop treatment x P fertilization	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Relationships between P concentration in the rhizosphere and in the bulk soil for each plant species or durum wheat genotype are reported in figure 3.3. Such representation gives a better idea of the variability of the results, which however consistently showed an increase of P availability in the rhizosphere relative to the bulk soil in most cases. Linear regressions yielded slopes ranging from 1.1 to 3.6, with pea being really distinct from the other species. For pea, the value of the slope was 3.6, while it was 1.5 for faba bean and durum wheat A, and close to 1 for durum wheat L.



**Figure 3.3.** Relationship between inorganic phosphorus concentration in Olsen extracts in the rhizosphere and in the bulk soil for durum wheat A (a), pea (b), durum wheat L (c) and faba bean (d). Values correspond to all the P fertilization regimes and crop treatments. Dotted lines correspond to the  $y = x$  line.

## I.4. Discussion

### I.4.1. Effect of crops on P availability in the rhizosphere

The concentration of inorganic P in Olsen extracts systematically increased in the rhizosphere compared to bulk soil, although not significantly for all treatments. It is usually assumed that a decrease of P availability should occur in the rhizosphere compared to the bulk soil as a result of plant uptake combined with the slow diffusion of phosphate ions in the soil solution (as reviewed by Barber, 1995; Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2011b). This is supported by numerous works, mostly conducted in controlled conditions, *i.e.* pots or various rhizobox settings. In contrast, our results provide new evidence of the occurrence of an increase of P concentration in the rhizosphere, as previously reported in few works either for inorganic P (Bagayoko et al. 2000; see review by Hinsinger, 2001; Devau et al., 2010;

Betencourt et al., 2012) or organic P (Chen et al. 2002; Vu et al., 2008; Wang et al., 2012). Most of these former publications referred to results obtained in controlled conditions and from modelling work that helped to determine the mechanisms involved. Such increases were attributed to changes in the biochemical, chemical and physical properties of the rhizosphere. Root exudates are supposed to be the main drivers of such changes through their direct influence on P availability or through the stimulation of microbial activity. Geelhoed et al. (1999) modeled such an increase in P concentration in the rhizosphere considering the exudation of citrate combined with the P uptake activity of maize (*Zea mays* L.) roots. However, their work was restricted to an artificial substrate made of goethite-coated quartz sand, where phosphate ions were either adsorbed onto the goethite, or present in the solution, and thus readily available. Recent mechanistic modelling work was conducted in soils sampled in the same long term fertilizer trial (P0 and P4 in the blocks containing no CaCO<sub>3</sub>) as in our work and reported that more complex interactions had to be accounted for to adequately simulate the observed increase of the most readily available fraction of soil P in the rhizosphere of durum wheat A (Devau et al., 2010, 2011). These authors showed that rhizosphere alkalization combined with both P and Ca uptake had to be accounted for.

The results of our field experiment confirmed the increase of inorganic P concentration in the rhizosphere as previously reported in laboratory conditions for the same soils from the Auzeville long term P-fertilizer trial for different extracts (*i.e.* Olsen and water extracts). It was observed in spite of the different experimental settings and sampling strategies of the rhizosphere: *i.e.* in either mini-rhizobox experiments (Devau et al., 2010, 2011) or pot experiment (Betencourt et al., 2012). Root-induced pH change was one of the rhizosphere processes identified by these authors to explain the observed increase of available P. In our case, values of pH were determined in the rhizosphere and in the bulk soil but the large variability of the data (data not shown) did not allow us to draw any conclusion. This was likely the consequence of the CaCO<sub>3</sub> gradient along our field trial, resulting in distinctly larger pH values in the blocks 3 and 4 than 1 and 2, as stressed by Colomb et al. (2007). In their pot and mini-rhizobox experiments, Betencourt et al. (2012) and Devau et al. (2010, 2011) had been using soils from the P0 and P4 treatments from the blocks 1 and 2, which were devoid of CaCO<sub>3</sub> possibly explaining why they observed significant pH changes while we did not.

#### 1.4.2. Effect of plant species on P availability in the rhizosphere

In our experiment, increases in inorganic P availability were more frequently observed in the rhizosphere of legumes than durum wheat and especially for pea. For durum wheat significant changes in P availability in the rhizosphere only occurred for one of the two genotypes, *i.e.* durum wheat A. Differences between the effect of both the legume and the cereal were more marked in the durum wheat A-pea intercrop than in the durum wheat L-faba bean intercrop. However, pea exhibited by far the largest increase of rhizosphere P availability, compared with faba bean and durum wheat, whatever the P fertilization regime.

Concerning organic P in Olsen extracts, differences between species were minor and were also essentially observed for durum wheat A-pea intercrop in the lowest P treatment (P0) where decreases in organic P concentration tended to be larger in the rhizosphere of durum wheat A compared with pea, irrespective of crop treatments. Differences between species or genotypes to access soil P have been extensively studied. It is usually assumed that legumes are more efficient than cereals to access soil P as a result of higher root exudation of *e.g.* (i) protons due to N<sub>2</sub> fixation (Tang et al., 1997; Hinsinger et al. 2003) , (ii) carboxylates (Neumann et Römheld, 1999; Veneklaas et al., 2003; Pearse et al., 2006) or (iii) phosphatases (Yadav et Tarafdar, 2001). However, one should be careful to generalize as some recent studies reported no such differences of efficiency (Rose et al., 2010) or limited differences (Nuruzzaman et al., 2006) between cereals and legumes when considering P concentration in the rhizosphere for different extracts. In the present work, we were not able to explain the reasons for the greater ability of the legumes and especially pea, to increase rhizosphere P availability, compared with durum wheat.

#### 1.4.3. Effect of intercropping on P availability in the rhizosphere

The most interesting intercropping effect was observed for the durum wheat A-pea intercrop. As for Betencourt et al. (2012) in their pot experiment on chickpea (*Cicer arietinum* L.) intercropped with durum wheat L, there was a trend towards a greater increase of available P in the rhizosphere of the intercropped plants than when these were grown as sole crops. This is more marked in the case of pea at all three P fertilization levels (Fig. 3.2 and 3.3), which could be involved as mechanisms of facilitation in this intercropping system. For durum wheat A, such increase of P availability in the rhizosphere was significant only when intercropped with pea for the two lower levels of P fertilization (P0 and P1). Yet significant increase in P availability was observed in P4 for durum wheat either in sole crop or intercropped, which was not the case in the pot experiment of Betencourt et al. (2012). In contrast, in durum wheat L-faba bean intercrop, the values of available P in the rhizosphere of faba bean were rather smaller when intercropped with durum wheat L than when grown as sole crop. Our results for the durum wheat L-faba bean intercrop are in line with studies conducted in controlled conditions, which reported intermediate concentrations of inorganic P in water and citric acid extracts in the rhizosphere of bread wheat (*Triticum aestivum* L.)-white lupin (*Lupinus albus* L.) intercrop (Cu et al., 2005) or in the rhizosphere of durum wheat-common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercrop in different extracts including NaHCO<sub>3</sub> extracts, which are close to our Olsen extraction (Li et al., 2008). Those authors did not distinguish the rhizosphere of the two species when intercropped. Their experimental set-up made it impossible to investigate more precisely the changes in the rhizosphere of each species considered separately. In contrast, our sampling strategy was designed to analyze separately the roots of the two intercropped species. A similar sampling strategy had been applied by Song et al. (2007) who reported a slight rhizosphere increase of inorganic P concentration in Olsen extract for bread wheat when intercropped with either faba bean or

maize. However, no significant increase occurred in the rhizosphere of the faba bean and maize when intercropped with bread wheat. The observed trends showing a greater increase of P availability in the rhizosphere of durum wheat and even more so for pea when intercropped is therefore the first field experiment that support such process. We could however not validate or invalidate our hypothesis that such process was the consequence of enhanced N<sub>2</sub> fixation in pea when intercropped as previously shown for pea intercropped with durum wheat (Bedoussac and Justes, 2010), and thus enhanced rhizosphere acidification resulting in increased P availability. When comparing the intercropping effect in the two intercrops, one shall remember that the experimental design did not only differ in terms of legume species, but also in terms of sowing patterns. The greater effect observed for pea than for faba bean may be due to the greater proximity between the legume and cereal in durum wheat A-pea intercrop than in durum wheat L-faba bean intercrop, as the distance between the root systems and level of intermingling is rather crucial for such interactions (Li et al., 2007; Raynaud et al., 2008).

#### I.4.4. Effect of P availability on plant-plant interactions in the rhizosphere

Our experiment was set on a long term P fertilizer trial in order to evaluate the effect of soil P availability on plant-plant interactions and more precisely to test the “stress gradient hypothesis” proposed in ecology for natural ecosystems. This hypothesis states the prevalence of positive interactions (*i.e.* facilitation), relative to negative interactions (*i.e.* competition) in more stressful environments, for instance when resource availability is low (Maestre et al., 2009; Le Roux and Mc Geoch, 2010), P availability in the present case. Only slight differences of the effect of plant-plant interactions on rhizosphere P availability for durum wheat A-pea intercrop were observed for the various P levels. Durum wheat A exhibited significantly enhanced P availability in the rhizosphere only when intercropped at the lowest soil P levels (P<sub>0</sub> and P<sub>1</sub>, see figure 3.2). In the case of durum wheat L-faba bean intercrop no effect of P fertilization on plant interactions in the rhizosphere was observed (Figure 3.2). Our results thus did not validate the “stress gradient hypothesis” when considering rhizosphere interactions on P availability, in contrast with the results obtained for durum wheat – chickpea intercrop in the pot experiment of Betencourt et al. (2012).

#### I.4.5. Effect of species interactions on crop growth and phosphorus use

Similar trends were observed for the cereal and the legume in the two intercrops. Aboveground dry biomass of durum wheat A was significantly lower when intercropped. Because P concentration in the aboveground dry biomass of durum wheat A was not significantly affected by the presence of the intercropped legume, the amount of P accumulated in the aboveground plant parts (*i.e.* P offtake) of durum wheat A was lower when intercropped with pea. The differences observed in dry biomass and P offtake between durum wheat A in sole crop and intercropped with pea were in the range of the change in density between the two crop treatments (sole crop vs intercrop) (see

supplementary data, table 1.A.1). Indeed, those differences may be partly attributed to lower density of durum wheat A when intercropped with pea and did not result from pea competition. Similar hypothesis can be advocated for durum wheat L, aboveground biomass, P concentrations in aboveground biomass, and consequently P offtake which were identical in sole crop and intercrop. The associated little differences of durum wheat L density when intercropped compared to that in sole crop suggest that the cereal was not affected by the presence of faba bean. As for the cereals, differences in aboveground biomass of legumes were in the range of the changes in density of the species when grown as sole crop or intercropped. Contrary to the two durum wheat cultivars, P concentrations were systematically lower for the legumes when intercropped. Consequently, P offtake was lower for intercropped plants, and significantly for faba bean. Variation in P concentrations and P offtake are indicators of plant-plant interactions as a response to P acquisition. Thus, those results suggest higher competitive ability of durum wheat relative to legumes for P acquisition. It is usually reported for soil N acquisition and was attributed to differences in root growth between species with faster and deeper root growth such as cereals (Hauggaard-Nielsen et al. 2001a; Corre Hellou and Crozat, 2005; Corre-Hellou et al. 2007). In our case, the same process may be advocated to explain the lower competitive ability of either pea or faba bean. Differences in competitive ability for N acquisition may also have influenced P acquisition and explained the effect on the species when intercropped. A compensation process may be proposed to explain that aboveground biomass of the legumes seemed to be affected by the change of densities between the two crop treatments and not by the presence of the cereal when intercropped. Our results do not confirm the enhanced P nutrition and growth previously reported in the literature in China (Li et al., 2001; Li et al., 2003; Li et al. 2007). Those former works were relative to field experiment with different species maize-faba bean intercrop or bread wheat-soybean (*Glycine max* L.) intercrop, with different sowing and harvesting time for the two intercropped species and with different spatial arrangement, each species being arranged in several parallel strips. Among them, at legume flowering stage for maize-faba bean intercrop, Li et al. (2003) observed an increased P concentration in the aboveground biomass of the intercropped species. In addition, in our experiment, sown densities of sole crops were chosen to compare intercrop performance to optimal growth of sole crops, while the final densities that we obtained were below the expected densities (see supplementary material, table 1.A.1). It is thus difficult to compare our results with former studies for which to our knowledge the spatial arrangement of the intercrops was quite different.

Intercrop performance are usually evaluated considering the use of environmental resources (e.g. nutrients, light) for plant growth. Values observed in intercrop were compared to those in sole crop and the indicator often used is the Land Equivalent Ratio (LER) corresponding to the relative land area with sole crops required to produce the performances achieved by the intercrop (de Wit and Van den Bergh, 1965; Willey, 1979). Hauggaard-Nielsen et al. (2009) their European study on resource use of barley (*Hordeum*



*vulgare* L.)-pea intercrop was mainly focused on N but also reported improved P acquisition for two field sites. Those results were expressed using the LER indicator to compare P use by the overall intercrop compared to respective sole crops. In our case the discrepancies between sown and final densities make it difficult to properly use this indicator, which makes sense for replacement/substitutive designs (Williams and Mc Carthy, 2001; Bedoussac and Justes 2011). We chose to simply compare values obtained in intercrop to those of corresponding sole crops. For the two intercrop devices higher aboveground biomass obtained for the intercrops compared to durum wheat in sole crop suggest that on a similar land area mixing durum wheat with legumes does improve resource use for biomass production. This trend was not visible anymore when considering P offtake. Values in intercrop were higher than the legume, although significant for durum wheat L-faba bean suggesting that the presence of durum wheat improved plant performance in intercrop. Contrary to former studies no beneficial effect was observed relative to resource use by the intercrop as a result of net positive effect of interactions, *i.e.* decrease of competition through niche complementarity and/or facilitation. Although such mechanisms may not be totally excluded they did not lead at this growth stage to improved use of resources for plant growth when intercropped.

1.4.6. Effect of P availability on plant-plant interactions, phosphorus use and growth  
Plant-plant interactions were influenced by P fertilization with systematically improved aboveground parameters in most species/crop treatments. The most contrasted values were relative to the two extreme P fertilization regimes (P0 and P4). Critical values for P concentration in plants on a dry weight basis, as reviewed by Reuter and Robinson (1997) for the different species at similar growth stage, were 0.3% of dry weight and between 0.3-0.4% for durum wheat and legumes respectively. Observed P concentration in legumes were systematically below such critical values even for some treatment at the highest P fertilization regime (P4) and for all treatments when intercropped with durum wheat. Those results confirmed the higher P requirements of legumes than cereals for adequate growth as usually reported and shown by Colomb et al. (2007) for former field experiments conducted at the same fertilizer trial. In our experiment the observed prevalence of values below critical ones is another evidence of the highest competitive ability of the cereal over the legumes for P acquisition when intercropped. Contrary to the above-mentioned effects of P fertilization regime on plant growth, durum wheat L did not respond to P fertilization in terms of biomass. This cultivar (LA1823) was less affected than the other one (Acalou) by low P input levels, which is not surprising as long as it has been selected in participatory breeding programme involving farmers practicing organic farming and low fertilizer inputs (*personal communication*).

In our field experiment we were also interested on the effect of P availability on intercrop performances. We assumed that species interactions would depend on P availability as proposed in ecology (Maestre et al., 2009; Le Roux and Mc Geoch, 2010) and observed for N

in intercrops with decreasing beneficial effect of intercropping with increasing N fertilization rates (Hauggaard-Nielsen and Jensen, 2001b; Ghaley et al., 2005; Bedoussac et Justes, 2010). For P, Li et al. (2007) reported higher beneficial effect of intercropped faba bean on the grain yield of maize than intercropped wheat, with a decreasing difference with increasing P fertilization rate. Other field studies tested the effect of P fertilization on plant-plant interactions but results were not clear (Li et al., 1999, 2001, 2003). In our experiment, the influence of P fertilization regime on plant-plant interactions was seldom observed. When considering faba bean, differences in aboveground parameters were only observed for the P1 and P4 fertilization regimes and were significant for P concentration in aboveground biomass and P offtake. Two hypotheses may be proposed to explain this phenomenon: (i) the prevalence of positive interactions in stressful environment as proposed by the “stress gradient hypothesis” or (ii) the prevalence of growth limitation by environmental factor (*i.e.* too low P availability) on species interactions. The performances of the intercrop compared to those of sole crops were generally not influenced by the P fertilization regimes.

### **1.5. Conclusions**

The aim of our study was to test the effect of intercropping on the partitioning of P between the intercropped species. We chose to evaluate such effect on either belowground or aboveground parameters. We used an innovative strategy consisting in sampling the rhizosphere of each species separately when intercropped. This methodology, although common in control condition (*e.g.* pot experiments), had not been conducted in most former field experiments with intercrops. We observed a systematic increase in inorganic P availability in the rhizosphere, as evaluated through Olsen extractions. Those changes were more marked in the rhizosphere of legumes. No clear differences were observed between the rhizosphere in sole crops and intercrops, except for the durum wheat A-pea intercrop. In such case, the concentration of inorganic P in Olsen extracts indicated a positive effect of durum wheat A on the increase of inorganic P availability in the rhizosphere of pea. It may result either from root or microbial activity in the rhizosphere of the two intercropped species, resulting in a change in the quantity or the quality of P mobilizing compounds exuded in the rhizosphere. When considering aboveground parameters relative to plant P acquisition we observed a higher competitive ability of the cereal over the legumes, as already reported for N acquisition. In contrast, we did not observe any improved use of P or more generally any enhanced plant growth relative to sole crops, as usually reported for intercrops. It shall be noted that our results were obtained at the flowering stage of the legumes and heading of durum wheat, not at maturity.

The second objective of our field experiment was to evaluate the effect of soil P availability as determined by different P fertilization regimes on plant-plant interactions. The results were not clear and we were not able to confirm “the stress gradient hypothesis” suggesting higher beneficial effect of intercrops for stressful environment, *i.e.* low availability of P in the present case.

## Acknowledgments

Financial support for the experimental costs was provided by ANR (Agence Nationale de la Recherche) SYSTERRA programme ANR-08-STRA-11 (PerfCom). We thank Charline Guilleré, Émilie Russello and Gérard Souche and for technical assistance. We also thank Philippe Deleporte for statistical advices.

## References

- AFNOR. 1969. Dosage spectrophotométrique de l'anhydride phosphorique: méthode vanadomolybdique. AFNOR Paris:242–246.
- Bagayoko, M., Alvey S., Neumann G., Buerkert A. 2000. Root-induced increases in soil pH and nutrient availability to field-grown cereals and legumes on acid sandy soils of Sudano-Sahelian West Africa. *Plant and Soil* 225:117-127.
- Barber, S. A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. Wiley, New York 384pp.
- Bedoussac, L., Justes E. 2010. Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. *Plant and Soil* 330:37-54.
- Bedoussac, L., Justes E. 2011. A comparison of commonly used indices for evaluating species interactions and intercrop efficiency: Application to durum wheat–winter pea intercrops. *Field Crops Research* 124:25–36.
- Betencourt, E., Duputel M., Colomb B., Desclaux D., Hinsinger P. 2012. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biology and Biochemistry* 46:181-190.
- Callaway, R. M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61:306-349.
- Carpenter, S. R., E. M. Bennett. 2011. Reconsideration of the planetary boundary for phosphorus. *Environmental Research Letters* 6:12.
- Chen, C. R., Condon L. M., Davis M. R., Sherlock R. R. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology and Biochemistry* 34:487-499.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J. M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Cordell, D., Drangert J. O., White S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* 19:292-305.
- Corre-Hellou, G., Crozat Y. 2005. Assessment of root system dynamics of species grown in mixtures under field conditions using herbicide injection and <sup>15</sup>N natural abundance methods: A case study with pea, barley and mustard. *Plant and Soil* 276:177-192
- Corre-Hellou, G., Brisson N., Launay M., Fustec J., Crozat Y. 2007. Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea-barley intercrops given different soil nitrogen supplies. *Field Crops Research* 103:76-85.
- Cu, S.T.T., Hutson J., Schuller K.A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the

- wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.
- Dakora, F. D. Phillips D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245:35-47.
- Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 156:1-20.
- Dawson, C. J. Hilton J. 2011. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36:S14-S22.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gerard F. 2011a. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil* 348:203-218.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Colomb B., Gerard F. 2011b. Fertilization and pH effects on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 75:2980-2996.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- de Wit, C. T., Van Den Bergh J. P. 1965. Competition between herbage plants. *Neth J Agric Sci* 13:212-221
- FAO-UNESCO, 1989. Soil map of the world at 1: 5 000 000, third ed. FAO Press, Paris.
- Fridley, J. D. 2001. The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* 93:514-526.
- Gahoonia, N. E. Nielsen T. S. 1992. The effect of root-induced pH change on the depletion of inorganic and organic phosphorus in the rhizosphere. *Plant and Soil* 143:185-191.
- Geelhoed, J. S., van Riemsdijk W. H., Findenegg G. R. 1999. Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. *European Journal of Soil Science* 50:379-390.
- Ghaley, B. B., Hauggaard-Nielsen H., Høgh-Jensen H., Jensen E. S. 2005. Intercropping of wheat and pea as influenced by nitrogen fertilization. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 73:201-212.
- Harmsen, J. 2007. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36:1420-1428.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus P., Jensen E. S. 2001a. Temporal and spatial distribution of roots and competition for nitrogen in pea-barley intercrops - a field study employing <sup>32</sup>P technique. *Plant and Soil* 236:63-74.
- Hauggaard-Nielsen, H., Jensen E. S. 2001b. Evaluating pea and barley cultivars for complementarity in intercropping at different levels of soil N availability. *Field Crops Research* 72:185-196.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus P., Jensen E. S. 2003. The comparison of nitrogen use and leaching in sole cropped versus intercropped pea and barley. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65:289-300.
- Hauggaard-Nielsen, H. Jensen E. S. 2005. Facilitative root interactions in intercrops. *Plant and Soil* 274:237-250.
- Hauggaard-Nielsen, H., Gooding M., Ambus P., Corre-Hellou G., Crozat Y., Dahlmann C., Dibet A., von Fragstein P., Pristeri A., Monti M., Jensen E. S. 2009. Pea-barley intercropping for efficient symbiotic N<sub>2</sub>-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crops Research* 113:64-71.

- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C. X., Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* 248:43-59.
- Hinsinger, P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168:293-303.
- Hinsinger, P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J. B., Tang X. Y., Zhang F. S. 2011a. P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Hinsinger, P., Brauman A., Devau N., Gerard F., Jourdan C., Laclau J.P., Le Cadre E., Jaillard B., Plassard C. 2011b. Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? *Plant and Soil* 348:29-61.
- Jensen, E. S. 1996. Grain yield, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant and Soil* 182:25-38.
- ISO/DIS. 2006. 17402: Soil quality. Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO, Geneva, Switzerland.
- Johnson, A. H., Frizano J., Vann D. R. 2003. Biogeochemical implications of labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure. *Oecologia* 135:487-499.
- Kimaro, A. A., Timmer V. R., Chamshama S. A. O., Ngaga Y. N., Kimaro D. A. 2009. Competition between maize and pigeonpea in semi-arid Tanzania: Effect on yields and nutrition of crops. *Agriculture Ecosystems and Environment* 134:115-125.
- Lambers, H., Shane M. W., Cramer M. D., Pearse S. J., Veneklaas E. J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98:693-713.
- Leidi, E. O., Rodriguez-Navarro D. N. 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. *New Phytologist* 147:337-346.
- Le Roux, P. C., McGeoch M. A. 2010. Interaction intensity and importance along two stress gradients: adding shape to the stress-gradient hypothesis. *Oecologia* 162:733-745.
- Li, L., Yang S. C., Li X. L., Zhang F. S., Christie P. 1999. Interspecific complementary and competitive interactions between intercropped maize and faba bean. *Plant and Soil* 212:105-114.
- Li, L., Sun J. H., Zhang F. S., Li X. L., Yang S. C., Rengel Z. 2001. Wheat/maize or wheat/soybean strip intercropping I. Yield advantage and interspecific interactions on nutrients. *Field Crops Research* 71:123-137.
- Li, L., Zhang F., Li X., Christie P., Sun J, Yang S., Tang C. 2003. Interspecific facilitation of nutrient uptake by intercropped maize and faba bean. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65:61-71.
- Li, S. M., Li L., Zhang F. S., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297-303.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-

- deficient soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104:11192-11196.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Clairotte M., Drevon J. J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. Plant and Soil 312:139-150.
- Li, Y.-Y., Yu C.B., Cheng X., Li C.J., Sun J.H., Zhang F.S., Lambers H., Li L. 2009. Intercropping alleviates the inhibitory effect of N fertilization on nodulation and symbiotic N<sub>2</sub> fixation of faba bean. Plant and Soil 323:295-308.
- Loreau, M., Hector A. 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. Nature 412:72-76.
- Lynch, J. P. 2007. Roots of the second green revolution. Australian Journal of Botany 55:493-512.
- Maestre, F. T., Callaway R. M., Valladares F., Lortie C. J. 2009. Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. Journal of Ecology 97:199-205.
- Mac Donald, G. K., Bennett E. M., Potter P. A., Ramankutty N. 2011. Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:3086-3091.
- Neumann, G., Romheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant and Soil 211:121-130.
- Nuruzzaman, M., Lambers H., Bolland M. D. A., Veneklaas E. J. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. Plant and Soil 281:109-120.
- Nye, P. H. 1983. The diffusion of 2 interacting solutes in soil. Journal of Soil Science 34:677-691.
- Ofori, F., Stern, W.R., 1987. Cereal-legume intercropping systems. Advance in Agronomy 41: 41-90.
- Ohno, T., Zibilske, L., 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. Soil Science Society of America Journal 55: 892-895.
- Olsen, S.R., Cole C.V., Watanabe W.S., Dean, L. A., 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular 939, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Pearse, S. J., Veneklaas E. J., Cawthray G. R., Bolland M. D. A., Lambers H. 2006. Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. Plant and Soil 288:127-139.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50:665-693.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P.W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. The American Naturalist 171:44-59.
- Rengel, Z., Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. New Phytologist 168:305-312.
- Reuter, J.B., Robinson, D.J., (Eds) 1997. Plant analysis: an interpretation manual, second ed. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia 450pp.

- Richardson, A. E., Lynch J. P., Ryan P. R., Delhaize E., Smith F. A., Smith S. E., Harvey P. R., Ryan M. H., Veneklaas E. J., Lambers H., Oberson A., Culvenor R. A., Simpson R. J. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil* 349:121-156.
- Rose, T.J., Hardiputra B., Rengel Z. 2010. Wheat, canola and grain legume access to soil phosphorus fractions differs in soils with contrasting phosphorus dynamics. *Plant and Soil* 326:159-170.
- Schindler, D. W. 1974. Eutrophication and recovery in experimental lakes: implications for lake management. *Science (New York, N.Y.)* 184:897-899.
- Song, Y. N., Zhang F. S., Marschner P., Fan F. L., Gao H. M., Bao X. G., Sun J. H., Li L. 2007. Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 43:565-574.
- Tang, C., McLay C. D. A., Barton L. 1997. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37:563-570.
- Tang, C., Unkovich M. J., Bowden J. W. 1999. Factors affecting soil acidification under legumes. III. Acid production by N<sub>2</sub>-fixing legumes as influenced by nitrate supply. *New Phytologist* 143:513-521.
- Tilman, D. 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5995-6000.
- Tilman, D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Dobson A., Howarth R., Schindler D., Schlesinger W. H., Simberloff D., Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science* 292:281-284.
- Vance, C. P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiology* 127:390-397.
- Vance, C. P., Uhde-Stone C., Allan D. L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157:423-447.
- Veneklaas, E. J., Stevens J., Cawthray G. R., Turner S., Grigg A. M., Lambers H. 2003. Chickpea and white lupin rhizosphere carboxylates vary with soil properties and enhance phosphorus uptake. *Plant and Soil* 248:187-197.
- Voisin, A. S., Salon C., Munier-Jolain N. G., Ney B. 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 243:31-42.
- Vu, D. T., Tang C., Armstrong R. D. 2008. Changes and availability of P fractions following 65 years of P application to a calcareous soil in a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 304:21-33.
- Wang, D., Marschner P., Solaiman Z., Rengel Z. 2007. Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology and Biochemistry* 39:249-256.
- Wang, Y., Marschner P., Zhang F. 2012. Phosphorus pools and other soil properties in the rhizosphere of wheat and legumes growing in three soils in monoculture or as a mixture of wheat and legume. *Plant and Soil* 354:283-298.

- Willey, R., 1979. Intercropping-its importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstracts* 32: 1-10.
- Williams, A.C., Mc Carthy B.C. 2001. A new index of interspecific competition for replacement and additive designs. *Ecological Research* 16:29–40.
- Yadav, R. S., Tarafdar J. C. 2001. Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biology and Fertility of Soils* 34: 140–143.
- Zhang, F. C., Kang S. Z., Zhang J. H., Zhang R. D., Li F. S.. 2004. Nitrogen fertilization on uptake of soil inorganic phosphorus fractions in the wheat root zone. *Soil Science Society of America Journal* 68:1890-1895.



Appendix. Supplementary data

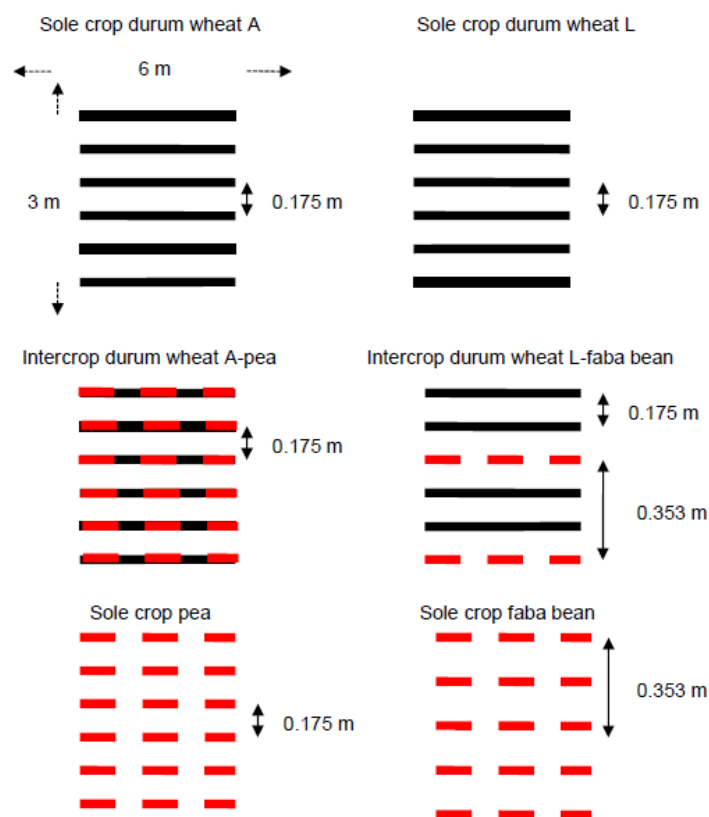


Figure 3.A.1. Spatial arrangement of species in sole crop and in intercrop. Lines indicates rows.

Table 3.A.1. Sown density and final ones for sampling for durum wheat A and pea (a) and durum wheat L and faba bean (b) in different cropping treatments (sole crop vs intercrop). Values represent the means  $\pm$  SE (standard errors).

a)	Durum wheat A		Pea	
	Sole crop	Intercrop	Sole crop	Intercrop
<b>Density (plant m<sup>-2</sup>)</b>				
Sown	400	250	100	75
Final	191 $\pm$ 20	116 $\pm$ 9	61 $\pm$ 9	52 $\pm$ 5

b)	Durum wheat L		Faba bean	
	Sole crop	Intercrop	Sole crop	Intercrop
<b>Density (plant m<sup>-2</sup>)</b>				
Sown	400	250	35	15
Final	146 $\pm$ 13	129 $\pm$ 11	28 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1

## II. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil

Elodie Betencourt <sup>a, b</sup>, Marek Duputel <sup>a, b</sup>, Bruno Colomb <sup>c</sup>, Dominique Desclaux <sup>d</sup>, Philippe Hinsinger <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>b</sup> Montpellier SupAgro, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>c</sup> INRA, UMR 1248 AGIR (INRA-ENSAT), 31326 Castanet Tolosan, France

<sup>d</sup> INRA, UE DiaScope, Domaine de Megueil, 34130 Mauguio, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 49; fax: +33 4 99 61 30 88.

E-mail address: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr (P. Hinsinger).

### Abstract

Cereale-legume intercropping can promote plant growth (*i.e.* facilitation) through an increase in the amount of phosphorus (P) taken up, especially in low P soils. The aim of this study was to test the hypothesis that these positive interactions are supported by rhizosphere processes that increase P availability, such as root-induced pH changes. In neutral and alkaline soils legumes are assumed to increase inorganic P availability by rhizosphere acidification due to N<sub>2</sub> fixation which benefit to the intercropped cereal. Growth, P uptake, changes in inorganic P availability and pH in the rhizosphere of intercropped species were thus investigated in a greenhouse pot experiment with durum wheat and chickpea either grown alone or intercropped. We used a neutral soil from a P fertilizer long-term field trial exhibiting either low (-P) or high (+P) P availability. Phosphorus availability was increased in the rhizosphere of both species, especially when intercropped in -P. Such increase was associated with alkalization. Rhizosphere pH changes could not fully explain the observed changes of P availability though. Low rates of N<sub>2</sub> fixation may explain why no rhizosphere acidification was observed. Increases in P availability did not lead to enhanced P uptake but growth promotion was observed for durum wheat intercropped with chickpea in -P soil. Our hypothesis of an increase in inorganic P availability in intercropping as a consequence of root-induced acidification by the legume was not validated, and we suggested that root-induced alkalization was involved instead, as well as other root-induced processes. Thus, the cereal through rhizosphere alkalization may also enhance P uptake and growth of the intercropped legume. Facilitation can thus occur in both ways.

Keywords: Facilitation, Intercropping, Rhizosphere, P availability, Soil pH, Alkalization

## II.1. Introduction

Phosphorus (P) is a major nutrient limiting plant growth in many soils (Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001). Since the sixties the main practice to overcome such limitation and sustain high yielding agroecosystems has been the use of fertilizers. Mined phosphate rocks that are used for manufacturing fertilizer P are however a finite resource (Cordell et al., 2009; Dawson and Hilton, 2011). Therefore further increasing the use of fertilizer P to improve agricultural production in a context of increasing world food demand is no longer an option (Vance, 2001; Hinsinger et al., 2011a). New options are needed to better exploit soil P resources through either the selection of efficient cultivars or alternative strategies of management of agroecosystems to optimize P bioavailability (Vance, 2001; Lambers et al., 2006).

Phosphorus bioavailability in a soil is best defined as the amount or flux of P taken up by biota, over a given time period, according to the definition provided by ISO (see Harmsen, 2007; ISO/DIS, 2006). It largely depends on P availability, which stands for that particular fraction of soil P to which biota can potentially access. This definition points out that for each living organism, a bio-influenced zone occurs in its surroundings, where the availability can be significantly altered by the organism's physiology, which explains that bioavailability can vary amongst different species (Harmsen, 2007). In the particular case of plants, this bio-influenced zone corresponds to the rhizosphere, and plant species have evolved different strategies to increase P availability in their rhizosphere (Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003; Rengel and Marschner, 2005): (i) changes in root system architecture, geometry (*e.g.* root hairs) and morphology (*e.g.* cluster roots), which ultimately increase the size of the rhizosphere, (ii) exudation of P-mobilizing compounds and (iii) association with microorganisms, either symbiotic (mycorrhizal fungi) or not. Those P-mobilizing compounds that can dramatically alter soil P availability in the rhizosphere are protons/hydroxyls ( $H^+/OH^-$ ), carboxylates and extracellular phosphatase-like enzymes (Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001; Vance et al., 2003). Making better use of such a functional diversity amongst plant species or genotypes is definitely the way forward (Rengel and Marschner, 2005; Hinsinger et al., 2011a, 2011b).

Improved acquisition of resources has been repeatedly observed in intercropping systems, which consist of growing two or more species simultaneously in the same field, relative to conventional systems based on single-species stands, thereafter called sole cropping (Willey, 1979; Ofori and Stern, 1987). Introduction of species diversity in agroecosystems is designed to make use of positive interactions between plants (*i.e.* complementarity and facilitation), which are supposedly enhanced with increasing environmental stress (Brooker et al., 2005). Complementarity may be defined as a decrease in competition through resource partitioning between intercropped species. It applies when resource acquisition differs either in time, in space or in the chemical form that is taken up (Fridley, 2001). Facilitation stands for positive interaction by which one species increases the growth, reproduction and/or survival of the intercropped species through facilitative

mechanisms altering the biotic/abiotic environment, ultimately resulting in increased resource availability (Callaway, 1995).

While improved acquisition of N has been mostly documented in cereal-legume intercrops, compared to sole crops, only a few recent studies have evidenced similar effects for P (Li et al., 2007; Hinsinger et al., 2011a). Complementarity and facilitation in intercropped species may imply several rhizosphere mechanisms, as reviewed by Hinsinger et al. (2011a). Most of the former studies on cereal legume intercrops implicitly assume that the legume enhances P acquisition by the cereal because of legumes' ability to exude large amounts of P-mobilizing compounds that ultimately increase P availability, *e.g.* (i) protons due to N<sub>2</sub> fixation (Tang et al., 1997; Hinsinger et al., 2003), (ii) carboxylates (Neumann and Römheld, 1999; Veneklaas et al., 2003; Pearse et al., 2006;) and (iii) phosphatases (Nuruzzaman et al., 2006). Amongst these, the activity of phosphatases and the diversity of bacterial communities susceptible to hydrolyze organic P in the rhizosphere of intercropped species have been the most documented (Li et al., 2004; Song et al., 2007a; Wang et al., 2007). Although pH is considered as a critical parameter determining P availability (Hinsinger, 2001), its potential role in intercrops has been little studied so far. Changes in pH in the rhizosphere are essentially mediated by the exudation of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> by roots, which are driven by nitrogen nutrition through cation-anion balance (Hinsinger et al., 2003). In cereal-legume intercrops acidification of the rhizosphere is expected to occur due to proton release by roots of N<sub>2</sub>-fixing legumes (Cu et al., 2005; Li et al., 2008). But these authors did not distinguish the rhizosphere of the two intercropped species, which would help understanding the respective effects of each species. Indeed the intercropped cereal may also influence positively rhizosphere P availability by root-induced pH change via rhizosphere alkalization (Devau et al., 2010, 2011b) and, hence facilitate P acquisition of the intercropped legume.

The aim of this study was two-fold. First, we evaluated the effect of intercropping on P availability and bioavailability in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). We assumed that the main process impacting P availability in the rhizosphere was the root-induced pH change by either durum wheat or chickpea, assuming alkalization and acidification would occur, respectively. Second, we tested whether the initial soil P availability influenced such interactions between the two intercropped species. According to the stress-gradient hypothesis (Bertness and Callaway, 1994), we assumed that facilitation would be greater under low P conditions (*i.e.* higher stress).

## II.2. Materials and methods

### II.2.1. Experimental set-up

A pot experiment was conducted in a greenhouse using a factorial design with two contrasted soil P treatments and three crop treatments, plus unplanted control. The first crop treatment corresponded to the intercrop where the two species were grown together and the other crop treatments corresponded to sole crops where each species was grown

separately. A substitutive design was used to keep the total density of plants constant in each crop treatment (de Wit, 1960; Gibson et al., 1999). Densities were chosen according to agricultural practices. Pots were arranged in a completely randomized design with five replicates, and were randomized every third day during the experiment.

### II.2.2. Soil properties

The soil was taken from the top 10-cm of a long-term P fertilizer field trial located at the INRA Research center of Auzeville (SW France 43°31' N, 1°30' E) and sieved to 5 mm. The soil is classified as a Luvisol (FAO-UNESCO, 1989) with a loam to clay-loam texture. The field trial comprised four P regimes arranged in four randomized blocks along a CaCO<sub>3</sub> gradient (Colomb et al., 2007). The soil samples used for the experiment were collected 40 years after the start of the experiment in the non-calcareous part of the field, and from the two extreme fertilization regimes showing highly contrasted P availabilities. The low P soil (P0) hereafter called -P treatment had not received any P application for 40 years and thus exhibited a low P availability, which consistently proved limiting for crop growth, including for P-efficient species such as durum wheat (Colomb et al., 2007). The high P soil (P4) hereafter referred to as +P treatment, received annual P fertilization rates that were far above the P offtake in crops for 40 years, thus resulting in high, non-limiting P availability. Soil properties were detailed by Colomb et al. (2007) and Devau et al. (2011a). The main soil properties of -P soils as determined by the routine soil testing laboratory of Cirad (US49) in Montpellier are the following: pH<sub>H2O</sub> = 7.28, organic C = 7.4 g kg<sup>-1</sup> (heat-loss at 1000°C), total P = 373 mg kg<sup>-1</sup> (fluorhydric and perchloric digestion method), extractable P determined with Olsen method = 5.4 mg kg<sup>-1</sup> (sodium bicarbonate method), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 19 mg kg<sup>-1</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.51 mg kg<sup>-1</sup> (KCl extract), Ca (cobalthexamine chloride method) amounted to 85% of the cation exchange capacity of the soil (the remainder being made of 8% Mg, 3% K and traces of Na). The +P soil presented much higher total P (593 mg kg<sup>-1</sup>) and extractable Olsen-P (30.4 mg kg<sup>-1</sup>), while other properties were close to those of the -P soil: pH<sub>H2O</sub> = 7.54, organic C = 8.9 g kg<sup>-1</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 20 mg kg<sup>-1</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.56 mg kg<sup>-1</sup> and similar cation exchange properties.

### II.2.3. Plant growth

Free-draining pots (0.2 m diameter, 0.15 m depth) were filled with 4 kg of air-dried soil and moistened to 70% field capacity as measured by weight. Nitrogen was added as urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) with water at sowing and pipetted onto the surface 8 weeks after sowing at the rates of 19 mg kg<sup>-1</sup> and 11 mg kg<sup>-1</sup> respectively. Form and amount of N were determined to avoid N<sub>2</sub> fixation inhibition by nitrate and considering field practices which would make sense in the context of low input agroecosystems. No other basal nutrients were added based on soil analyses and previous experiments on crop yield related to the long-term P fertilizer trial (Colomb et al., 2007), and also to be in line with the conditions of low input agroecosystems.

Seeds of durum wheat (*Triticum aestivum durum* L. cv. LA1823) and chickpea (*C. arietinum* L. cv. ILC 5566 (Elmo)) were germinated on filter paper in contact with deionized water during 3 days. In the sole crop treatment 16 germinated seeds of durum wheat or chickpea were planted per pot and thinned to 8 after emergence. In the intercrop treatment 12 germinated durum wheat seeds and 4 germinated seeds of chickpea were planted per pots and thinned to 6 and 2 respectively. In the intercrop treatment chickpea seeds were sown in the middle of the pots and surrounded by durum wheat seeds. The experiment was conducted in February-April 2010 in a glasshouse with a 16h photoperiod of natural light supplemented with mercury vapor lights. Temperatures over the duration of the experiment ranged from a minimum of 3°C at night to a maximum of 25°C during the day. Pots were watered every third day to maintain 70% of field capacity.

Plants were harvested 78 days after sowing (DAS) when ears were totally emerged for durum wheat and at the beginning of flowering for chickpea.

#### II.2.4. Soil/rhizosphere sampling and measurements

Preliminary tests were conducted to determine the adequate soil moisture for sampling the rhizosphere (50% of field capacity). Rhizosphere is defined as the volume of soil surrounding living roots that is affected by root activity (Darrah, 1993; Hinsinger, 1998). In our case rhizosphere was operationally defined as the soil volume extending to approximately 1 mm from the root surface, which is equivalent to the usual size of P depletion zones (Hinsinger, 2001). After extracting manually whole plants with their roots from the soil, the rhizosphere, *i.e.* the <1-mm aggregates of soil adhering to roots was gently brushed off with a paintbrush. For each pot, the rhizospheres of all plants of each species were combined in a single sample. Our sampling strategy enabled us to compare the rhizosphere of each species grown either as sole crop or intercropped. Soil from unplanted control treatment was also sampled and considered as bulk soil.

Rhizosphere and bulk soil samples were ground to <200  $\mu$ m and oven-dried at 50°C for 3 days. Soil P availability was determined by water extraction and NaHCO<sub>3</sub> extraction according to Olsen method (Olsen et al., 1954). These two fractions, thereafter called water-P and Olsen-P for simplicity, are often used as indicators of available P over the course of crop growth (Johnson et al., 2003). Considering the low quantity of rhizospheric soil obtained (with a minimum of 500 mg) subsamples of 100 mg for rhizosphere and bulk soils were used for extractions. For water-P soil was shaken with ultrapure water during 15 min, then centrifuged at 25,000 g for 10 min. For Olsen-P soil was shaken with NaHCO<sub>3</sub> solution (0.5 M pH = 8.5) for 30 min, then centrifuged at 25,000 g for 10 min. Olsen-P extracts were then acidified with concentrated HCl to precipitate organic matter. Phosphorus concentrations in the extract solutions were measured with the malachite green method (Ohno and Zibilske, 1991).

Soil pH was determined in the water extracts with a Metrohm-744 pH meter with a combined glass electrode.

### II.2.5. Plant sampling and measurements

Shoots and roots from all plants per pots were separated from the soil and combined. Roots of species were intermingled but soil humidity was chosen to facilitate their separation. In the intercrop treatment species were dissociated in two distinct samples, *i.e.* one per species. Roots were washed with deionized water to eliminate strongly adhering soil particles. Shoots and roots were oven-dried at 70°C for 3 days and weighed for dry biomass determination. Shoots and roots were then ground (MM 2000, Retsch) and subsamples were digested in a microwave oven (ETHOS, Milestone) with concentrated HNO<sub>3</sub> (65%) at 180°C and 2 MPa. Phosphorus content was determined using the vanado-molybdate method (AFNOR, 1969).

Nitrogen fixation in chickpea was determined with the <sup>15</sup>N natural abundance method. Subsamples of oven-dried shoots of chickpea and durum wheat were analyzed for N and <sup>15</sup>N concentrations with a Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (Isoprime Ltd., Manchester, England) coupled to an Elemental Analyzer.

### II.2.6. Calculations

Plant P uptake and N uptake corresponded to the amount of nutrients taken up by plants during plant growth and were calculated as follows:

**P uptake (mg)** = [P concentration in shoot (mg g<sup>-1</sup>) x shoot dry weight (g)] + [P concentration in root (mg g<sup>-1</sup>) x root dry weight (g)] - seed P content (mg)

Seed P content was calculated as the mean value for 100 seeds: for durum wheat seed P content = 0.29 mg, for chickpea seed P content = 1.11 mg. The same formula was applied for N, with durum wheat seed N content = 1.18 mg and chickpea seed N content = 9.23 mg.

Percentage of N derived from the atmosphere (%Ndfa) was calculated for chickpea as sole crop and chickpea intercropped based on the following formula (Shearer and Kohl, 1986):

$$\%Ndfa = 100 \times (\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{chickpea}) / (\delta^{15}N_{ref} - \beta)$$

$\delta^{15}N_{ref}$  was used as the reference, non-fixing plant. The  $\beta$  value (+1.65‰) was taken from the mean value of data reviewed by López-Bellido et al. (2010).

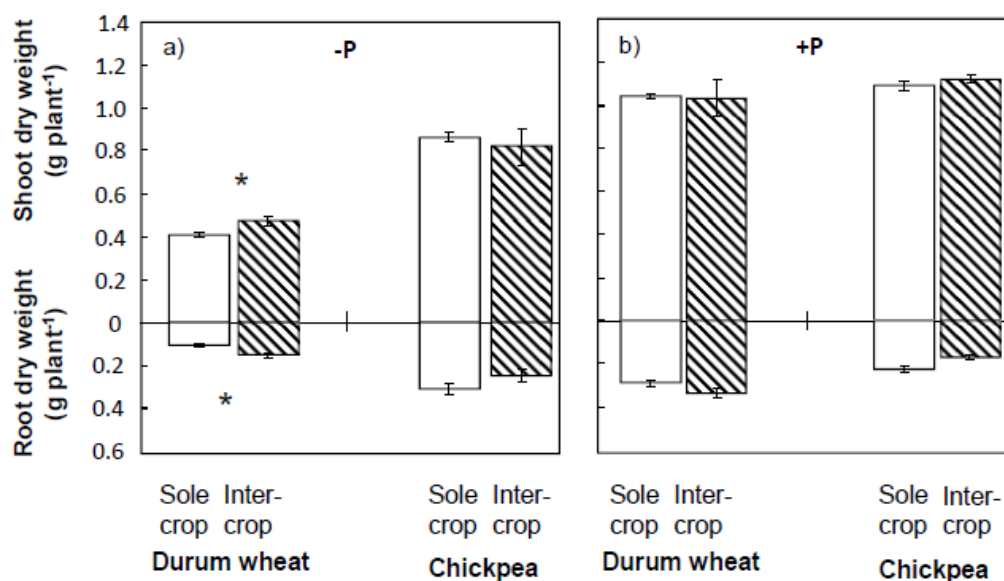
### II.2.7. Statistical analyses

Effect of crop treatment on plant dry weight and %Ndfa was tested using one-way analyses of variance (ANOVA) with crop treatment as factor with the probability level of 0.05. One-way analyses of variance with crop treatment as factor were conducted on soil data for P availability and pH at a given soil P treatment. Data for P availabilities were log-transformed before the analyses to meet the assumption of the test. Two-ways analyses of variance considering soil P treatment x crop treatment were performed on P concentration, N concentration in plants, N uptake and P uptake. Data were squared-root transformed before the analyses to meet the assumption. Significant difference between means was separated by Tukey's multiple comparison tests at the 0.05 probability level. The 2.10.1 version of R software (R development Core Team 2009) was used for statistics.

## II.3. Results

### II.3.1. Plant growth

Figure 3.4 shows the effect of intercropping on root and shoot biomass of durum wheat and chickpea for the two P treatments. At -P, both durum wheat shoot and root biomass were significantly increased (by 17 and 50%, respectively) when intercropped with chickpea. For chickpea no significant change was found. At +P, the shoot and root biomass of durum wheat were not significantly affected by intercropping, while for chickpea, only root biomass was affected. Intercropping resulted in this case in a significant decrease in root biomass of chickpea (by 26%).



**Figure 3.4.** Dry weight of shoot and root for durum wheat and chickpea in different treatments (a) for low P soil (-P) and (b) for high P soil (+P). Values are the mean of 5 replicates. Bars indicate standard errors. Within a species, stars indicate significant difference between treatments (intercrop vs sole crop) \* ( $P < 0.05$ ).

Phosphorus concentration in shoots and roots, and P uptake for durum wheat and chickpea are reported in Table 3.6, while N data are reported in Table 3.7. Results of the two-way ANOVA were also indicated considering soil P treatment x crop treatment. For P data of the two species the soil P treatment had a significant effect with an increase in +P except for root P concentration of the two species. Intercropping had no significant effect on P concentration in shoots and roots of the two species. It had no significant effect either on P uptake. For durum wheat we observed a significant interaction between soil P treatment and crop treatment for P concentration in shoots with an increase of 65% in +P only for the intercropped treatment.



**Table 3.6.** Phosphorus concentration in shoots and roots and P taken up by whole plants for wheat and chickpea in different treatments. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). Values of probability of two-way ANOVA (P treatment x Crop treatment). Within a column different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ).

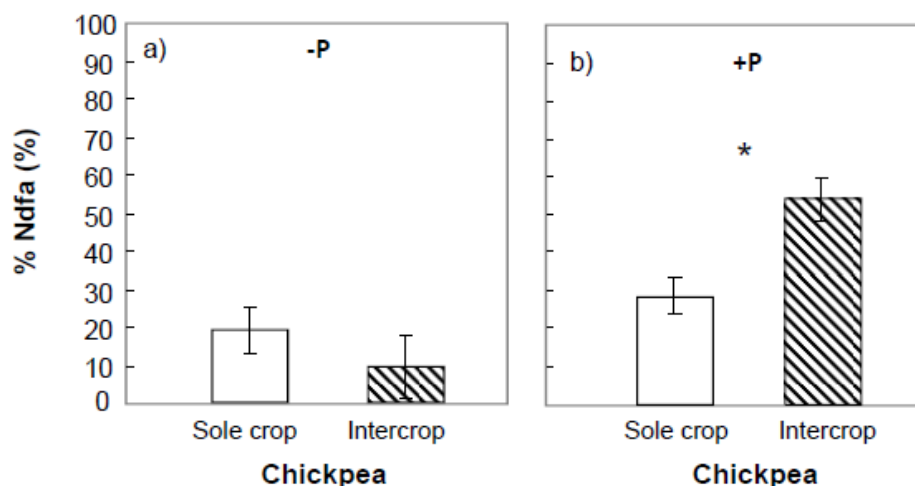
P treatment	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	P uptake (mg plant <sup>-1</sup> )	Shoot P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	P uptake (mg plant <sup>-1</sup> )
-P	Sole crop	1.5 $\pm$ 0.1 c	1.9 $\pm$ 0.5 a	0.5 $\pm$ 0.1 b	1.1 $\pm$ 0.1 b	1.6 $\pm$ 0.4 a	0.3 $\pm$ 0.1 b
	Intercrop	1.2 $\pm$ 0.1 bc	1.9 $\pm$ 0.4 a	0.6 $\pm$ 0.1 b	1.1 $\pm$ 0.1 b	1.5 $\pm$ 0.5 a	0.2 $\pm$ 0.1 b
+P	Sole crop	1.7 $\pm$ 0.1 ab	1.8 $\pm$ 0.4 a	2.1 $\pm$ 0.2 a	1.8 $\pm$ 0.1 a	1.5 $\pm$ 0.3 a	1.2 $\pm$ 0.1 a
	Intercrop	2.0 $\pm$ 0.1 a	1.8 $\pm$ 0.4 a	2.3 $\pm$ 0.2 a	1.9 $\pm$ 0.1 a	1.9 $\pm$ 0.5 a	1.4 $\pm$ 0.2 a
		Shoot P concentration <i>P</i> values	Root P concentration <i>P</i> values	P-uptake <i>P</i> values	Shoot P concentration <i>P</i> values	Root P concentration <i>P</i> values	P-uptake <i>P</i> values
P treatment		<0.001	0.86	<0.001	<0.001	0.68	<0.001
Crop treatment		0.66	0.99	0.42	0.26	0.83	0.80
P treatment x Crop treatment	Crop	0.03	0.98	0.70	0.41	0.63	0.54

For N concentration in the two species, soil P treatment had a significant effect in durum wheat shoots and chickpea roots. Shoot N concentration decreased in +P while the amount of N taken up by plants increased. As for P, for the two species, intercropping had no significant effect on N concentrations in shoots and roots or on N uptake. For durum wheat we observed significant interactions between the two treatments for N concentration in shoots and N uptake. In -P, N concentration in shoots decreased by 19% for durum wheat intercropped with chickpea, while it increased by 6% in +P. In +P, N uptake increased by 22% when durum wheat was intercropped with chickpea. The same was observed for chickpea intercropped with durum wheat with 19% increase of N uptake.

**Table 3.7.** Nitrogen concentration in shoots and roots and P taken up by whole plants for durum wheat and chickpea in different treatments. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). Values of probability of two-way ANOVA (P treatment x Crop treatment). Within a column different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ).

P treatment	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot N concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root N concentration (mg g <sup>-1</sup> )	N uptake (mg plant <sup>-1</sup> )	Shoot N concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root N concentration (mg g <sup>-1</sup> )	N uptake (mg plant <sup>-1</sup> )
-P	Sole crop	24.0 $\pm$ 1.0 a	13.8 $\pm$ 0.5 a	10.0 $\pm$ 0.3 c	19.4 $\pm$ 0.7 a	17.8 $\pm$ 0.6 a	13.0 $\pm$ 1.1 b
	Intercrop	20.2 $\pm$ 0.5 b	10.6 $\pm$ 0.6 a	9.9 $\pm$ 0.5 c	17.4 $\pm$ 0.6 b	16.2 $\pm$ 0.4 a	10.0 $\pm$ 1.7 b
+P	Sole crop	12.9 $\pm$ 0.6 d	5.7 $\pm$ 0.9 a	13.9 $\pm$ 0.8 b	17.6 $\pm$ 0.7 ab	22.4 $\pm$ 0.6 a	14.4 $\pm$ 1.9 a
	Intercrop	13.6 $\pm$ 0.4 c	9.6 $\pm$ 1.7 a	16.9 $\pm$ 1.0 a	18.9 $\pm$ 0.9 a	23.0 $\pm$ 2.0 a	17.2 $\pm$ 1.5 a
		Shoot N concentration <i>P</i> values	Root N concentration <i>P</i> values	N-uptake <i>P</i> values	Shoot N concentration <i>P</i> values	Root N concentration <i>P</i> values	N-uptake <i>P</i> values
P treatment		<0.001	0.087	<0.001	0.088	0.003	<0.001
Crop treatment		0.94	0.49	<0.001	0.49	0.28	0.58
P treatment x Crop treatment	Crop	<0.001	0.17	0.015	0.001	0.06	0.08

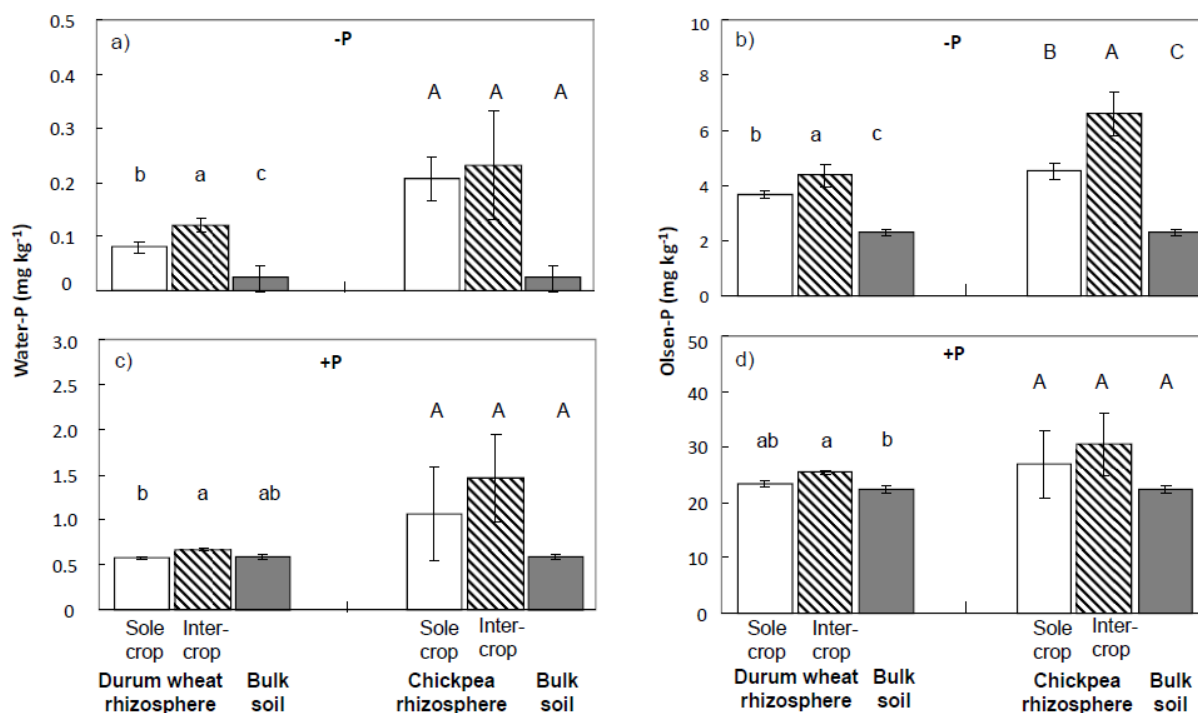
Figure 3.5 shows the percentage of N derived from air (%Ndfa) for chickpea as affected by intercropping with durum wheat in both P treatments. At -P, %Ndfa was less than 14% and considerably varied, standard errors being close to mean values (Fig. 3.5a). At +P, N<sub>2</sub> fixation of chickpea intercropped with durum wheat was twice larger than when grown as sole crop, reaching 53%. This difference was significant.



**Figure 3.5.** Percentage of Nitrogen derived from air (%Ndfa) for chickpea in different treatments for (a) low P treatment (-P) and (b) high P treatment (+P). Values are the mean of 5 replicates. Bars indicate standard errors. The star indicates a significant difference between treatments (intercrop vs sole crop) at  $P < 0.05$ .

### II.3.2. Rhizosphere P availability

Figure 3.6 shows P concentration measured in water and Olsen extracts in the control soil without plant (*i.e.* bulk soil) and in the rhizosphere of durum wheat and chickpea grown as intercrops or sole crops for the two P treatments. The displayed bulk soil values for each P treatment are identical for each species as they were measured in unplanted pots. At -P a large increase of water-P was systematically measured in the rhizosphere compared to bulk soil irrespective of crop treatment, but this was significant only for durum wheat. This increase was slightly larger when durum wheat was intercropped, 5-fold to compare with 3-fold. Water-P increased by 9.5- and 10.5-fold in the rhizosphere of chickpea when grown as sole crop and intercropped respectively, but this difference was not significant due to high standard errors (Fig. 3.6a). In the case of Olsen-P extracts, a similar pattern was found, with a systematic and significant increase in P concentration in the rhizosphere of durum wheat and chickpea. This substantial increase in Olsen-P concentration in the rhizosphere was significantly greater in intercropped plants for both species. Durum wheat increased its rhizosphere Olsen-P concentration by +60% (relative to bulk soil) when grown as sole crop, and by +90% when intercropped. For chickpea this increase amounted to +96% and +186%, respectively. In water and Olsen extracts similar trends were observed but much less pronounced and seldom significant in the +P treatment compared to -P treatment. In most cases, the P concentrations measured in the rhizosphere were increased compared to bulk soil and even more so in the rhizosphere of intercropped species (Fig. 3.6c and d).



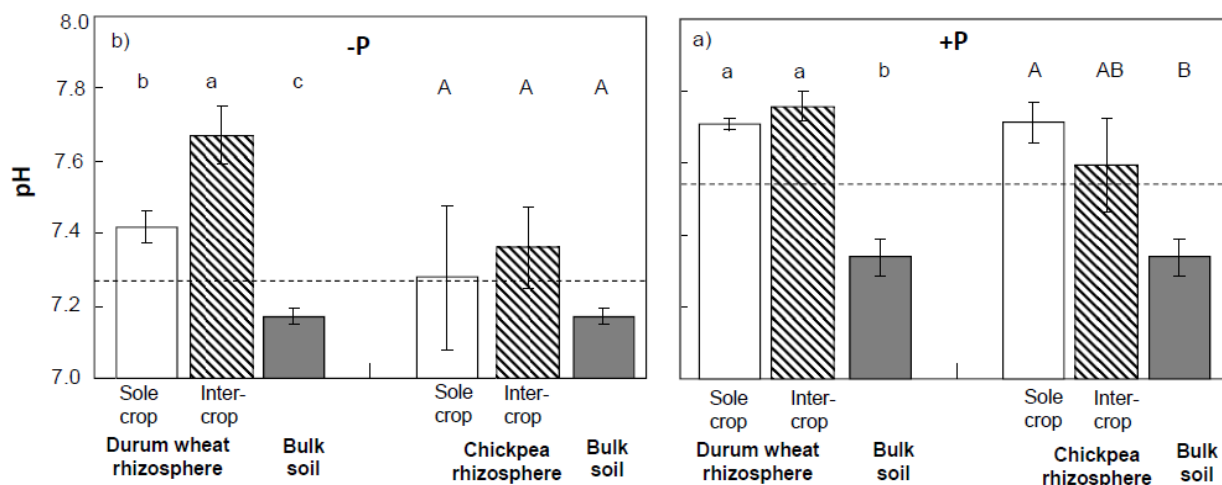
**Figure 3.6.** Phosphorus concentration in the rhizosphere of durum wheat and chickpea in different 646 treatments for low P soil in water extracts (a) and in Olsen extracts (b); for high P soil in water extracts (c) and in Olsen extracts (d). Values were compared to bulk soil corresponding to soil control without plant. Bulk soil was the same for both species within each P treatment. Values are the mean of 5 replicates. Bars indicate standard errors. Different letters within a species indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

The small amount of soil sampled in the rhizosphere, and thereafter used for extractions (100 mg per subsample) may explain the large variability of the results, which restricted the detection of significant differences. However, the variability was much greater for chickpea, which suggests that the sampling issue was not strictly a matter of small size of the sample.

### II.3.3. Rhizosphere pH

Figure 3.7 shows the pH values measured in the bulk soil and in the rhizosphere of both species grown either as sole crop or intercropped for the two P treatments. The displayed bulk soil values for each P treatment are identical for the two species as they were measured in unplanted pots. At -P, durum wheat significantly increased its rhizosphere pH when grown as sole crop (+0.25 units) and intercropped with chickpea (+0.50 units), compared to bulk soil pH. The increase was almost twice as large when intercropped but the difference was not significant. In the case of chickpea no significant change was observed in the rhizosphere compared to bulk soil due to the large variability. At +P, durum wheat increased its rhizosphere pH when grown as sole crop and intercropped with chickpea compared to bulk soil pH. In this case, such rhizosphere alkalization was not significantly enhanced when intercropped with chickpea, in spite of a small difference. Chickpea as sole crop increased its rhizosphere pH by +0.37 unit, *i.e.* as much as for durum wheat (Fig. 3.7). The rhizosphere pH

of chickpea intercropped with wheat (7.59) was intermediate to that measured in sole crop (7.71) and in the bulk soil (7.34), but was not significantly different from either of these.



**Figure 3.7.** Values of pH in the rhizosphere of durum wheat and chickpea in different treatments for low P soil (a); and high P soil (b). Values were compared to bulk soil corresponding to control soil without plant. Bulk soil was the same for both species within each P treatment. Values are the mean of 5 replicates. Bars indicate standard errors. Different letters within a species indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

## II.4. Discussion

### II.4.1. Increased P availability in the rhizosphere

Increased P concentration in water extracts (water-P) was systematically observed in the rhizosphere for most of the treatments, although significant only at -P, and was further confirmed for inorganic P in Olsen extracts (Olsen-P), compared to bulk soil. These results contradict the common knowledge, which assumes that depletion of inorganic P occurs in the rhizosphere as a consequence of root uptake combined with restricted diffusion of phosphate ions (Barber, 1995; Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2011b). Only a few previous works have reported an increase in P availability in the rhizosphere for either inorganic P (see review by Hinsinger, 2001; Devau et al., 2010, 2011b) or organic P (Chen et al., 2002; Li et al., 2008; Vu et al., 2008). For inorganic P, this has been so far reported only in rhizobox experiments. Those previous experiments which measured the gradient of P in the rhizosphere showed that P depletion occurred in the immediate vicinity of root surface due to P uptake, while P accumulation occurred farther away (Hübel and Beck, 1993; Hinsinger and Gilkes, 1996). This was successfully modeled by Geelhoed et al. (1999) when accounting for the exudation of a P-mobilizing compound such as citrate, while Nye (1983) had shown similar results with a more empirical model of the interaction between solutes in the rhizosphere (*e.g.* phosphate ions and protons). Mechanistic modeling clearly shows that if roots only take up P, depletion of soil solution P and the most readily available fractions of soil P shall occur in the rhizosphere, while an increase of such pools clearly demonstrates the co-occurrence of another rhizosphere process, which is responsible for counteracting the uptake-driven depletion (Geelhoed et al., 1999; Devau et al., 2010, 2011b).

In our experiment at -P, P availability systematically increased in the rhizosphere of the two species, either grown as sole crops or as intercrop. Our results on durum wheat are in line with those of Devau et al. (2011b) who used a different cultivar grown as sole crop in a rhizobox with the same soil fertilization treatments and measured P concentration in water extracts. We additionally showed that Olsen-P consistently increased in the rhizosphere, showing even more significant effects than those observed for water-extractable P. Our work, which was conducted in a pot experiment and based on sampling the soil strongly adhering to roots demonstrates that the increase of rhizosphere P availability reported by Devau et al. (2011b) was not biased by the artificial setting of their rhizobox approach. As for Devau et al. (2011b), we reported a greater rhizosphere effect (increase of P availability) at -P than +P conditions, the latter being hardly significant in the present experiment. The added value of our work is to show the effect of intercropping. The increase in P availability was indeed more pronounced in the rhizosphere of both durum wheat and chickpea when intercropped (Fig. 3). Enhanced P availability has been seldom reported in the rhizosphere of intercropped species, e.g. by Cu et al. (2005), who did not distinguish the rhizospheres of the two intercropped species. They reported intermediate concentrations of P for water- and citric acid-extractable fractions in the rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) intercrop compared with those in the rhizospheres of the sole crops. With a rhizobox experiment, Li et al. (2008) also reported intermediate values in the rhizosphere of durum wheat and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) when intercropped, for different P fractions including NaHCO<sub>3</sub>-extractable inorganic P from sequential extraction, which is close to our Olsen-P extractable fraction. However in contrast with the present experiment, they reported a depletion of this P fraction in the rhizosphere. They also showed an increase in the organic pool of P in the NaHCO<sub>3</sub> extract for the rhizosphere of common bean, which contrasted with the large depletion observed for durum wheat, and smaller depletion found when intercropped. Their rhizobox setting made it impossible to compare the rhizosphere of each species when intercropped. In contrast with all those previous studies, separating the roots of the two intercropped species in the pots we used was made possible by our sampling strategy. This approach proved successful to evidence a significantly larger increase in P availability, as assessed by Olsen extraction, in the rhizosphere of either durum wheat or chickpea when intercropped. In contrast with the previous findings of Cu et al. (2005) and Li et al. (2008), the available P values found in the rhizosphere of intercropped species were not somewhere in between those found in the rhizospheres of the two species grown as sole crops (Fig. 3.6). This suggests that intercropping altered the chemical properties of the rhizosphere of the two species either directly through root-induced processes and/or indirectly through microbial activities.

In our experiment, P availability systematically increased in the rhizosphere of the two species, either grown as sole crops or as intercrop, but this was significant only for low P soil conditions (-P), and was enhanced by intercropping. Our hypothesis of a positive effect of intercropping was thus confirmed for water-P and Olsen-P in the rhizosphere of durum

wheat and chickpea. In addition, we showed that facilitative mechanisms of P acquisition were promoted at low P availability, which is in line with the stress-gradient hypothesis.

#### II.4.2. Changes in pH in the rhizosphere

No acidification was observed in the rhizosphere of chickpea either in sole crop or intercropped with durum wheat, which contrasts with what is usually expected for legumes (Hinsinger et al., 2003), and with the former results of Li et al. (2008) for common bean. Root-induced pH changes are mainly influenced by  $H^+/OH^+$  exudation depending on cation-anion balance, which is largely driven by nitrogen nutrition (Hinsinger et al., 2003). In the particular case of legumes, acidification is expected to occur when fixing  $N_2$ , the amount of proton released by legumes depending on the intensity of  $N_2$  fixation (Tang et al., 1999, 2004). Our results are in agreement with those of Rose et al. (2010) who reported no changes in rhizosphere pH for non-nodulated chickpea and faba bean (*Vicia faba* L.) grown in neutral soils and fed with  $NH_4NO_3$  as N source. In our experiment, the percentages of N derived from  $N_2$  fixation were very low, and even more so at -P, except when chickpea was intercropped with durum wheat at +P (Fig. 3.5), in spite of small rates of urea application. The rather low P availability for the -P treatment may have limited  $N_2$  fixation, which is known as a P-demanding process (Peoples et al., 2009). Only few nodules were observed in roots of chickpea grown in the -P soil. Nodulation was better at +P, but the  $N_2$  fixation was still rather small, especially when chickpea was grown as sole crop. The %Ndfa was in this case only slightly above 50% in the intercropped chickpea (Fig. 3.5). These observations are consistent with the measured rhizosphere pH values (Fig. 3.7). For the +P treatment when chickpea was intercropped with durum wheat, rhizosphere pH was between those of chickpea grown as sole crop and bulk soil. It may have resulted from an increase in proton release by intercropped chickpea due to greater  $N_2$  fixation compared to the sole crop, which almost compensated the hydroxyl efflux that occurred as a consequence of a substantial uptake of nitrate. Li et al. (2008) observed a higher proton efflux expressed on a per plant basis in the rhizosphere of common bean when intercropped with durum wheat. It is consistent with the increase in  $N_2$  fixation observed in intercropping for the +P treatment (Fig. 3.5), which confirmed previous field studies reporting increased  $N_2$  fixation for intercropped legumes, as a consequence of the competition with the intercropped cereal for nitrate uptake (Bedoussac and Justes, 2010; Jensen, 1996; Li et al., 2009; Naudin et al., 2010).

Alkalinization observed in the rhizosphere of durum wheat confirmed previous results obtained for nitrate-fed grasses (Gahoonia et al., 1992; Zhang et al., 2004; Devau et al., 2010, 2011b). In the studied soil, nitrate concentration was 36-fold greater than ammonium concentration, which is in line with the hypotheses of a preferential uptake of N as nitrate by durum wheat during the experiment. In intercropping, alkalinization was significantly higher in the rhizosphere of durum wheat in the -P treatment (Fig. 3.7). This increase was however not associated with an enhanced N uptake for the intercropped durum wheat (Table 3.7).

We can assume that rather than a change in the amount of N taken up, it was the relative proportion of inorganic N ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) taken up by the durum wheat that was influenced when intercropped with chickpea. It may be explained by a change in available N forms in soil due to altered composition/activity of microbial communities in the rhizosphere of intercropped species (Song et al., 2007b). It may alternatively have resulted from differences in interspecific competition for inorganic N forms taken up (Miller et al., 2007), durum wheat being more competitive than chickpea to access nitrate (Jensen, 1996; Hauggaard-Nielsen et al., 2001).

#### II.4.3. Root-induced processes altering P availability

Root-induced pH change is one of the major processes influencing P availability in soils (Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2003). We did not observe any rhizosphere acidification, even for chickpea, which invalidates our hypothesis. This can be explained by the low level of  $\text{N}_2$  fixation achieved by chickpea. In our experiment, rhizosphere alkalization was associated with increases in water-P and Olsen-P (Fig. 3.6 and 3.7). These results contradicted the general assumption that in neutral and alkaline soils acidification rather than alkalization increases P availability through solubilization of sparingly-soluble inorganic P (Ca-bound P) or affecting adsorption/desorption processes in soils (Hinsinger, 2001; Richardson et al., 2009). But Devau et al. (2010, 2011a, 2011b) recently demonstrated that alkalization can also lead to increased P availability in neutral, non-calcareous soils. These authors successfully simulated the observed increase in water-P in the rhizosphere when Ca uptake by plants was considered on top of P uptake and rhizosphere alkalization. In the case of durum wheat in the present experiment, the observed rhizosphere alkalization (Fig. 3.7) was associated with an increase in water-P in the low P soil (Fig. 3.6), but there was no significant correlation between rhizosphere pH and P availability, as shown in supporting information (see supplementary data, figure 3.A2). Rhizosphere alkalization and P uptake, presumably combined with Ca uptake were thus probably the root-induced processes implied in the enhanced P availability, as we used the same crop species and the same soil as Devau et al. (2011b). In the case of chickpea, the observed increase in P concentration, as occurred for water-P (Fig. 3.6), was not associated with pH change except when intercropped with durum wheat for the +P treatment where a significant alkalization was observed (Fig. 3.7). One should then consider the potential driving effect of the interaction between pH and Ca uptake on P availability as stressed by Devau et al. (2010, 2011b). Dicotyledonous species such as chickpea are known to take up more Ca than monocotyledonous species such as wheat (White and Broadley, 2003). This may explain the differences observed between durum wheat and chickpea when considering root-induced changes of pH and P availability in their respective rhizosphere. Other root-induced processes may have also interacted with P uptake and pH change in the rhizosphere of chickpea to contribute some increase in P availability. Legumes such as chickpea are known to exude substantial amounts of carboxylates, contrary to wheat (Neumann and Römheld, 1999; Veneklaas et al., 2003;

Pearse et al., 2006), as well as phosphatases (Gahoonia and Nielsen, 2004; Nuruzzaman et al., 2006). These P-solubilizing compounds may well have positively impacted rhizosphere P availability for chickpea in the present experiment.

#### II.4.4. Phosphorus uptake and plant growth

The P concentrations observed in -P and +P treatments were slightly below the critical value for P deficiency of  $2.2 \text{ mg g}^{-1}$  and  $1.5\text{-}2.0 \text{ mg g}^{-1}$  of dry weight reported respectively for durum wheat and chickpea at a similar growth stage (Reuter and Robinson, 1997). Biomass, and consequently the amount of P taken up by durum wheat and chickpea were also below the values reported in the literature, even for plants grown at an earlier phenological stage or low soil availability (Li et al., 2003, 2004; Cu et al., 2005). It suggests that even the +P treatment was somewhat limiting for plant growth. Indeed at +P, concentrations of P and N in shoots indicated that P or N were limiting although soil P availability was considered to exceed plant requirements (Colomb et al., 2007) and N fertilization was added as urea. Contrary to most prior studies on P facilitation in intercrops we did not add large quantities of N to avoid inhibiting the potential effect of symbiotic  $\text{N}_2$  fixation, as we assumed that chickpea would thereby acidify its rhizosphere and increase P availability. According to the "multiple limitation hypothesis" (Rubio et al., 2003), we can assume that N was limiting, and restricted root growth that ultimately limited P uptake even for the +P treatment.

Intercropping resulted in a significant increase in both shoot and root biomass of durum wheat at -P while no significant changes were observed at +P and for chickpea whatever the soil P availability (Fig. 3.4). Facilitation of growth of cereal by a legume has been frequently reported in the literature. For fertilized treatments, biomass of either wheat (Li et al., 2003) or maize (Li et al., 2004) was increased when intercropped with chickpea. But no intercropping effect was reported for maize in the low P treatment contrary to our results or those reported by Li et al. (2007) for maize intercropped with faba bean. Those contradictory results stress the difficulties to conclude on the stress-gradient hypothesis that is still a matter for debate in ecology (Maestre et al., 2009).

Observed facilitation of durum wheat by chickpea at -P was not associated with an enhanced P nutrition though (Table 3.6). Actually no positive effect of intercropping on P taken up by either durum wheat or chickpea was detected. This contradicts most of studies on P in cereal-legume intercrops, which reported an increase in P uptake compared to sole crops. Our results suggest that the enhanced rhizosphere P availability that was observed when the two species were intercropped was not sufficient to positively affect plant growth, except for durum wheat in -P, and P bioavailability. Even though durum wheat exhibited a larger root biomass when intercropped at -P, it was not sufficient to increase P bioavailability contrary to the previous results of Wang et al. (2007) in a root barrier experiment. The positive effect of chickpea on durum wheat biomass in -P cannot be directly attributed to an enhancement of P uptake through increased P availability, but we cannot exclude positive interactions occurring for other resources (*i.e.* other nutrients, water, light). Enhanced



growth observed for intercropped durum wheat may also have resulted from a decrease in interspecific competition for one resource (*i.e.* complementarity). In +P, the positive effect of chickpea on durum wheat may have resulted from an enhanced N nutrition due to either complementary use of N through N<sub>2</sub> fixation or a decrease in interspecific competition.

## II.5. Conclusions

The aim of our study was to test the effect of durum wheat-chickpea intercrop on P bioavailability for each species. We focused on P availability in relation to root-induced changes in pH as this process was supposed to have a major effect on P concentration in the studied soil. We showed that P availability increased in the rhizosphere of either durum wheat or chickpea, and this increase was even larger when the two species were intercropped. Such an increase was to some extent associated with alkalization of the rhizosphere, and surprisingly no acidification was observed in the rhizosphere of chickpea, which occurred to fix low amounts of N<sub>2</sub> due partly to P limitation. We suggested that P availability in the rhizosphere was not affected only by P uptake and pH but also by the interaction with some other root-induced processes, e.g. exudation of phosphatases, carboxylates and the uptake of other nutrients such as Ca. Consequently in our experiment N<sub>2</sub> fixation did not appear to be involved in increasing P availability in the rhizosphere of the cereal-legume intercrop, which invalidated our hypothesis. Because P availability was increased in the rhizosphere of both species grown as sole crops and even more so when intercropped, facilitative mechanisms occurred both ways. Consequently, the cereal may also facilitate the legume via increased rhizosphere P availability, although most previous studies have neglected this possibility. Significant positive effects of intercropping were observed in the rhizosphere but such belowground interactions between the two intercropped species did not improve their growth (except for durum wheat in the low P soil), P or N nutrition. Although we observed enhanced rhizosphere P availability in durum wheat-chickpea intercrop compared to sole crops we cannot demonstrate any facilitation related to enhanced P bioavailability. Species interactions resulted in an increase in growth only for durum wheat in the low P soil. Because of multiple complex interactions either positive or negative, facilitative mechanisms altering P availability were not sufficient to increase chickpea growth when intercropped with durum wheat.

The other objective of our work was to evaluate the effect of soil P availability on species interactions when intercropped. Most of our results supported the stress-gradient hypothesis, which stipulates increasing positive interactions with increasing environmental stress. But again this stands mostly for belowground processes and the growth of durum wheat. Thus, relations between nutrient availability and plant-plant interactions are still complex and need to be tested for other parameters, and for a broader gradient, from P deficiency to P sufficiency.

## Acknowledgments

Financial support for the experimental costs was provided by ANR (Agence Nationale de la Recherche) SYSTERRA programme ANR-08-STRA-11 (PerfCom). We thank Charline Guilleré for technical assistance, and Marin Vabre for providing access to the glasshouse facility of UE DiaScope at INRA Mauguio. We also thank Nicolas Devau for scientific and writing advices.

## References

- AFNOR. 1969. Dosage spectrophotométrique de l'anhydride phosphorique: méthode vanadomolybdique. AFNOR, Paris:242-246.
- Barber, S.A., 1995. Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach, second ed. John Wiley, New York, USA 489pp.
- Bedoussac, L., Justes E. 2010. The efficiency of a durum wheatewinter pea intercrop to improve yield and wheat grain protein concentration depends on N availability during early growth. *Plant and Soil* 330:19-35.
- Bertness, M., Callaway R.M. 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9:191-193.
- Brooker, R., Kikvidze Z., Pugnaire F.I., Callaway R.M., Choler P., Lortie C.J., Michalet R. 2005. The importance of importance. *Oikos* 109:63-70.
- Callaway, R.M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61: 306-349.
- Chen, C.R., Condon L.M., Davis M.R., Sherlock R.R. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial rye grass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology and Biochemistry* 34:489-499.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J.M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Cordell, D., Drangert J.O., White S. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19 : 292-305.
- Cu, S.T.T., Hutson J., Schuller K.A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.
- Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 156:1-20.
- Dawson, C.J., Hilton J. 2011. Fertiliser availability in a resource-limited world: production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36:14-22.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gérard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gérard F. 2011a. Effects of inorganic fertilization and pH on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 75:2980-2996.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gérard F. 2011b. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil* 348 :203-218.
- de Wit, C.T. 1960. On competition. *Verslagen van landouwkundige onderzoeken* 66:1-82.
- FAO-UNESCO. 1989. Soil Map of the World at 1: 5 000 000, third ed. FAO Press, Paris.

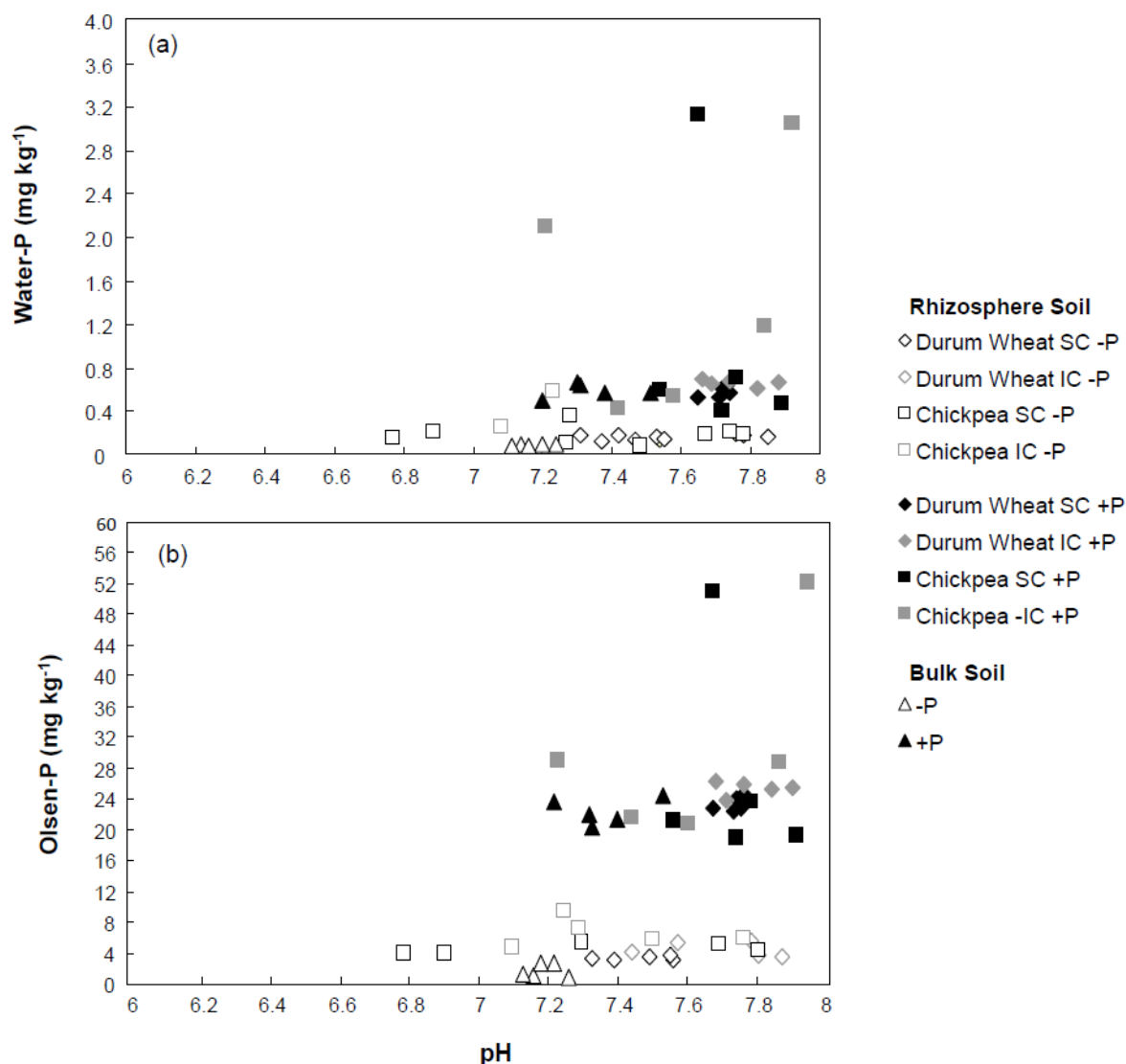
- Fridley, J.D. 2001. The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* 93:514-526.
- Gahoonia, T.S., Claassen, N., Jungk, A. 1992. Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant and Soil* 140 : 241-248.
- Gahoonia, T.S., Nielsen N.E. 2004. Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. *Plant and Soil* 260:47-57.
- Geelhoed, J.S., Van Riemsdijk W.H., Findenegg G.R. 1999. Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. *European Journal of Soil Science* 50:79-390.
- Gibson, D.J., Connolly J., Hartnett D.C., Weidnhamer, J.D. 1999. Designs for greenhouse studies of interactions between plants. *Journal of Ecology* 87:1-16.
- Harmsen, J. 2007. Measuring bioavailability: from a scientist approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality*36: 1420-1428.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus P., Jensen E.S. 2001. Interspecific competition, N use and interference with weeds in pea-barley intercropping. *Field Crop Research* 70:101-109.
- Hinsinger, P., Gilkes R.J. 1996. Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science* 47:533-544.
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advance in Agronomy* 64:255-265.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C., Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248:43-59.
- Hinsinger, P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J., Tang, X., Zhang F. 2011a. P for two, sharing a scarce resource e soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Hinsinger, P., Brauman A., Devau N., Gérard F., Jourdan C., Laclau J.P., Le Cadre E., Jaillard B., Plassard C. 2011b. Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? *Plant and Soil* 348 : 29-61
- Hübel, F., Beck E. 1993. In-situ determination of the P-relations around the primary root of maize with respect to inorganic and phytate-P. *Plant and Soil* 157:1-9.
- ISO/DIS, 2006. 17402: Soil Quality. Guidance for the Selection and Application of Methods for the Assessment of Bioavailability of Contaminants in Soil and Soil Materials. ISO, Geneva, Switzerland.
- Jensen, E.S. 1996. Grain yield, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant and Soil* 182:25-38.
- Johnson, A.H., Frizano J., Vann D.R. 2003. Biogeochemical implications of labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure. *Oecologia* 135:87-499.
- Lambers, H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S., Veneklaas E. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98:693-713.
- Li, L., Tang C., Rengel Z., Zhang F., 2003. Chickpea facilitates phosphorus uptake by

- intercropped wheat from an organic phosphorus source. *Plant and Soil* 248:297-303.
- Li, S.M., Li L., Zhang F., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297-303.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 104:11192-11196.
- Li, H., Shen, J., Zhang F., Clairotte M., Drevon J.J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139-150.
- Li, Y.Y., Yu, C., Cheng X., Li C.J., Sun J.H., Zhang F.S., Lambers, H., Li, L. 2009. Intercropping alleviates the inhibitory effect of N fertilization on nodulation and symbiotic N<sub>2</sub> fixation of faba bean. *Plant and Soil* 323:295-308.
- López-Bellido, F.J., López-Bellido R.J., Redondo R., López-Bellido L. 2010. B value and isotopic fractionation in N<sub>2</sub> fixation by chickpea (*Cicer arietinum* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant and Soil* 337:425-434.
- Maestre, F.T., Callaway R.M., Valladares F., Lortie C.J. 2009. Refining the stress gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97:199-205.
- Miller, A.E., Bowman W.D., Nash Suding K. 2007. Plant uptake of inorganic and organic nitrogen: neighbor identity matters. *Ecology* 88:1832-1840.
- Naudin, C., Corre-Hellou G., Pineau S., Crozat Y., Jeuffroy M.H. 2010. The effect of various dynamics of N availability on winter pea/wheat intercrops: crop growth, N partitioning and symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Field Crop Research* 119:2-11.
- Neumann, G., Römheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211:121-130.
- Nuruzzaman, M., Lambers H., Bolland M.D.A., Veneklaas E.J. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* 281:109-120.
- Nye, P.H. 1983. The diffusion of 2 interacting solutes in soil. *Journal of Soil Science* 34: 677-691.
- Ofori, F., Stern W.R. 1987. Cereale-legume intercropping systems. *Advance in Agronomy* 41:41-90.
- Ohno, T., Zibilske L. 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal* 55:892-895.
- Olsen, S.R., Cole C.V., Watanabe W.S., Dean L.A. 1954. Estimation of Available Phosphorus in Soil by Extraction with Sodium Bicarbonate. USDA Circular 939. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Pearse, S.J., Veneklaas E.J., Cawthray G., Bolland M.D.A., Lambers H. 2006. *Triticum aestivum* shows a greater biomass response to a supply of aluminium phosphate than *Lupinus albus* despite releasing fewer carboxylates into the rhizosphere. *New Phytologist* 169:515-524.
- Peoples, M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester I., Alves B.J.R., Urquiaga S., Boddey R.M., Dakora F.D., Bhattarai S., Maskey S.L., Sampet C., Rerkasem B., Khan, D.F., Hauggaard-Nielsen H., Jensen E.S. 2009. The contributions of nitrogen fixing crop

- legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* 48:1-17.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:665-693.
- Rengel, Z., Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168:305-312.
- Reuter, J.B., Robinson D.J. (Eds.). 1997. *Plant Analysis: An Interpretation Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia 450pp.
- Richardson, A.E., Barea J.M., McNeill A.M., Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 320:305-339.
- Rose, T.J., Hardiputra B., Rengel Z. 2010. Wheat, canola and grain legume access to soil phosphorus fractions differs in soils with contrasting phosphorus dynamics. *Plant and Soil* 326:159-170.
- Rubio, G., Zhu J., Lynch J.P., 2003. A critical test of the two prevailing theories of plant response to nutrient availability. *American Journal of Botany* 90:143-152.
- Shearer, G., Kohl D.H., 1986. N<sub>2</sub> fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:699-756.
- Song, Y.N., Marschner P., Li L., Bao X.G., Sun J.H., Zhang F.S. 2007b. Community composition of ammonia-oxidizing bacteria in the rhizosphere of intercropped wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 44:307-314.
- Tang, C., Barton L., Rapheal C. 1997. Pasture legume species differ in their capacity to acidify a low-buffer soil. *Australian Journal of Agriculture Research* 49:53-58.
- Tang, C., Unkovich M.J., Bowden J.W. 1999. Factors affecting soil acidification under legumes. III. Acid production by N<sub>2</sub>-fixing legumes as influenced by nitrate supply. *New Phytologist* 143:513-521.
- Tang, C., Drevon J.J., Jaillard B., Souche G., Hinsinger P. 2004. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant and Soil* 260:59-68.
- Vance, C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157:423-447.
- Vance, C.P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiology* 127:390-397.
- Veneklaas, E.J., Stevens J., Cawthray G.R., Turner S., Grigg A.M., Lambers H. 2003. Chickpea and white lupin rhizosphere carboxylates vary with soil properties and enhance phosphorus uptake. *Plant and Soil* 248:187-197.
- Vu, D.T., Tang, C., Amstrong, R.D. 2008. Changes and availability of P fractions following 65 years of P application to a calcareous soil in a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 304:21-33.
- Wang, D., Marschner, P., Solaiman, Z., Rengel, Z. 2007. Belowground interactions between intercropped wheat and Brassicas in acidic and alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39:961-971.
- White, P.J., Broadley, M.R. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:487-511.
- Willey, R. 1979. Intercropping its importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstracts* 32:1-10.

Zhang, F., Zhang, S., Zhang, J., Zhang, R., Li, F. 2004. Nitrogen fertilization on uptake of soil inorganic phosphorus fractions in the wheat root zone. *Soil Science Society of America Journal* 68:1890-1895.

Appendix. Supplementary data



**Figure 3.A.2.** Phosphorus concentration in water extracts (a) and Olsen extracts (b) as a function of pH in the rhizosphere of either durum wheat or chickpea for all treatments and in the bulk soil corresponding to control soil without plant. Diamonds and square symbols correspond to rhizosphere soil and triangles to bulk soil. Open symbols correspond to -P treatment, solid symbols correspond to +P treatment. For the rhizosphere soil, diamonds correspond to durum wheat and squares to chickpea, dark symbols correspond to the rhizosphere of species grown as sole crop (SC), grey symbols to the rhizosphere of species grown as intercrop (IC)

## CHAPITRE IV

**Interactions entre blé dur et pois chiche en culture associée  
et acquisition de phosphore : influence de la fixation de N<sub>2</sub>**

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence de fréquentes augmentations de disponibilité en P pour les formes inorganiques de P (*i.e.* concentration en P dans des extraits Olsen et à l'eau) dans la rhizosphère, notamment dans le cas des espèces en association. L'expérimentation en pot nous a permis de constater que les augmentations de disponibilité étaient associées à des augmentations de pH dans la rhizosphère alors qu'aucune acidification par la légumineuse n'a été observée. La mesure du taux de fixation de N<sub>2</sub> a montré des valeurs très faibles voire nulles pouvant expliquer les variations de pH observées dans la rhizosphère du pois chiche. Néanmoins, aucune relation claire n'a pu être établie entre les modifications de pH et la disponibilité en P laissant supposer l'implication d'autres processus rhizosphériques.

L'objectif de ce chapitre est de préciser l'influence de la nutrition azotée sur les interactions pour l'acquisition de P entre le blé dur et la légumineuse *via* les modifications de pH induites par les racines. Autrement dit l'objectif est d'évaluer l'influence de la fixation de N<sub>2</sub> par la légumineuse et des modifications de pH qui en résultent sur la disponibilité de P dans la rhizosphère des espèces en association et le partage de la ressource en P par ces dernières.

L'article présenté dans ce chapitre intitulé « Soil characteristics control positive interactions for phosphorus in soil between durum wheat and chickpea in intercrop » évalue l'effet des interactions N<sub>2</sub>P sur l'acquisition de P par l'association blé dur-pois chiche. Ce travail a été réalisé en conditions contrôlées à l'aide d'un dispositif de type mini-rhizobox développé afin de faciliter la récolte de la rhizosphère de chacune des espèces. Compte tenu de l'effet inhibiteur des ions NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sur la fixation de N<sub>2</sub> de la légumineuse, son activité fixatrice et par conséquent les variations de pH induites par ses racines, les deux espèces ont été cultivées, en association ou non, à quatre doses d'apport de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Il est prévu de soumettre cet article à la revue *Soil Biology and Biochemistry*.



## I. Soil characteristics control positive interactions for phosphorus in soil between durum wheat and chickpea in intercrop

Elodie Betencourt <sup>a, b</sup>, Xiaoyan Tang <sup>a, b</sup>, Philippe Hinsinger <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>b</sup> Montpellier SupAgro, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 49; fax: +33 4 99 61 30 88.

E-mail address: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr (P. Hinsinger).

### Abstract

Positive interactions between cereals and N<sub>2</sub>-fixing legumes have been recently highlighted for phosphorus (P) but the underlying rhizosphere mechanisms are still unknown. Rhizosphere acidification induced by the N<sub>2</sub>-fixing activity of the legume is one of the mechanisms supposed to enhance P acquisition in cereal-legume intercrops in neutral to alkaline soils. But previous studies showed that in such soils, depending on soil properties, both acidification and alkalization can increase P availability. Our hypothesis was that root-induced changes of pH driven by nitrogen nutrition were responsible for the above-mentioned positive interactions. We have grown durum wheat and chickpea as intercrop and sole crops in a mini-rhizobox device. The soil was a luvisol with neutral pH. We applied 4 levels of nitrate supply to inhibit or promote N<sub>2</sub> fixation and thus obtain different patterns of rhizosphere pH. Phosphorus availability and pH were measured in water extracts for rhizosphere and bulk soils. Plant biomass, P and N concentration in shoots and roots were measured. A negative relation between P availability and values of pH in the rhizosphere was obtained for chickpea in sole crop, explaining the observed substantial increase of available P that was found when no nitrate was added. Phosphorus availability was also enhanced when durum wheat and chickpea were intercropped. Values in intercrop were distributed in a zone where root-induced changes of pH did not influence P availability. It suggests that other root-borne processes were involved. Those results suggested that positive interactions for P acquisition in cereal-legume intercrop are largely dependent on soil properties.

Key words: Rhizosphere, P availability, Soil pH, N<sub>2</sub> fixation, facilitation, intercropping

### I.1. Introduction

Phosphorus (P) is a major nutrient limiting crop growth in many soils (Raghothama, 1999; Lynch, 2007; Richardson et al., 2011). The main practice to overcome such constraint to agroecosystem productivity remains the use of fertilizers. Phosphorus fertilizers derive mainly from mined phosphate rocks which are however a finite resource (Cordell et al. 2009; Dawson and Hilton, 2011). Therefore, the systematic use of P fertilizers to support increasing world food demand does not appear as a sustainable option (Vance, 2001; Hinsinger et al., 2011a). New alternatives are needed to better exploit soil resources either through the selection of efficient cultivars or strategies of management of agroecosystems to optimize P acquisition of crops (Vance, 2001; Lambers et al., 2006; Richardson et al., 2011).

Phosphorus acquisition is best defined considering the concept of bioavailability. Phosphorus bioavailability correspond to the amount or flux of P taken up by the biota, over a given time period, according to the definition provided by ISO (see Harmsen, 2007; ISO/DIS, 2006). It depends on two components: the fraction of P in soils, which can potentially be accessed by the biota (*i.e.* P availability) and the actual ability of a given living organism to access soil P. Harmsen (2007) introduced the concept of bio-influenced zone corresponding to the volume of soil where each living organism can alter significantly the availability through its physiological activity. In the particular case of plants, the bio-influenced zone corresponds to the rhizosphere where plants genotypes (*i.e.* species or cultivars) increase P availability through different strategies (Hinsinger, 2001; Rengel and Marschner, 2005; Lynch, 2007; Richardson et al., 2011): (i) exudation of P-mobilizing compounds and (ii) stimulation of microbial activities, either symbiotic (*e.g.* mycorrhizal fungi) or not. In addition, plant species may exhibit different root system architecture, anatomy (*e.g.* root hairs) and morphology (*e.g.* cluster roots), which influence the size and the geometry of the rhizosphere. Exudation of P-mobilizing compounds is known to play a major role in altering P availability in the rhizosphere *via* different mechanisms: proton/hydroxyls ( $H^+/OH^-$ ) and carboxylates solubilize inorganic P, while extracellular phosphatase-like enzymes hydrolyze organic P (Raghotama, 1999; Hinsinger, 2001; Dakora and Phillips, 2002; Richardson et al., 2011).

Introducing functional diversity in cropping systems is considered as a promising strategy to enhance the acquisition of resources through the management of interactions between genotypes (Hinsinger et al., 2011a). This assumption derives from ecological concepts proposing that increasing diversity promotes resource acquisition through two major mechanisms: (i) reduction of competition *via* resource partitioning due to niche differentiation, (ii) enhanced resource availability *via* facilitation (Fridley, 2001; Loreau, 2001). Resource partitioning, thereafter called complementarity, occurs when plant uptake differs either in time, in space or considering the chemical form that is taken up (Fridley, 2001). Facilitation stands for positive interaction by which one plant increases the growth, reproduction and/or survival of another plant species through altering its biotic/abiotic environment, ultimately resulting in increased resource availability (Callaway, 1995). Among different agricultural practices, intercropping, *i.e.* growing two or more species

simultaneously in the same field is particularly put forward as a consequence of the frequently observed enhanced resource acquisition, compared with conventional systems based on single-species stands, thereafter called sole cropping (Willey, 1979; Ofori and Stern, 1987).

Cereal-legume intercropping is especially known for its beneficial effect on N acquisition but recent studies evidenced similar results concerning P (Li et al., 2007; Hinsinger et al., 2011a). While complementarity use of N chemical forms between the cereal and the N<sub>2</sub> fixing legume is considered to be the main mechanisms, little is known about the interactions occurring for P. Considering P, complementarity and facilitation in cereal-legume intercrop may imply several root-induced mechanisms altering P availability either directly or through the activity of microorganisms, as reviewed by Hinsinger et al. (2011a). Most of former studies implicitly assume that facilitation is induced by the legume increasing P availability in its rhizosphere that will ultimately benefit to the intercropped cereal as a results of higher root exudation of *e.g.* (i) protons due to N<sub>2</sub> fixation (Tang et al., 1997; Hinsinger et al. 2003), (ii) carboxylates (Neumann et Römheld, 1999; Veneklaas et al., 2003; Pearse et al., 2006) or (iii) phosphatases (Nuruzzaman et al., 2006). Amongst these, most of the studies focused on phosphatase activity and interactions through the activity of microorganisms (Li et al., 2004; Song et al. 2007; Wang et al., 2007, 2012). Although pH is considered as a key parameter determining P availability (Hinsinger, 2001) only few studies addressed the influence of root-induced pH changes on interactions for P acquisition and especially on its potential role in facilitation. Root-induced pH changes in the rhizosphere are essentially mediated by the exudation of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> which are driven by nitrogen nutrition through cation-anion balance (Hinsinger et al., 2003).

It is generally assumed that root-induced acidification of the rhizosphere due to N<sub>2</sub> fixation of the legume will increase P availability that will ultimately benefit the associated cereal suggesting synergic effect of N and P nutrition. This hypothesis was formulated and tested for neutral to alkaline soils (Cu et al. 2005; Li et al., 2008). In this type of soils, a decrease in pH is assumed to increase the availability of inorganic P through either dissolution of P minerals or desorption of phosphate ions bound onto different soil constituents (Hinsinger, 2001). Recent work of Devau et al. (2011a) showed that in a given soil both acidification and alkalization can enhance P availability. These authors observed an enhanced P availability in the rhizosphere of durum wheat associated with root-induced alkalization. Mechanistic modelling confirmed the critical influence of alkalization combined with other rhizospheric processes (Devau et al., 2011b). Similar results were reported in the specific case of a durum wheat-chickpea intercrop where enhanced P availability was observed in the rhizosphere of the two species grown alone and even more so when intercropped (Betencourt et al., 2012). However, this study did not report any acidification in the rhizosphere of the legume, due to restricted N<sub>2</sub> fixation. These former studies highlight the complexity of the influence of root-induced changes in pH on species interactions for P acquisition and indeed suggest that the

cereal may also influence positively rhizosphere P availability through rhizosphere alkalization and, hence facilitate P acquisition of the intercropped legume.

The aim of the present study was to evaluate the influence of plant species interactions on changes in pH and ultimately P availability for intercropped durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). We assumed that the main rhizosphere process impacting P availability was the root-induced pH changes either *via* acidification or alkalization. Nitrate fed plants are known to counterbalance excess anion taken up by OH<sup>-</sup> exudation inducing alkalination of their rhizosphere (see Hinsinger et al., 2003). In the specific case of N<sub>2</sub> fixing legumes, N is taken up as uncharged chemical species (N<sub>2</sub><sup>0</sup>). Considering N<sub>2</sub> fixation activity cation-anion balance is differently affected with excess of cations taken up for species mainly relying on N<sub>2</sub> fixation thus inducing net efflux of H<sup>+</sup> and acidification of the rhizosphere (Hinsinger et al., 2003). Numerous studies either in field or laboratory conditions reported decreasing in N<sub>2</sub> fixation activity for legumes exposed to increasing values of nitrate concentration (*e.g.* Tang et al., 1997; Fan et al., 2002; Naudin et al., 2010). In order to obtain different pattern of pH in the rhizosphere of species either in sole crop or intercropped, we induced a fertilization gradient of N added as nitrate. We assumed that N<sub>2</sub> activity will be affected by nitrate concentration with a maximum without any fertilization and inhibition for the highest concentration. This approach may help to determine the importance of N<sub>2</sub> fixation via its effect on rhizosphere acidification and its significance in P facilitation compared to other root-induced changes in pH. To put in other way, this approach may help to determine the conditions that maximize the beneficial effect of intercropping on P acquisition.

## **I.2. Material and methods**

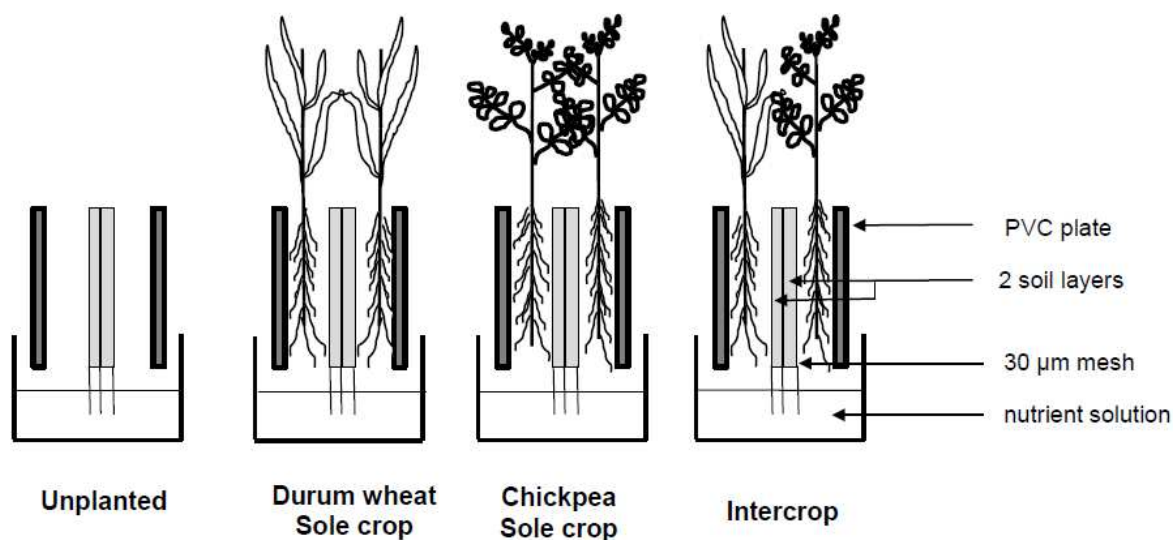
### **I.2.1. Experimental set-up**

The experiment was conducted using a factorial design with four N treatments and three crop treatments, plus an unplanted control. The first crop treatment corresponded to the intercrop where the two species were grown together and the other crop treatments corresponded to sole crops where each species was grown separately. The four N treatments were chosen to induce a range of pH in the rhizosphere, from acidic to alkaline values. The two extreme N doses (N0 and N20) were chosen to maximize and minimize N<sub>2</sub> fixation activity of the legume, respectively. Nitrogen was added as NO<sub>3</sub><sup>-</sup> considering its inhibiting effect on N<sub>2</sub> fixation (*e.g.* Voisin et al. 2002), the highest value being chosen according to the work of Mann et al., (2001). Mini-rhizobox were arranged in a completely randomized design with five replicates, and were randomized every day during the experiment.

### **I.2.2. Mini-rhizobox device**

Species were grown in a mini-rhizobox device adapted from Li et al. (2008). Roots mats were separated from soil by a 30- $\mu$ m polyamide mesh to easily collect the rhizosphere from the

roots. Contrary to Li et al. (2008) where root mats were sharing a common soil layer sandwiched between them, we used two contiguous soil layers (each being roughly 1-mm thick) separated by a mesh in order to easily collect the rhizosphere of each plant species assuming that in intercrop, the rhizosphere of each plant species may still be different (Fig.4.1). The thickness of soil was chosen relative to previous works showing that for P, depletion zone seldom extended farther than 1mm from the roots while root exudates influencing P availability can diffuse over longer distances, especially for  $H^+/OH^-$  (e.g. Hinsinger et al., 2005; Raynaud, 2010).



**Figure 4.1.** Mini-rhizobox device for the different cropping treatments and the unplanted soil.

### 1.2.3. Soil properties

The studied soil was taken from the top 10-cm of a long-term P fertilizer field trial located at the INRA Research center of Auzeville (SW France 43°31'N, 1°30'E) and sieved to 5 mm. The soil is classified as a Luvisol (FAO-UNESCO, 1989) with a loam to clay-loam texture. The field trial comprised four P regimes arranged in four randomized blocks along a  $CaCO_3$  gradient (Colomb et al., 2007). The soil samples used for the experiment were collected 40 years after the start of the experiment in the non-calcareous part of the field trial. In a former experiment (Betencourt et al., 2012) we used the soil collected from the two extreme fertilization regimes showing highly contrasted P availabilities. In the present experiment we used the high P soil (P4) for two main reasons: (i) to avoid the inhibiting effect of low soil P concentration on  $N_2$  fixation and, (ii) to limit the P stress for plant growth considering the small amount of soil in contact with roots (68 g of dry soil per mini-rhizobox) and thus the small amount of available P even in this fertilized soil in such experimental set-up (Li et al., 2008). The main soil properties of P4 soil as determined by the routine soil testing laboratory of Cirad (US49) in Montpellier are the following:  $pH_{H_2O}=7.54$ , organic C = 8.9 g  $kg^{-1}$  (heat-loss at 1000°C), total P = 593 mg  $kg^{-1}$  (fluorhydric and perchloric digestion method), extractable P

determined with Olsen method = 30.4 mg kg<sup>-1</sup> (sodium bicarbonate method), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 20 mg kg<sup>-1</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.56 mg kg<sup>-1</sup> (KCl extract), exchangeable Ca (cobalthexamine chloride method) amounted to 85% of the cation exchange capacity of the soil (the remainder being made of 8% Mg, 3% K and traces of Na). Prior to use, the soil was incubated during 7 days at 20°C in the dark in a P-free nutrient solution adjusted to pH 5.9 of following composition (M): K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75 10<sup>-3</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 1.65 10<sup>-3</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-3</sup>; N was added as KNO<sub>3</sub> at 4 different concentrations corresponding to the 4 N treatments with 0, 0.6 10<sup>-3</sup>, 6 10<sup>-3</sup> and 20 10<sup>-3</sup> for N0, N0.6, N6 and N20 respectively.

#### I.2.4. Plant growth

The experiment was conducted in growth chamber with the following controlled climatic conditions: 14/10h light/dark cycle, 400 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photon flux density, 25/20°C day/night temperature with a day/night relative humidity of 80/70%. The two plant species were: durum wheat (*Triticum turgidum durum* L. cv. LA1823) and chickpea obtained from ICARDA (*Cicer arietinum* L. cv. ILC 01302). Seeds of durum wheat and chickpea were sterilized with 3% of CaClO for 5 min and germinated on filter paper at 28°C during 7 days. The seedlings were then grown in hydroponics as a pre-culture phase during 21 days in order to obtain sufficient root development to cover the soil-containing mesh bag. Plant species were grown separately in 5 dm<sup>3</sup> buckets filled with nutrient solution differing in their composition considering their specific physiological needs. Wheat's nutrient solution was changed twice a week and had the following composition (M): KNO<sub>3</sub>, 2 10<sup>-3</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 10<sup>-6</sup>; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75 10<sup>-3</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 1.65 10<sup>-3</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-3</sup>; NaFeEDTA, 0.1 10<sup>-3</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4 10<sup>-6</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 6 10<sup>-6</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-6</sup>; CuSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-6</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 10 10<sup>-6</sup>. Chickpea's nutrient solution was changed first time after 15 days and then twice a week, and had the same composition as for durum wheat except for the chemical form of N and Fe added as (M): CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 1 10<sup>-3</sup>; FeEDDHA, 0.24. Nutrient solution of chickpea was daily adjusted to 6.5 with KOH (0.01M). Chickpea was inoculated with *Mesorhizobium ciceri* (UPM Ca7) 3 days after transfer in hydroponics allowing sufficient root length for inoculation. At the end of the pre-culture phase, 5 plantlets of each species were harvested in order to serve as reference plants before transfer on soil for the culture stage. For the culture stage, plants were transferred into the mini-rhizobox device with densities chosen to obtain similar root biomass for the two species and to allow a root mat sufficient to cover the whole soil surface (10 x 20 cm) to yield the corresponding rhizosphere. In the intercrop treatment, two wheat plantlets were placed on one side of the mesh bags and one chickpea on the other side; in the sole crop treatments, two durum wheat plantlets were placed on each side or one chickpea plantlet on each side. Additional soil-containing mesh bags were prepared without plant to serve as no plant control soil. During the culture stage soils of each mini-rhizobox were moistened with the same P-free solution as for the incubation stage differing with respect to the different N treatments, and renewed daily.

### 1.2.5. Plant and soil analyses

Plants were harvested after 12 days of growth in contact with the soil and separated into shoots and roots. In intercrop the two species were harvested separately. Shoots and roots were oven-dried at 70°C for 3 days and weighed for dry biomass determination. Shoots and roots were then ground (MM 2000, Retsch) and subsamples were digested in a microwave oven (ETHOS, Milestone) with concentrated HNO<sub>3</sub> (65%) at 180°C and 2 MPa. Phosphorus content was determined using the vanado-molybdate method (AFNOR, 1969). Subsamples of oven-dried shoots of chickpea and durum wheat were analyzed for N concentrations with a Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (Isoprime Ltd., Manchester, England) coupled to an Elemental Analyzer.

Rhizosphere and bulk soil corresponding to control soil without plant were oven-dried at 50°C for 3 days. Soil P availability was determined by water extraction thereafter called water-P for simplicity, which is often used as indicator of available P over the course of crop growth (Johnson et al., 2003). We extracted P at a soil:extractant (mass:volume) ratio of 1:5 and then centrifuged the extracts at 25,000 g for 10 min. After centrifugation, supernatants were filtered through 0.45 µm cellulose acetate membrane filters (VWR international). Phosphate concentrations were measured with the malachite green method (Ohno and Zibilske, 1991). Soil pH was determined in the water extracts with a Metrohm-744 pH meter with a combined glass electrode.

### 1.2.6. Statistical analyses

Two-ways analyses of variance (ANOVA) were performed considering soil crop treatment x N treatment on plant and soil parameters. For each N treatment, effect of crop treatment on soil and plant parameters was tested using one-way ANOVA with crop treatment as factor. ANOVA were conducted with the probability level of 0.05, when the assumption of the tests were not met, probability level strictly inferior to 0.001 was applied. Significant difference between means was separated by Tukey's multiple comparison tests at the 0.05 probability level. The 2.10.1 version of R software (R development Core Team 2009) was used for statistics.

## 1.3. Results

### 1.3.1. Plant growth

Shoot, root and total biomass per plant of the two species are reported in Table 4.1. The values and results of a two-way ANOVA are indicated considering the different crop and N fertilization treatments. For durum wheat, crop treatment had a significant effect on root biomass with higher values when intercropped. Total biomass was higher than the reference plant corresponding to the plant at the start of the experiment. Shoot and root biomass of durum wheat increased with N addition. For the N treatment without fertilization (N0) shoot biomass of durum wheat was 1.26 times higher in sole crop compared to the values when intercropped with chickpea. For chickpea, neither crop treatment nor N treatment affected

shoot, root and total biomass. Interaction between crop treatment and N treatment was relative to the case without fertilization (N0). As for durum wheat, when chickpea was grown as sole crop its shoot and root biomass were 1.7 and 1.3 higher than when intercropped, respectively.

**Table 4.1.** Plant biomass shoots and roots wheat and chickpea in different treatments. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). Reference values are relative to plants harvested at the time as other plants were placed in contact with soil. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and crop treatment, stars indicate significant difference between treatments (intercrop vs sole crop) \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ). For total biomass, values were compared to reference plant and different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ). Values of probability of two-way ANOVA (N treatment x Crop treatment) was indicated.

N treatment	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot biomass (g plant <sup>-1</sup> )	Root biomass (g plant <sup>-1</sup> )	Total biomass (g)	Shoot biomass (g plant <sup>-1</sup> )	Root biomass (g plant <sup>-1</sup> )	Total biomass(g)
N0	Reference	0.29 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.06 b	0.93 $\pm$ 0.07	0.73 $\pm$ 0.05	1.66 $\pm$ 0.13 b
	Sole crop	1.02 $\pm$ 0.03 *	0.52 $\pm$ 0.02	1.53 $\pm$ 0.04 a	1.95 $\pm$ 0.14 **	2.09 $\pm$ 0.18 *	4.04 $\pm$ 0.31 a
	Intercrop	0.81 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.03	1.33 $\pm$ 0.10 a	1.16 $\pm$ 0.13	1.57 $\pm$ 0.11	2.74 $\pm$ 0.24ab
N0.6	Reference			0.47 $\pm$ 0.06 b			1.66 $\pm$ 0.13 b
	Sole crop	1.11 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.44	1.66 $\pm$ 0.11 a	1.46 $\pm$ 0.19	1.68 $\pm$ 0.15	3.14 $\pm$ 0.35 a
	Intercrop	1.10 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.08	1.75 $\pm$ 0.27 a	1.38 $\pm$ 0.11	1.82 $\pm$ 0.14	3.20 $\pm$ 0.24 a
N6	Reference			0.47 $\pm$ 0.06 b			1.66 $\pm$ 0.13 b
	Sole crop	1.19 $\pm$ 0.12	0.63 $\pm$ 0.06	1.82 $\pm$ 0.18 a	1.95 $\pm$ 0.17	2.08 $\pm$ 0.11	4.03 $\pm$ 0.27 a
	Intercrop	1.16 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.16	1.95 $\pm$ 0.06 a	1.57 $\pm$ 0.11	1.81 $\pm$ 0.06	3.38 $\pm$ 0.26 a
N20	Reference			0.47 $\pm$ 0.06 b			1.66 $\pm$ 0.13 b
	Sole crop	1.21 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.01	1.91 $\pm$ 0.06 a	1.94 $\pm$ 0.23	1.81 $\pm$ 0.13	3.75 $\pm$ 0.26 a
	Intercrop	1.20 $\pm$ 0.12	0.74 $\pm$ 0.06	1.94 $\pm$ 0.18 a	2.02 $\pm$ 0.18	1.71 $\pm$ 0.20	3.73 $\pm$ 0.38 a
N Treatment		0.04	<0.001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Crop Treatment		n.s.	0.04	<0.001	n.s.	n.s.	<0.001
Ntreatment Crop xTreatment		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.05

Phosphorus concentration in shoots and roots and P content per plant for the different species, crop and N treatments are reported in Table 4.2. Except for chickpea, neither crop treatment nor N treatment had an effect on P nutrition. Interaction of crop and N treatment



was observed for P content, which was significantly greater for chickpea in sole crop, compared to intercrop in the N0 and N6 treatments.

**Table 4.2.** Phosphorus concentration in shoots and roots and total P content in plants for wheat and chickpea in different treatments. Reference values are relative to plants harvested at the time as other plants were placed in contact with soil. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and crop treatment, stars indicate significant difference between treatments (intercrop vs sole crop) \* ( $P < 0.05$ ). For total P content, values were compared to reference plant and different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ). Values of probability of two-way ANOVA (N treatment x Crop treatment) was indicated.

N treatment	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Total P content (mg)	Shoot P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Total P content (mg)
N0	Reference	6.63 $\pm$ 0.35	4.20 $\pm$ 0.19	2.6 $\pm$ 0.3 a	2.40 $\pm$ 0.22	4.06 $\pm$ 0.25	5.2 $\pm$ 0.4 b
	Sole crop	1.77 $\pm$ 0.05	2.30 $\pm$ 0.12	3.0 $\pm$ 0.1 a	1.82 $\pm$ 0.16	2.33 $\pm$ 0.09	8.4 $\pm$ 0.5 a
	Intercrop	1.81 $\pm$ 0.07	2.30 $\pm$ 0.13	2.6 $\pm$ 0.2 a	1.77 $\pm$ 0.10	2.40 $\pm$ 0.09	5.9 $\pm$ 0.6 b
N0.6	Reference			2.6 $\pm$ 0.3 a			5.2 $\pm$ 0.4 a
	Sole crop	1.73 $\pm$ 0.04	2.32 $\pm$ 0.12	3.2 $\pm$ 0.2 a	1.60 $\pm$ 0.15	2.40 $\pm$ 0.11	6.3 $\pm$ 0.6 a
	Intercrop	1.76 $\pm$ 0.07	2.20 $\pm$ 0.14	3.3 $\pm$ 0.5 a	1.47 $\pm$ 0.07	2.54 $\pm$ 0.14	6.6 $\pm$ 0.4 a
N6	Reference			2.6 $\pm$ 0.3 b			5.2 $\pm$ 0.4 b
	Sole crop	1.81 $\pm$ 0.24	2.23 $\pm$ 0.14	3.4 $\pm$ 0.2 ab	1.58 $\pm$ 0.26*	2.26 $\pm$ 0.12	7.8 $\pm$ 0.6 a
	Intercrop	1.44 $\pm$ 0.02	2.42 $\pm$ 0.17	3.6 $\pm$ 0.2 a	1.26 $\pm$ 0.01	2.19 $\pm$ 0.07	6.0 $\pm$ 0.6 b
N20	Reference			2.6 $\pm$ 0.3 a			5.2 $\pm$ 0.4 a
	Sole crop	1.83 $\pm$ 0.15	2.24 $\pm$ 0.07	3.8 $\pm$ 0.3 a	1.40 $\pm$ 0.11	2.39 $\pm$ 0.08	7.1 $\pm$ 0.5 a
	Intercrop	1.70 $\pm$ 0.13	2.31 $\pm$ 0.27	3.8 $\pm$ 0.4 a	1.69 $\pm$ 0.12	2.09 $\pm$ 0.21	6.9 $\pm$ 0.6 a
N Treatment		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Crop Treatment		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<0.001
Ntreatment Crop xTreatment		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.04

Data on N nutrition are reported in Table 4.3. For durum wheat, N treatment affected N concentration in biomass with increasing values upon N addition but the values were not influenced by crop treatment. Durum wheat presented higher N content compared to reference plant with significant quantity of N taken up for the two highest N treatments. For the N treatment without fertilization (N0), durum wheat in sole crop presented shoot N

concentration 1.2 times higher than when intercropped with durum wheat. For the N6 treatment however, the N content of intercropped durum wheat was significantly greater than when durum wheat was grown as sole crop. Nitrogen fertilization also positively affected the N nutrition of chickpea. Interaction between crop treatment and N treatment for N concentration in shoots are relative to higher values (1.4 times in average) obtained for chickpea in sole crop for the treatment without fertilization and the two highest N treatments. These differences are also expressed in term of N content with higher values achieved in sole crop compared with intercropped chickpea.

**Table 4.3.** Nitrogen concentration in shoots and roots and total N content in plants for wheat and chickpea in different treatments. Reference values are relative to plants harvested at the time as other plats were placed in contact with soil. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and crop treatment, stars indicate significant difference between treatments (intercrop vs sole crop) \* ( $P < 0.05$ ). For N content, values were compared to reference plant and different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ). Values of probability of two-way ANOVA (Crop treatment x N treatment) was indicated.

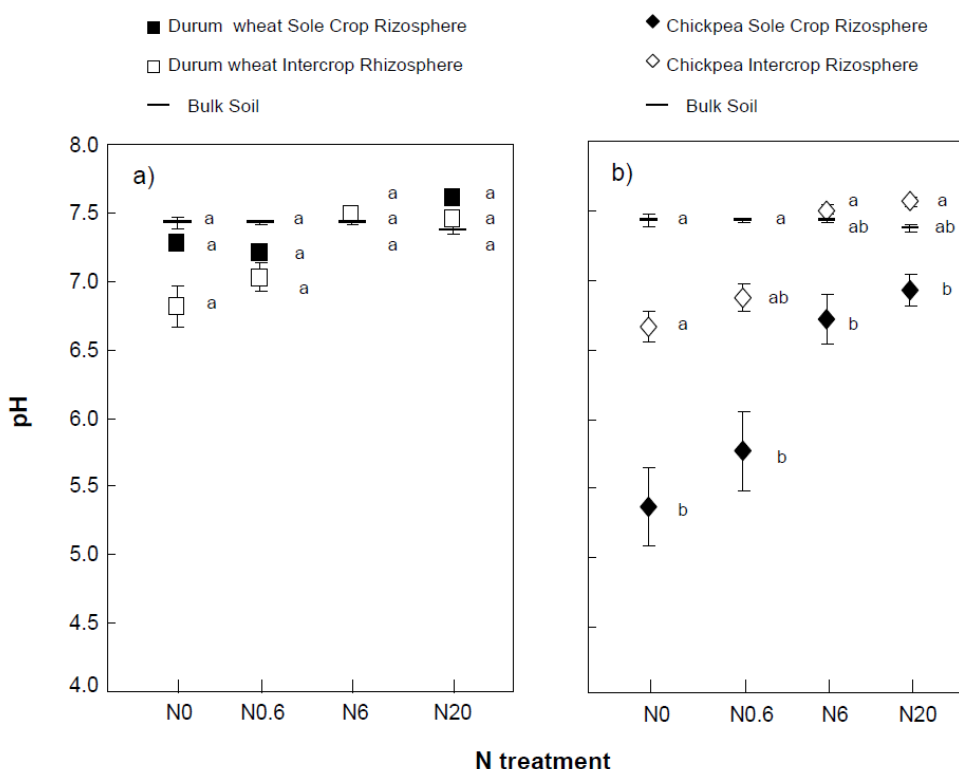
N treatment	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot N (mg g <sup>-1</sup> )	Root N (mg g <sup>-1</sup> )	Total N content (mg)	Shoot N (mg g <sup>-1</sup> )	Root N (mg g <sup>-1</sup> )	N content (mg)
N0	Reference	58.6 $\pm$ 0.7	33.6 $\pm$ 1.2	22.8 $\pm$ 2.7 a	21.7 $\pm$ 0.7	26.8 $\pm$ 0.9	39.7 $\pm$ 2.8 c
	Sole crop	12.7 $\pm$ 0.3 *	11.6 $\pm$ 0.5	18.9 $\pm$ 0.4 a	22.7 $\pm$ 1.1	23.3 $\pm$ 0.3	93.2 $\pm$ 8.7 a
	Intercrop	10.3 $\pm$ 0.3	11.9 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 1.3 a	21.2 $\pm$ 0.3	25.3 $\pm$ 0.7	64.4 $\pm$ 1.2 b
N0.6	Reference			22.8 $\pm$ 2.7 a			39.7 $\pm$ 2.8 b
	Sole crop	13.3 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 0.4	21.6 $\pm$ 1.8 a	24.5 $\pm$ 1.4	22.8 $\pm$ 0.6	73.9 $\pm$ 8.4 a
	Intercrop	12.8 $\pm$ 0.6	12.3 $\pm$ 0.5	21.5 $\pm$ 2.7 a	20.6 $\pm$ 1.2	23.6 $\pm$ 0.6	71.2 $\pm$ 5.4 a
N6	Reference			22.8 $\pm$ 2.7 c			39.7 $\pm$ 2.8 c
	Sole crop	23.5 $\pm$ 2.2	16.4 $\pm$ 0.6 *	37.2 $\pm$ 2.3 b	28.3 $\pm$ 1.4*	22.6 $\pm$ 0.4	102.1 $\pm$ 7.6 a
	Intercrop	26.6 $\pm$ 0.2	19.4 $\pm$ 1.1	46.2 $\pm$ 1.3 a	19.7 $\pm$ 1.9	23.4 $\pm$ 0.7	73.8 $\pm$ 7.9 b
N20	Reference			22.8 $\pm$ 2.7 b			39.7 $\pm$ 2.8 c
	Sole crop	33.6 $\pm$ 0.5	29.3 $\pm$ 1.2	61.2 $\pm$ 3.0 a	33.0 $\pm$ 0.6*	26.0 $\pm$ 0.8	110.5 $\pm$ 7.6 a
	Intercrop	33.2 $\pm$ 0.4	31.3 $\pm$ 1.5	63.2 $\pm$ 7.3 a	26.0 $\pm$ 0.9	25.3 $\pm$ 0.2	96.5 $\pm$ 11.1 b
N Treatment		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Crop Treatment		n.s.	n.s.	<0.001	<0.001	n.s.	<0.001
Ntreatment Crop xTreatment		n.s.	n.s.	n.s.	0.03	n.s.	n.s.

### I.3.2. Rhizosphere pH

**Table 4.4.** Values of probability of two-way ANOVA (N treatment x Soil treatment) was indicated for rhizosphere taking account bulk soil.

	Durum wheat		Chickpea	
	pH	Water-P (mg kg <sup>-1</sup> )	pH	Water-P (mg kg <sup>-1</sup> )
N Treatment	<0.001	n.s.	<0.001	n.s.
Soil treatment	<0.001	<0.001	<0.001	n.s.
N Treatment x Soil treatment	<0.001	n.s.	<0.001	<0.001

Values of pH were measured in the rhizosphere and in the bulk soil. Bulk soil corresponds to the soil that was kept uncropped. Table 4.4 gives the results of two-way ANOVA with crop treatment and N treatment as factors concerning changes in rhizosphere pH for the two species. The values of rhizosphere pH significantly increased with N addition. The effect of crop treatment on rhizosphere pH depended on N treatment with a change in the trends for N6 treatment.

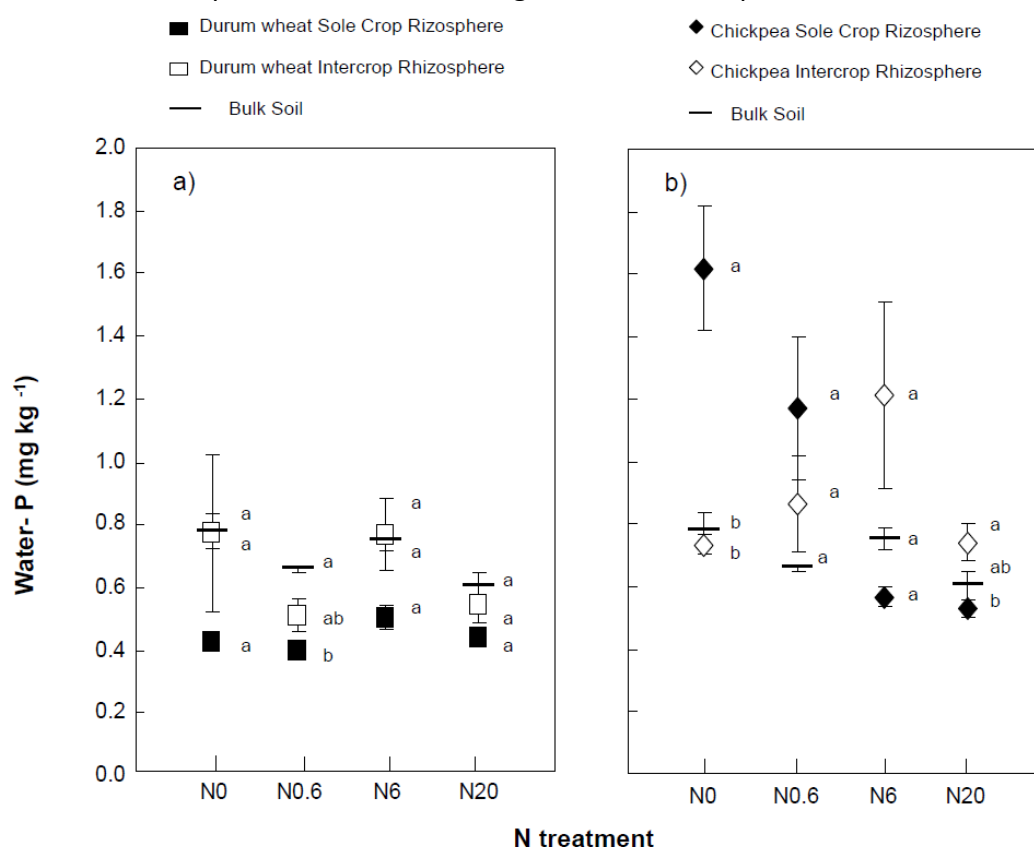


**Figure 4.2.** Values of pH for bulk soil and rhizosphere in different N treatments (a) for durum wheat and (b) for chickpea. Black symbols stand for species in sole crop and open symbols stand for species in intercrop. Values are the mean of 5 replicates. Bars indicate standard errors. Within a N treatment, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

Figure 4.2 shows the pH values obtained for the different crop treatments and N treatments. In the rhizosphere of durum wheat there were no differences between crop treatments and the bulk soil. Chickpea in sole crop decreased pH in its rhizosphere by 2.1 and 1.7 units, for N0 and N0.6 treatments respectively. Rhizosphere pH was lower in sole crop compared to chickpea intercropped with durum wheat for all N treatments except for the N0.6 treatment.

### 1.3.3. Rhizosphere P availability

Phosphorus availability was evaluated through P concentration in water-extracts of rhizosphere and bulk soil. Table 4.4 gives the results of two-way ANOVA with crop treatment and N treatment as factors concerning changes in P concentration in water-extracts measured in the rhizosphere for the two species. Considering durum wheat, crop treatment had a significant effect with values in intercrop in between those of bulk soil and those measured in the rhizosphere of durum wheat grown as sole crop.

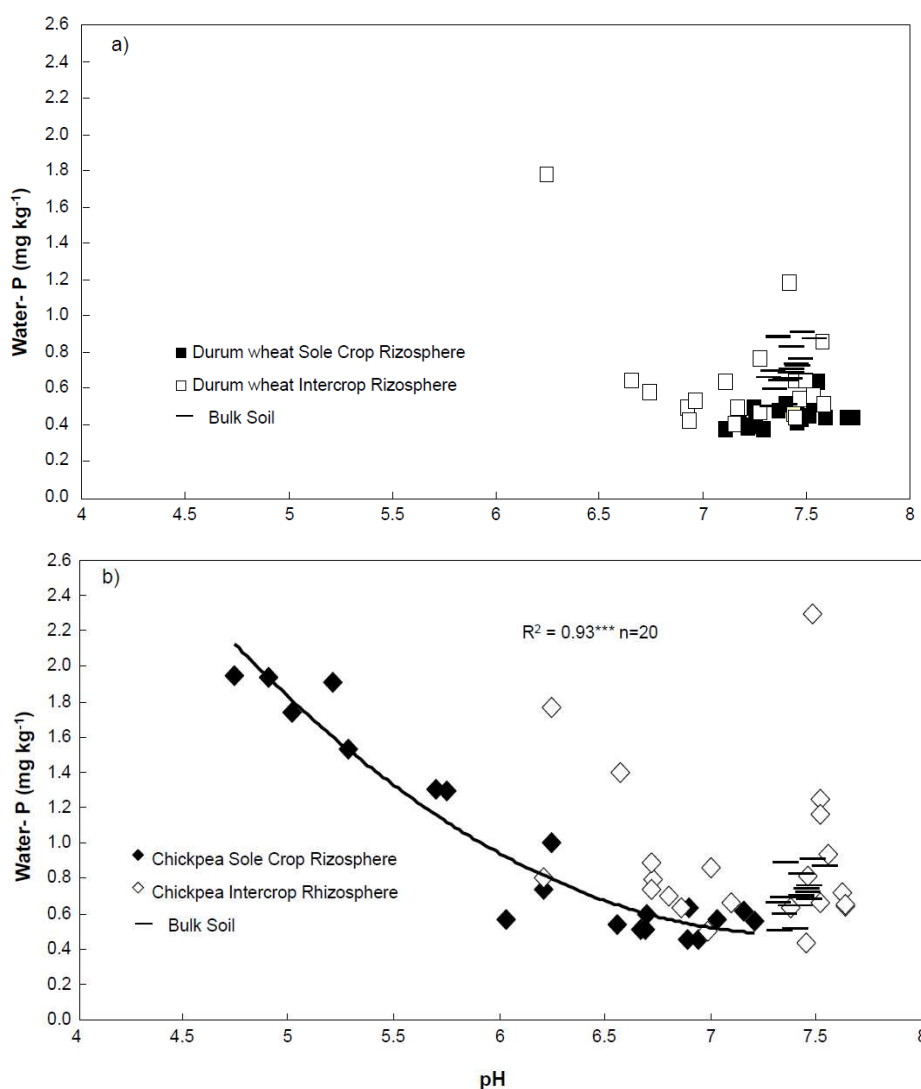


**Figure 4.3.** Values of P concentration in water extracts for bulk soil and rhizosphere in different N treatments (a) for durum wheat and (b) for chickpea. Black symbols stand for species in sole crop and open symbols stand for species in intercrop. Values are the mean of 5 replicates. Bars indicate standard errors. Within a N treatment, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

Figure 4.3 shows the values of P concentrations in water-extracts obtained for the different crop treatments and N treatments. For chickpea, the effect of crop treatment varied depending on N treatment with significant differences observed for the lowest and

the highest treatments. For the N0 treatment, P concentrations in water extracts were 2.2 times higher in the rhizosphere of chickpea in sole crop than either in the bulk soil or in the rhizosphere of chickpea intercropped with durum wheat. For the N20 treatment, values in the rhizosphere of chickpea in sole crop were 1.4 times lower than in the rhizosphere of chickpea intercropped with durum wheat.

#### I.3.4. P availability relative to pH in the rhizosphere



**Figure 4.4.** Relationship between values of P concentration in water extracts and values of pH for bulk soil and rhizosphere for all N treatments were reported (a) for durum wheat and (b) for chickpea. Black symbols stand for species in sole crop and open symbols stand for species in intercrop. Regression was reported for values of chickpea in sole crop.

Values of P concentrations in water-extracts in the rhizosphere and bulk soil were represented relative to values of pH for each treatment in figure 4.4. For durum wheat, values of pH were mainly distributed between 6.5 and 7.7 and those of P concentrations

between 0.4 and 0.7 mg.kg<sup>-1</sup> of soil. There was no relation between P concentration and values of pH. The range of pH obtained for chickpea ranged from 4.8 to 7.8 while P concentrations ranged from 2 to 0.6 mg kg<sup>-1</sup> of soil.

When considering only values for chickpea in sole crop, the P concentration was negatively related to pH with the following regression:

$$P_{eau} = 0.2 pH^2 - 3.5pH + 13.3 \quad R^2 = 0.93^{***} \quad n = 20.$$

#### I.4. Discussion

##### I.4.1. Changes of P availability in the rhizosphere

Substantial increase of P concentration in water extracts (water-P) was observed in the rhizosphere of chickpea when grown as sole crop without NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supply (N0) compared to bulk soil (Figure 4.2). In contrast, a significant decrease was observed in the rhizosphere of wheat in sole crop only for one N fertilization treatment (N0.6). Except for these two cases, our results are in line with previous work of Betencourt et al. (2012). They observed in a pot experiment no significant change in water-P concentration in the rhizosphere of the same species, either intercropped or grown as sole crops in the same P-fertilized soil as the one used in the present experiment, while they showed a systematic increase in the unfertilized treatment (same soil without any P application for 40 years). Our results contradict common knowledge that assumes that depletion of inorganic P occurs in the rhizosphere as a consequence of root uptake combined with restricted diffusion on phosphate ions in the soil solution (as reviewed by Barber, 1995; Hinsinger, 2001; Hinsinger et al., 2011b). The increased P availability in the rhizosphere of chickpea confirmed previous works reporting the same phenomenon for either inorganic P (see review by Hinsinger, 2001; Cu et al., 2005; Devau et al., 2010, 2011b; Betencourt et al., 2012) or organic P (Chen et al., 2002; Li et al., 2008; Vu et al., 2008). Measurement of P concentration gradients in the rhizosphere showed sometimes complex profiles with depletion occurring close to the root surface and accumulation farther away (Hübel and Beck, 1993; Hinsinger and Gilkes, 1996; Hinsinger et al., 2005). Modelling suggested that such an increase in P concentration in soil resulted from root-borne processes counterbalancing the depletion effect induced by the uptake by roots, such as the exudation of a P-solubilizing compound such as protons or carboxylates (Nye, 1983; Geelhoed et al., 1999; Hinsinger et al. 2011b). In addition to the uptake of P, Devau et al. (2011) showed for durum wheat in the same soil as used in the present experiment that on top of root-induced pH change resulting from the exudation of hydroxyls, the uptake of calcium (Ca) had also to be accounted for to adequately simulate the observed increase in rhizosphere P availability.

Contrary to most previous works on intercrops, our experimental set-up allowed us to compare the rhizosphere for each species when grown as sole crop and intercropped. For the two lower N fertilization treatments (N0 and N0.6) where there was a strong N limitation

for durum wheat considering the values of N observed in the biomass, values of P concentration in the rhizosphere of the intercropped species were somewhere in between those observed in sole crops (Figure 4.3). Those results are in line with what was formerly observed in intercropping experiments. Cu et al. (2005) reported intermediate concentration for P in water- and citric acid-extractable fractions in the rhizosphere of bread wheat (*Triticum aestivum* L.)-white lupin (*Lupinus albus* L.) intercrop compared to the sole crops. In their mini-rhizobox experiment Li et al. (2008) also reported intermediate values in the rhizosphere of intercropped durum wheat-common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for different extractable P fractions, inorganic or organic, obtained by sequential extraction. For the two higher N fertilization treatments, P concentration in the rhizosphere of intercropped species tended to be higher than those observed for durum wheat and chickpea grown as sole crops, but the difference was seldom significant (Figure 4.3). It shall be noted that durum wheat significantly enhanced P availability in the rhizosphere of the intercropped chickpea for the highest N fertilization treatment. Our sampling strategy consisting in separating the rhizosphere of the two species in intercropping may have helped detecting this intercropping effect compared to previous studies. Similar results were observed by Betencourt et al. (2012) in a pot experiment showing higher values of P concentration in water extracts in the rhizosphere of intercropped durum wheat and chickpea.

Intercropping affected differently the availability of P in the rhizosphere of the two considered species. For durum wheat intercropped with chickpea, higher values of P concentration were observed in the rhizosphere compared to durum wheat grown as sole crop whatever the N fertilization regime. For chickpea, the effect of the intercropped durum wheat depended on the N fertilization treatment (with a shift occurring between N0.6 and N6 treatments). Significant differences were only observed for the two extreme N fertilization treatments, with higher values when chickpea was intercropped with durum wheat at high N supply (N20 treatment), and lower values when no N was supplied (N0 treatment). This suggests that intercropping affected the rhizosphere processes of each species and/or their effect on P availability.

The root activity of intercropped species had thus different effect on P availability along the N fertilization gradient. No change was observed for durum wheat contrary to chickpea which yielded a substantial increase of P availability in sole crop when no N was supplied (N0 treatment). The opposite trend was observed at the other end of the N fertilization gradient. These results contradicted the “stress gradient hypothesis” proposed in ecology for natural ecosystem. This hypothesis states the prevalence of positive interactions (*i.e.* facilitation), relative to negative interactions (*i.e.* competition) is greater in stressful environments, for instance when resource availability is low (Maestre et al., 2009; Le Roux and Mc Geoch, 2010). Studies that observed this trend in agroecosystem for intercrops differ for several parameters as the nature of the stress gradient involved (*e.g.* N vs P availability), the nature of interacting species, the performance measured or also the time when the performance are measured (Li et al. 2007; Bedoussac et al. 2010).

#### 1.4.2. Changes of pH in the rhizosphere

Substantial acidification was observed in the rhizosphere of chickpea, amounting up to a decrease of 2 pH units when no N (N0 treatment) or little N (N0.6 treatment) was supplied (Figure 4.2). This result is in line with what is usually expected for N<sub>2</sub>-fixing legumes (Hinsinger et al., 2003). In their mini-rhizobox experiment, Li et al. (2008) observed such a decrease with common bean. The plants were inoculated before being transferred onto the soil and presented large numbers of active nodules. Most of the N uptake achieved by chickpea when no N (N0 treatment) or little N (N0.6 treatment) was supplied was obviously originating in N<sub>2</sub> fixation as virtually no N was derived from the soil, as suggested by the insignificant change of N content of durum wheat plants in such N treatments (Table 4.3). No significant alkalization was observed in the rhizosphere of durum wheat or chickpea irrespective of N fertilization treatment. In contrast, Devau et al. (2010) observed a significant alkalization in the rhizosphere of durum wheat fed with 6 mM of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in a mini-rhizobox experiment with the same Luvisol. They however used a slightly different experimental set-up and durum wheat cultivar.

We observed differences in root-induced pH changes along the gradient of N fertilization. Irrespective of plant species or crop treatment pH increased in the rhizosphere with increasing addition of N as NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. More precisely we observed a change in trend for the treatment N6 where values of rhizosphere pH tended to reach bulk soil values or even be higher in durum wheat or intercropped chickpea. Similar increase in pH in the rhizosphere with addition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was reported for cereals (Gahoonia et al., 1992; Zhang et al., 2004) and legumes (Tang et al. 1999; Leidi and Rodríguez-Navarro, 2000). Such root-induced changes in pH were explained by the influence of N nutrition on the cation-anion balance and its driving effect on exudation of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> by the roots, associated for legumes with the inhibition of N<sub>2</sub> fixation activity by excess NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Hinsinger et al., 2003).

The effect of intercropping on root-induced pH changes in the rhizosphere depended on N treatment. For durum wheat values tended to be lower when intercropped with chickpea. In contrast, chickpea showed higher values of rhizosphere pH when intercropped with durum wheat. Intermediate values of pH were reported in the rhizosphere of intercropped species (Cu et al., 2005; Li et al. 2008). As for P availability our cropping device allowed us to observe the differential response of each species to intercropping. The effect of intercropping was more marked for chickpea that showed significant differences (Figure 4.2). It suggests a greater influence of the root activity of durum wheat on the rhizosphere biogeochemical properties of the intercropped chickpea than that of chickpea on intercropped wheat. The significant decrease in rhizosphere acidification of the intercropped chickpea may be induced either by an increased NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake and/or decreased N<sub>2</sub> fixation in the presence of intercropped durum wheat. This contradicts what was observed by Li et al. (2008) in their mini-rhizobox experiment where common bean exhibited a greater H<sup>+</sup> exudation rate (and presumably N<sub>2</sub> fixation) when intercropped with durum wheat. Li et al. (2008) suggested that it was possibly due to the strong competition for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by the cereal, thus



resulting in lower  $\text{NO}_3^-$  concentration and hence improved  $\text{N}_2$  fixation of the intercropped legume as reported by different field experiments (Corre-Hellou et al., 2006; Li et al., 2009; Bedoussac and Justes, 2010). Because of our experimental set-up and the multiple source of N used during hydroponic and soil culture stages we were not able to use  $^{15}\text{N}$  abundance to quantify  $\text{N}_2$  fixation. However, when no N was supplied, the soil  $\text{NO}_3^-$  pool was probably too little as no significant uptake of N occurred for durum wheat, based on N contents in the whole plants (Table 4.3). We may assume that virtually no N was taken up from the soil, and hence the entire quantity of N that accumulated in the chickpea was most probably the result of  $\text{N}_2$  fixation. This was significantly decreased in the intercropped chickpea (24.7 mg N per plant), relative to the sole crop in the N0 treatment (53.5 mg N per plant), the reason for such a decrease being possibly the lesser P availability observed in the rhizosphere of the intercropped chickpea (Fig. 4.2) and subsequently decreased P uptake, which occurred to be significant only when chickpea was grown as sole crop (Table 4.2).

#### 1.4.3. Relationship between root-induced changes of pH and P availability

Considering the rhizosphere of chickpea grown as sole crop the relation obtained between concentrations of P measured in water extract and the values of pH indicated that root-induced changes in pH was a prominent rhizosphere process driving P availability. We observed an increase of P availability with decreasing values of pH in the rhizosphere (Fig. 4.4). The observed increase in P availability with decreasing pH is in line with common knowledge assuming that acidification can increase P availability in neutral to alkaline soils. It is usually proposed that a decrease of pH can alter P availability through either dissolution of P-minerals such as Ca phosphates or desorption of phosphate ions bound onto soil constituents (Hinsinger, 2001; Richardson et al., 2009).

The relationship between water-P concentration and pH values in the rhizosphere of chickpea grown as sole crop showed a steep decrease below pH values about 6 and little effect for values close to neutrality (above 6.5). These results confirmed the relationship obtained by adding known amounts of  $\text{H}^+$  or  $\text{OH}^-$  in the same soil (Devau et al., 2011a). These authors accurately simulated this relationship with a mechanistic adsorption model and concluded that adsorption-desorption was the main biogeochemical process involved in the pH-control of P availability in this soil.

However, a decrease of rhizosphere pH below 6 was only achieved by chickpea when grown as sole crop at low levels of N addition. The other crop treatments yielded values of rhizosphere pH ranging from 6.5 to 7.5, *i.e.* in the zone where no changes of P availability are expected to occur. In these treatments, which comprise all the durum wheat treatments and the chickpea treatments at the two highest N additions (N6 and N20), there was a consistent trend towards enhanced P availability in the rhizosphere of intercropped species, compared with that of sole crops (Fig. 4.3 and 4.4). As there was no significant rhizosphere pH change in these various treatments, relative to bulk soil, this suggests that other processes than pH change was involved in the observed increase of rhizosphere P availability in intercrops,

which is in line with previous results of a pot experiment on durum wheat-chickpea intercrop (Betencourt et al., 2012). Roots have the ability to alter P availability in their rhizosphere through different processes in addition to P uptake and rhizosphere pH changes, such as the exudation of different P mobilizing compounds or the uptake of other nutrients such as Ca (Hinsinger et al., 2011b), but also due to root-induced changes in the structure and activity of microbial communities in the rhizosphere (Richardson et al., 2009; Hinsinger et al., 2011a and b). The role of phosphatase-like-enzymes has been previously proposed for wheat-chickpea intercrops (Li et al., 2003, 2004). Nevertheless, in our experiment the intercropping did not increase the amount of P taken up either on a per plant basis (Table 4.2) or considering the total amount of P taken up per mini-rhizobox (supplementary data, table.4.A.1). Conversely, we observed a significant decrease of P content per plant when chickpea was intercropped with durum wheat in the N0 and N6 treatments. There was however little difference in P status across crop treatments, which may have influenced the quality and quantity of root exudates and explain the enhanced P availability observed for the intercropped species (except for chickpea at low N supply).

#### I.4.4. Plant growth and nutrition

In their mini-rhizobox experiment on durum wheat-bean intercrop, Li et al. (2008) reported facilitation of the growth of the cereal when intercropped with the legume, but they could not demonstrate enhanced P nutrition in the intercrop. No such positive interaction was observed in our mini-rhizobox experiment. We actually observed the opposite when no N was added, with lower values of biomass of intercropped plants compared to sole crops (Table 4.1). While differences for chickpea may be related to P availability in the rhizosphere (see below), for durum wheat this is more difficult to interpret. The slight difference observed in shoot biomass may be related to the slightly higher N concentration in shoots observed in sole crop for this N treatment.

The values of shoot P concentration were slightly below the critical values reported for P deficiency of 2.2 mg g<sup>-1</sup> and 1.5-2.0 mg g<sup>-1</sup> respectively for durum wheat and chickpea at a similar growth stage (Reuter and Robinson, 1997). Neither the addition of N nor cropping treatment affected P concentration for any of the two species. The P contents in the whole plants were seldom significantly different from those obtained in reference plants (prior to transfer into the mini-rhizoboxes), suggesting that the quantity of P in soil that plants could access to was limiting for crop growth. Contrary to former studies (Li et al., 2003; Li et al., 2004; Cu et al., 2005) intercropping did not enhance P nutrition of the species. Contrary to P facilitation, we observed a significantly higher P content in chickpea when grown in sole crop for the treatment without N fertilization (N0). This lower P content of chickpea when intercropped with durum wheat was not associated with enhanced P nutrition of the associated durum wheat, which might have occurred due to competition for P. It is however in good agreement with the lower P availability (Fig. 4.3) and acidification (Fig. 4.2) in the rhizosphere of chickpea when intercropped with durum wheat. When grown as sole crop

without N addition, chickpea may have performed better at fixing  $N_2$  and thus achieving better plant growth and larger P uptake as related to enhanced rhizosphere acidification and enhanced soil P availability.

Contrary to P nutrition, N nutrition was significantly affected by the different treatments. Species responded positively to addition of N, displaying an enhanced N content with significant N uptake. The values of N concentration obtained for N0 and N0.6 corresponded to the ones obtained by Betencourt et al. (2012) in their pot experiment on durum wheat-chickpea intercrop in the same soil for similar amount of N added. But contrary to these authors and most of cereal-legume intercrop studies we did not observe enhanced N nutrition of the intercropped cereal for these two N treatments (Table 4.3). This phenomenon is usually reported to occur especially at low N fertilization rates as related to resource partitioning: the  $N_2$  fixation activity of the legume is usually enhanced and the cereal has therefore access to a greater pool of soil mineral N on a per plant basis than when grown as sole crop (Willey, 1979; Jensen, 1996; Hauggaard-Nielsen et al., 2003). However, such process could hardly occur in our mini-rhizobox set up when no N was supplied by the nutrient solution as the amount of soil mineral N was far too small to cope with plant demand. Indeed, no significant uptake of N occurred for the cereal in the N0 and N0.6 treatments. In contrast we observed a significant increase of N concentration in roots and N taken up by the cereal when intercropped with chickpea at intermediate level of N supply (N6). For the treatment N20, no such effect was found, the amount of N added having possibly masked the positive effect of intercropping. Thus, our results contradict the stress-gradient hypothesis that predicts that positive interactions should be more pregnant in harsh environments.

### **1.5. Conclusions**

The aim of this study was to determine the influence of plant species interactions on P acquisition in a cereal-legume intercrop. We focused on root-induced changes in pH in the rhizosphere and their influence on P availability.

Values of pH in the rhizosphere of durum wheat and chickpea when intercropped were intermediate to those observed in sole crops. Root-induced pH changes resulted from the root activity of the two species that was modified when intercropped. The availability of P in the rhizosphere increased with decreasing pH in the acidic pH range ( $pH < 6$ ) which was achieved in the rhizosphere of chickpea grown as sole crops at low levels of N addition. For rhizosphere  $pH > 6.5$ , pH did not seem to rule P availability anymore. In those treatments which resulted in neutral rhizosphere pH, P availability tended to be enhanced in the rhizosphere of intercrop, especially for the highest N treatment (N20). It supposes that other root-borne processes than root-induced pH changes determined such changes of P availability as a consequence of interactions between durum wheat and chickpea.

Our results suggested that for this soil, P facilitation through acidification of the rhizosphere may only happen for very low values of pH. No increase of P availability was achieved in

intercrop due to rhizosphere acidification in this soil and experimental set-up (mini-rhizobox). Effect of species interactions when intercropped on changes in pH in the rhizosphere did not result in sufficient acidification to induce a substantial increase in P availability as observed for chickpea in sole crop. If root-induced changes in pH cannot be totally excluded as a factor influencing P availability, other root-borne processes were involved to explain the observed increase of P availability in the rhizosphere of intercropped species compared to sole crop for the higher N treatments.

No facilitation was observed considering either P uptake or plant growth. The opposite was observed for chickpea in sole crop, which presented higher biomass, N and P contents than chickpea intercropped with durum wheat when no N was added. These results seem to be mainly related to the higher N<sub>2</sub> fixation achieved, and hence greater rhizosphere acidification and resulting P availability in the rhizosphere of chickpea when grown as sole crop.

### Aknowlegment

Financial support for the experimental costs was provided by ANR (Agence Nationale de la Recherche) SYSTERRA programme ANR-08-STRA-11 (PerfCom).

### References

- AFNOR. 1969. Dosage spectrophotométrique de l'anhydride phosphorique: méthode vanadomolybdique. AFNOR, Paris, 242-246 pp.
- Barber, S. A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. Wiley, New York 384pp.
- Bedoussac, L. Justes E. 2010. Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. *Plant and Soil* 330:37-54.
- Betencourt, E., Duputel M., Colomb B., Desclaux D., Hinsinger P. 2012. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biology and Biochemistry* 46:181-190.
- Callaway, R. M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61:306-349.
- Chen, C. R., Condon L. M., Davis M. R., Sherlock R. R. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology & Biochemistry* 34:487-499.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J. M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Cordell, D., Drangert J. O., White S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* 19:292-305.

- Corre-Hellou, Fustec G., J., Crozat Y. 2006. Interspecific competition for soil N and its interaction with N<sub>2</sub> fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant and Soil* 282:195-208.
- Cu, S. T. T., Hutson J., Schuller K. A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.
- Dakora, F. D. Phillips D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245:35-47.
- Dawson, C. J. Hilton J. 2011. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36:S14-S22.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Colomb B., Gerard F. 2011a. Fertilization and pH effects on processes and mechanisms controlling dissolved inorganic phosphorus in soils. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 75:2980-2996.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gerard F. 2011b. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil* 348:203-218.
- Fan, X. H., Tang C., Rengel Z. 2002. Nitrate uptake, nitrate reductase distribution and their relation to proton release in five nodulated grain legumes. *Annals of Botany* 90:315-323.
- FAO-UNESCO, 1989. Soil map of the world at 1: 5 000 000, third ed. FAO Press, Paris.
- Fridley, J. D. 2001. The influence of species diversity on ecosystem productivity: how, where, and why? *Oikos* 93:514-526.
- Gahoonia, T.S., Claassen N., Jungk A. 1992. Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant and Soil* 140: 241–248.
- Harmsen, J. 2007. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* 36:1420-1428.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus P., Jensen E. S. 2003. The comparison of nitrogen use and leaching in sole cropped versus intercropped pea and barley. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 65:289-300.
- Hinsinger, P., Gilkes R. J. 1996. Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science* 47:533-544.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C. X., Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* 248:43-59.

- Hinsinger, P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168:293-303.
- Hinsinger, P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J. B., Tang X. Y., Zhang F. S. 2011a. P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Hinsinger, P., Brauman A., Devau N., Gerard F., Jourdan C., Laclau J.P., Le Cadre E., Jaillard B., Plassard C. 2011b. Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? *Plant and Soil* 348:29-61.
- Hübel, F., Beck E. 1993. In situ determination of the P-relations around the primary root of maize with respect to inorganic and phytate-P. *Plant and Soil* 157:1-9.
- ISO/DIS. 2006. 17402: Soil quality. Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. ISO, Geneva, Switzerland.
- Jensen, E. S. 1996. Grain yield, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. *Plant and Soil* 182:25-38.
- Johnson, A. H., Frizano J., Vann D. R. 2003. Biogeochemical implications of labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure. *Oecologia* 135:487-499.
- Lambers, H., Shane M. W., Cramer M. D., Pearse S. J., Veneklaas E. J. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany* 98:693-713.
- Le Roux, P. C., McGeoch M. A. 2010. Interaction intensity and importance along two stress gradients: adding shape to the stress-gradient hypothesis. *Oecologia* 162:733-745.
- Leidi, E. O., Rodriguez-Navarro D. N. 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. *New Phytologist* 147:337-346.
- Li, L., Tang C. X., Rengel Z., Zhang F. S. 2003. Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat from an organic phosphorus source. *Plant and Soil* 248:297-303.
- Li, S. M., Li L., Zhang F. S., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297-303.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11192-11196.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Clairotte M., Drevon J. J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139-150.

- Li, Y.Y., Yu C.B., Cheng X., Li C.J., Sun J.H., Zhang F.S., Lambers H., Li L. 2009. Intercropping alleviates the inhibitory effect of N fertilization on nodulation and symbiotic N<sub>2</sub> fixation of faba bean. *Plant and Soil* 323:295-308.
- Loreau, M., Hector A. 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412:72-76.
- Lynch, J. P. 2007. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* 55:493-512.
- Maestre, F. T., Callaway R. M., Valladares F., Lortie C. J. 2009. Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97:199-205.
- Mann, A., Nandwal A. S., Kundu B. S., Sheokand S., Kumar B., Datta D., Sheoran A. 2001. Effect of nitrate and aminoethoxyvinylglycine on *Cicer arietinum* L. nodules. *Biologia Plantarum* 44:131-135.
- Naudin, C., Corre-Hellou G., Pineau S., Crozat Y., Jeuffroy M.H. 2010. The effect of various dynamics of N availability on winter pea-wheat intercrops: Crop growth, N partitioning and symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Field Crops Research* 119:2-11.
- Neumann, G., Römheld V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* 211:121-130.
- Nuruzzaman, M., Lambers H., Bolland M. D. A., Veneklaas E. J. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* 281:109-120.
- Nye, P. H. 1983. The diffusion of 2 interacting solutes in soil. *Journal of Soil Science* 34:677-691.
- Ofori, F., Stern, W.R., 1987. Cereal-legume intercropping systems. *Advance in Agronomy* 41:41-90.
- Ohno, T., Zibilske, L. 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal* 55:892-895.
- Olsen, S.R., Cole C.V., Watanabe W.S., Dean, L. A., 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular 939, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Pearse, S. J., Veneklaas E. J., Cawthray G. R., Bolland M. D. A., Lambers H. 2006. Carboxylate release of wheat, canola and 11 grain legume species as affected by phosphorus status. *Plant and Soil* 288:127-139.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:665-693.
- Raynaud, X. 2010. Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model. *Soil Biology and Biochemistry* 42:210-219.
- Rengel, Z., Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168:305-312.

- Reuter, J.B., Robinson, D.J., (Eds) 1997. Plant analysis: an interpretation manual, second ed. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia 450pp.
- Richardson, A. E., Barea J.M., McNeill A. M., Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339.
- Richardson, A. E., Lynch J. P., Ryan P. R., Delhaize E., Smith F. A., Smith S. E., Harvey P. R., Ryan M. H., Veneklaas E. J., Lambers H., Oberson A., Culvenor R. A., Simpson R. J. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil* 349:121-156.
- Song, Y. N., Zhang F. S., Marschner P., Fan F. L., Gao H. M., Bao X. G., Sun J. H., Li L. 2007. Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 43:565-574.
- Tang, C., McLay C. D. A., Barton L. 1997. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37:563-570.
- Tang, C., Unkovich M. J., Bowden J. W. 1999. Factors affecting soil acidification under legumes. III. Acid production by N<sub>2</sub>-fixing legumes as influenced by nitrate supply. *New Phytologist* 143:513-521.
- Vance, C. P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiology* 127:390-397.
- Veneklaas, E. J., Stevens J., Cawthray G. R., Turner S., Grigg A. M., Lambers H. 2003. Chickpea and white lupin rhizosphere carboxylates vary with soil properties and enhance phosphorus uptake. *Plant and Soil* 248:187-197.
- Voisin, A. S., Salon C., Munier-Jolain N. G., Ney B. 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 243:31-42.
- Vu, D. T., Tang C., Armstrong R. D. 2008. Changes and availability of P fractions following 65 years of P application to a calcareous soil in a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 304:21-33.
- Wang, D., Marschner P., Solaiman Z., Rengel Z. 2007. Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology and Biochemistry* 39:249-256.
- Wang, Y., Marschner P., Zhang F. 2012. Phosphorus pools and other soil properties in the rhizosphere of wheat and legumes growing in three soils in monoculture or as a mixture of wheat and legume. *Plant and Soil* 354:283-298.
- Willey, R., 1979. Intercropping-its importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstracts* 32:1-10.



Zhang, F. C., Kang S. Z., Zhang J. H., Zhang R. D., Li F. S. 2004. Nitrogen fertilization on uptake of soil inorganic phosphorus fractions in the wheat root zone. *Soil Science Society of America Journal* 68:1890-1895.

## Appendix. Supplementary data

**Table 4.A.1.** Total biomass, P content and N content considering each rhizobox device in different treatments. Values represent the mean of five replicates  $\pm$  SE (standard errors). For a given species and crop treatment, different letters indicate significant difference between crop treatments (intercrop vs sole crops) ( $P < 0.05$ ).

N treatment		Total biomass (mg g <sup>-1</sup> )	P content (mg)	N content (mg)
	Durum Wheat Sole crop	1.9	10.5	91.1
	Reference Chickpea Sole crop	3.3	10.4	79.4
	Reference Intercrop	2.6	10.4	85.2
N0	Durum Wheat Sole crop	6.1 $\pm$ 0.2 a	11.9 $\pm$ 0.2 a	75.1 $\pm$ 1.6 b
	Chickpea Sole crop	8.1 $\pm$ 0.6 a	16.9 $\pm$ 1.9 a	186.3 $\pm$ 17.3 a
	Intercrop	5.4 $\pm$ 0.2 a	11.1 $\pm$ 0.5 a	93.5 $\pm$ 4.9 b
N0.6	Durum Wheat Sole crop	6.6 $\pm$ 0.4 a	12.8 $\pm$ 0.8 a	86.5 $\pm$ 7.4 b
	Chickpea Sole crop	6.3 $\pm$ 0.7 a	12.5 $\pm$ 1.2 a	147.7 $\pm$ 16.8 a
	Intercrop	6.7 $\pm$ 0.5 a	13.3 $\pm$ 1.0 a	114.3 $\pm$ 6.5 a
N6	Durum Wheat Sole crop	7.3 $\pm$ 0.7 a	13.8 $\pm$ 0.8 a	148.9 $\pm$ 9.1 b
	Chickpea Sole crop	8.1 $\pm$ 0.5 a	15.5 $\pm$ 1.1 a	204.1 $\pm$ 15.2 a
	Intercrop	7.3 $\pm$ 0.4 a	13.1 $\pm$ 0.8 a	166.1 $\pm$ 10.3 ab
N20	Durum Wheat Sole crop	7.6 $\pm$ 0.3 a	15.2 $\pm$ 1.4 a	244.7 $\pm$ 12.2 a
	Chickpea Sole crop	7.5 $\pm$ 0.5 a	14.1 $\pm$ 1.0 a	220.9 $\pm$ 15.2 a
	Intercrop	7.6 $\pm$ 0.6 a	14.4 $\pm$ 1.1 a	222.9 $\pm$ 15.8 a

## CHAPITRE V

### **Interactions entre blé dur et pois chiche en culture associée et acquisition de phosphore : influence de la proximité des racines**

Les chapitres précédents ont permis de souligner l'importance des caractéristiques du sol dans la détermination de la disponibilité de P en réponse à l'activité racinaire. Ainsi nous avons pu mettre en évidence le rôle clé des modifications de pH dans les variations de disponibilité en P comme précédemment montré par Devau et al. (2010, 2011) sur le même sol. Pour le sol étudié, une acidification de la rhizosphère suite à l'activité fixatrice de N<sub>2</sub> de la légumineuse comme une alcalinisation de la rhizosphère (*e.g.* inhibition de la fixation de N<sub>2</sub>) peuvent aboutir à une augmentation de la disponibilité en P et *in fine* à l'amélioration de l'acquisition de P par les espèces en association. Néanmoins, les modifications de pH ne sont pas le seul processus rhizosphérique pouvant être proposé comme mécanisme de facilitation.

La mise en place d'interactions entre plantes suppose la superposition de leurs zones d'influence respectives (Huston et De Angelis, 1994 ; Rubio et al., 2001 ; Casper et al., 2003 ; Berger et al., 2006 ; Raynaud et al., 2008 ; Armas et Pugnaire, 2011). Dans le cas des nutriments, cela revient à considérer le recouvrement des rhizosphères qui est influencée par l'organisation spatiale des systèmes racinaires (*i.e.* architecture racinaire) ainsi que par l'extension radiale des nombreux gradients de solutés prélevés et exsudés par les racines. Cette dernière est déterminée par les caractéristiques des solutés et leur transport par diffusion et par les mouvements d'eau dans le sol (Hinsinger et al., 2005 ; Darrah et al., 2006 ; Raynaud, 2010).

L'objectif de ce chapitre est donc de déterminer l'extension de la rhizosphère des espèces associées et l'effet de leur degré de superposition sur les interactions pour le P, en relation avec les modifications de pH induites par les racines. Autrement dit l'article intitulé « How far root-induced pH changes can extend the rhizospheres of durum wheat and chickpea in intercrop and influence interactions for soil phosphorus acquisition? » évalue l'influence de la distance entre les racines des espèces en associations sur la disponibilité en P dans la rhizosphère et le partage du P. Cette étape a été réalisée en conditions contrôlées à partir de dispositifs de type mini-rhizobox adaptés pour permettre de tester différentes épaisseurs de sol séparant les systèmes racinaires des espèces et de mesurer des gradients de concentrations en P et le pH. Cet article est prévu d'être soumis à la revue *Soil Biology and Biochemistry*.

**Références bibliographiques**

- Armas, C., Pugnaire F. I. 2011. Belowground zone of influence in a tussock grass species. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 37:284-289.
- Berger, A. G., McDonald A. J., Riha S. J. 2006. Scaling plant size to below-ground zone of influence in annuals under contrasting competitive environments. *Functional Ecology* 20:770-777.
- Casper, B. B., Schenk H. J., Jackson R. B. 2003. Defining a plant's belowground zone of influence. *Ecology* 84:2313-2321.
- Darrah, P. R., Jones D. L., G. J. D. Kirk, Roose T. 2006. Modelling the rhizosphere: a review of methods for 'upscaling' to the whole-plant scale. *European Journal of Soil Science* 57:13-25.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gerard F. 2011. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil* 348:203-218.
- Hinsinger, P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168:293-303.
- Huston, M. A. Deangelis D. L. 1994. Competition and coexistence-The effects of resource transport and supply rates. *American Naturalist* 144:954-977.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P. W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient Bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. *American Naturalist* 171:44-58.
- Raynaud, X. 2010. Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model. *Soil Biology and Biochemistry* 42:210-219.
- Rubio, G., Walk T., Ge Z. Y., Yan X. L., Liao H., Lynch J. P. 2001. Root gravitropism and below-ground competition among neighbouring plants: A modelling approach. *Annals of Botany* 88:929-940.

## I. How far root-induced pH changes can extend the rhizospheres of durum wheat and chickpea in intercrop and influence interactions for soil phosphorus acquisition?

Elodie Betencourt <sup>a,b</sup>, Hada Damar Houssen <sup>a,c</sup>, Christina Schreiber <sup>a,d</sup>, Philippe Hinsinger <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>b</sup> Montpellier SupAgro, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>c</sup> IRD, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

<sup>d</sup> CIRAD, UMR Eco&Sols, 34060 Montpellier, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 99 61 22 49; fax: +33 4 99 61 30 88.

E-mail address: philippe.hinsinger@supagro.inra.fr (P. Hinsinger).

### Abstract

Mechanisms of facilitation in the rhizosphere have been proposed to explain enhanced P acquisition in cereal-legume intercrops compared to species grown as sole crops. Roots can modify P concentrations in their rhizosphere over a distance depending on the characteristics of soil and solutes. Phosphate ions diffuse to the root surface over a short distance (about 1mm) in response to the uptake activity. Some P mobilizing compounds exuded by roots can diffuse over larger distances and expand the outer boundary of the rhizosphere. Thus, root proximity between species can influence the overlapping of the rhizospheres of intercropped species and their interactions for P acquisition. Durum wheat and chickpea were grown in sole crop and intercropped in a mini-rhizobox device for three distances (3, 5 and 10mm) separating the root mat of the neighbouring plants. The soil was a Luvisol with neutral pH previously characterized for its contrasted response of P availability to root-induced pH changes. Phosphorus concentration and pH gradients were evaluated in the soil in water extracts at a 1-mm scale for the planted and unplanted devices. Plant biomass, P concentration in shoots and roots were measured. No gradient were observed but rather a uniform decrease in P availability and pH compared to the unplanted soil over the entire distance separating the roots. Decreases of pH and P availability were more marked for the intercrop and chickpea in sole crop than for durum wheat. Such decreases of P concentration with pH have been attributed to adsorption processes previously determined as the major mechanism controlling P availability in this soil. No specific changes of biomass, P concentration or P uptake were observed in the plants. Those results suggest that root activity can affect P availability over a large distance and potentially affect P acquisition of intercropped species depending on soil characteristics.

Key words: Rhizosphere, intercrop, P availability, distance, soil pH

### I.1. Introduction

Phosphorus (P) is a major nutrient limiting plant growth in many soils (Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001; Lynch, 2007). The main agricultural practice to overcome such limitation has been the use of fertilizers. Phosphorus fertilizers derive mainly from mined rock phosphates, which are however a finite resource (Cordell et al. 2009; Dawson and Hilton, 2011). Indeed increasing the use of P fertilizers to sustain the growing world food demand is no longer an option (Vance, 2001; Hinsinger et al., 2011; Richardson et al., 2011). New strategies have been proposed to reduce the dependence on P fertilizer and thus to improve the use of soil P by crops. Among them, based on either observations or concepts developed in ecology, cereal-legume intercrops have been put forward as a way to promote positive interactions between species and enhance P acquisition compared to single-species stands that dominate modern agriculture (Vance, 2001; Li et al., 2007; Hinsinger et al., 2011).

The amount of P acquired by plants during a given period of time depends on two components. The first one is relative to the biochemical or chemical fraction of soil P that the plant can access (*i.e.* P availability) and the second concerns the ability of plants to increase the soil volume from which it can acquire available P. Plants can influence P availability in the volume of soil surrounding roots corresponding to the rhizosphere through changes in its biochemical, physical and chemical properties compared to the bulk soil (Darrah, 1993; Hinsinger, 1998). Such changes are induced by roots either directly or indirectly through the stimulation of microbial activities (Hinsinger et al. 2005; Richardson et al. 2009). In addition, the quantity of P that plants can acquire depends on root system architecture, anatomy (*e.g.* root hairs) and morphology (*e.g.* cluster roots), which dramatically influence the size and the geometry of the rhizosphere (Hinsinger et al., 2005; Lynch, 2007). Root-induced changes in chemical properties of the rhizosphere are considered as a main process altering P availability through release of various chemicals by roots or rhizosphere microorganisms: protons/hydroxyls ( $H^+/OH^-$ ), carboxylates and extracellular phosphate-like enzymes (Hinsinger, 2001; Rengel, 2002; Dakora and Phillips, 2005).

The root uptake activity determines the profile of P concentration gradient in the rhizosphere, which is typically characterized by a depletion zone close to the root surface. This gradient develops in response to P-uptake activity when P taken up by roots exceeds the capacity of soil to resupply the soil solution (Darrah, 1993; Jungk et al., 1993; Hinsinger et al., 2005). Considering the high reactivity of phosphate ions with various soil constituents these ions can diffuse over rather small distances in the soil solution. Therefore, the resulting depletion zone has been observed and simulated approximately up to 1mm from the root surface (see Hinsinger et al., 2005 for review). In contrast, a growing number of authors have reported increases in P concentration in the rhizosphere compare to the bulk soil (Bagayoko et al. 2000; see Hinsinger, 2005 for review; Devau et al., 2010; Betencourt et al., 2012). A few studies investigating rhizosphere P concentration gradients reported an accumulation zone away from the root surface (Hübel and Beck, 1993; Hinsinger, 1998). It

suggests that other root-induced process than P-uptake is responsible for counteracting the uptake-driven depletion. Those observed increases in P availability in the rhizosphere have been successfully modelled accounting for root-exudation process (Geelhoed et al., 1999; Dunbabin et al., 2006) and also in interaction with the uptake of another nutrient such as calcium (Devau et al., 2010, 2011). Root exudates, depending on their interactions with soil and microorganisms may diffuse on a longer distance than 1mm from the roots and some are susceptible to diffuse over up to several millimetres (Hinsinger et al., 2005; Raynaud, 2010). Geelhoed et al. (1999) used a mechanistic model, while Nye (1983) had been formerly using a more empirical model to show that the diffusion of an exudate away from the root surface could result in a combination of P depletion at the very surface of the root with slight P accumulation at some distance from the root surface. Consequently interactions between soil properties and plant properties such as P-uptake capacity and either the composition or the amount of exudates released by roots are supposed to determine profiles of P concentration in the rhizosphere.

At the level of plant, differences among genotypes (*i.e.* species, cultivars) in composition and amount of exudates exuded by roots have been proposed as a factor explaining genotypic variations in plant abilities to acquire nutrients (Rengel, 2002; Rengel and Marschner, 2005). At the level of plant community or ecosystem this functional diversity might influence the partitioning of nutrients between genotypes through facilitation mechanisms (Callaway, 1995; Raynaud et al., 2008). Facilitation stands for positive interactions by which one plant enhance the performance (e.g. growth, nutrient uptake) of another plant through changes in its biotic/abiotic environment, ultimately resulting in increased resource availability (Callaway, 1995; Brooker et al., 2008). Such mechanisms have been proposed to explain improved P acquisition of cereal-legume intercrops (see Li et al., 2007 and Hinsinger et al., 2011 and for reviews). As mentioned above, the root-induced processes possibly involved affect P concentration over a rather small distance from roots, and thus root proximity may be a crucial factor influencing the occurrence of positive interactions between intercropped species (Raynaud et al., 2008; Hinsinger et al., 2011). The modelling work of Raynaud et al. (2008) showed in the case of root-exudation of carboxylate (*i.e.* citrate) that P availability was positively affected to an extent that was depending on citrate diffusion in soil solution. Indeed it suggests that such increase in P availability will benefit to the neighbouring species provided that their respective rhizospheres are overlapping (Casper et al., 2003; Raynaud et al., 2008).

Among the different root-exudates possibly involved in P facilitation in cereal-legume intercrops the influence of  $H^+/OH^-$  on species interactions has been poorly documented. Depending on the soil properties and the amount of  $H^+/OH^-$  exuded, roots can strongly modify soil pH in their rhizosphere and thereby result in increased P availability through either dissolution of P minerals or desorption of phosphate ions bound onto different soil constituents (Hinsinger et al., 2003). Because the exudation of  $H^+/OH^-$  is known to be essentially driven by nitrogen nutrition through cation-anion balance one plant may induce

either alkalization or acidification in its rhizosphere depending on the main chemical form of N taken up. Legumes can acidify their rhizosphere to a larger extent due to N<sub>2</sub> fixation (Raven et al., 1990; Hinsinger et al., 2003). In cereal-legume intercrop it is generally suggested that root-induced acidification of the rhizosphere by the legume will increase P availability and ultimately benefit the associated cereal. Such mechanism of facilitation has been proposed and tested for neutral to alkaline soils (Cu et al. 2005; Li et al., 2008). But recent experimental and modelling works showed that in such soils both root-induced acidification and alkalization can increase P availability in the rhizosphere (Devau et al., 2011; Betencourt et al., 2012). Indeed, it suggests that not only the legume but also the cereal may be involved in such pH-mediated mechanisms of facilitation. As stressed above, root proximity can be a key factor determining the occurrence of facilitative mechanism. Considering the higher mobility of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> in the soil solution than other exudates such as carboxylates or extracellular enzymes, which are rapidly adsorbed onto soil surface constituents or metabolized by microorganisms (Hinsinger et al., 2005), H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> exuded by one species may influence the neighbouring species to a much larger distance. Therefore root-exudation of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> could be the mechanism most likely involved in the facilitation of P acquisition by intercropped species.

The aim of the present study was to evaluate the influence of plant species interactions on changes in pH, P availability and ultimately P partitioning in intercropped durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). We assumed that the main rhizosphere process impacting P availability was the root-induced pH changes. Considering the influence of solute (*i.e.* P and H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup>) diffusion in soils on P availability we assumed that the root proximity will affect the intensity of overlapping of the rhizospheres and thus the relative effect of facilitation and competition on P partitioning between intercropped species. To test this hypothesis we measured gradients of pH and P concentrations between the root of these two species and evaluated their effect on P acquisition.

## 1.2. Material and methods

### 1.2.1. Experimental set-up

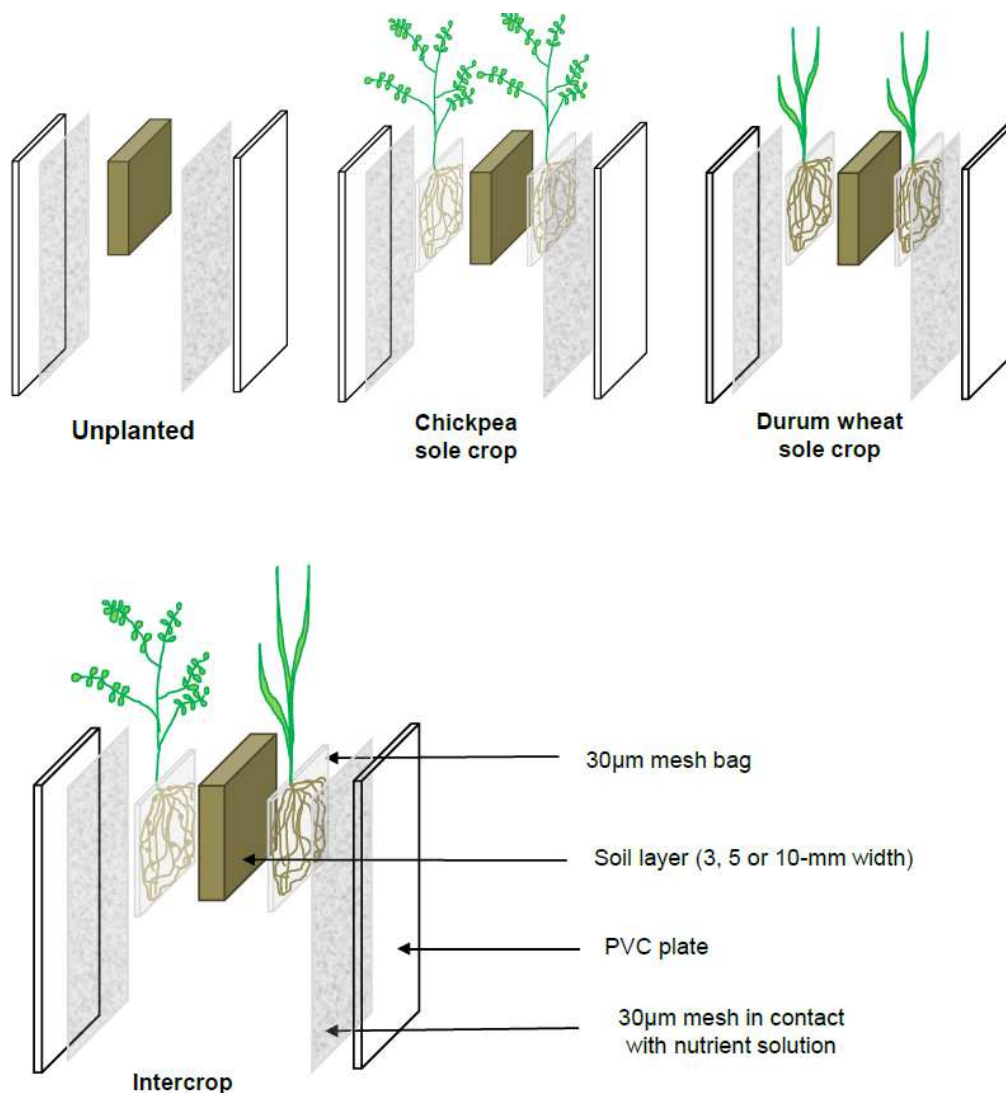
The experiment was conducted using a factorial design with three width treatments and three crop treatments, plus an unplanted control. The first crop treatment corresponded to the intercrop where the two species were grown together and the other crop treatments corresponded to sole crops where each species was grown separately. Width treatment stands for the thickness of the soil layer separating the two root mats, *i.e.* the distance between the roots of neighbouring plants. The three width treatments were chosen to evaluate the effect of different intensities of rhizosphere overlapping between two neighboring plants. The 3-mm width was chosen to enable some overlapping of the two P depletion zones, the two other widths were chosen according to the distance over which H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> can diffuse and influence the biological and chemical properties of the rhizosphere



(e.g. Hinsinger et al., 2005; Raynaud, 2010). Each treatment corresponding to one mini-rhizobox was replicated 3 times and randomized every day during the experiment.

### 1.2.2. Mini-rhizobox device

The plant species were grown in a mini-rhizobox device adapted from Hinsinger and Gilkes (1995). Roots mats were separated from the soil layer by a 30- $\mu$ m polyamide mesh to facilitate the collection of the rhizosphere at the end of the experiment (Fig. 5.1). The thickness of soil separating the two root mats for the crop treatments varied according to the width treatments as presented above. The dimension of the perspex mini-rhizobox was 8 x 8-cm.



**Figure 5.1.** Minirhizobox device for different crop treatments and the unplanted soil.

### 1.2.3. Soil properties

The studied soil was taken from the top 10-cm of a long-term P fertilizer field trial located at the INRA Research center of Auzeville (SW France 43°31'N, 1°30'E) and sieved to 5 mm. The

soil is classified as a Luvisol (FAO-UNESCO, 1989) with a loam to clay-loam texture. The field trial comprised four P regimes arranged in four randomized blocks along a CaCO<sub>3</sub> gradient (Colomb et al., 2007). The soil samples used for the experiment were collected 40 years after the start of the experiment in the non-calcareous part of the field trial. In a former experiment (Betencourt et al., 2012), we used the soil collected from the two extreme fertilization regimes showing highly contrasted P availabilities. In the present experiment we used the high P soil (P4) for two main reasons: (i) to avoid the inhibiting effect of low soil P concentration on N<sub>2</sub> fixation and, (ii) to limit the P stress for plant growth considering the small amount of soil in contact with roots (from 28 g of dry soil per mini-rhizobox for 3-mm width to 79 g for 10-mm width) and thus the small amount of available P even in this fertilized soil in such an experimental set-up, as stressed by Li et al. (2008). Selected properties of the P4 soil as determined by the routine soil testing laboratory of Cirad (US49) in Montpellier are the following: pH<sub>H2O</sub>=7.54, organic C = 8.9 g kg<sup>-1</sup> (heat-loss at 1000°C), total P = 593 mg kg<sup>-1</sup> (fluorhydric and perchloric digestion method), extractable P determined with Olsen method = 30.4 mg kg<sup>-1</sup> (sodium bicarbonate method), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 20 mg kg<sup>-1</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 0.56 mg kg<sup>-1</sup> (KCl extract), exchangeable Ca (cobalthexamine chloride method) amounted to 85% of the cation exchange capacity of the soil (the remainder being made of 8% Mg, 3% K and traces of Na). Prior to use, the soil was incubated during 14 days at 4°C in the dark in a P-free nutrient solution of following composition (M): K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75 10<sup>-3</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 1.65 10<sup>-3</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-3</sup>; KNO<sub>3</sub>, 0.6 10<sup>-3</sup>. The nutrient solution was adjusted to the value of pH of the native soil (7.5).

#### 1.2.4. Plant growth

The experiment was conducted in May 2012 in a greenhouse with the following controlled climatic conditions: 8/16 h light/dark cycle, 25 ± 2°C temperature. The two plant species were: durum wheat (*Triticum turgidum durum* L. cv. LA1823) and chickpea obtained from ICARDA (*Cicer arietinum* L. cv. ILC 01302). Seeds of durum wheat and chickpea were sterilized with 3% of NaClO for 5 min and germinated on filter paper at 28°C during 7 days. The seedlings were then grown in hydroponics as a pre-culture phase during 20 days in order to obtain sufficient root development to cover the soil-containing mesh bag and allow sufficient nodulation of chickpea. Plant species were grown separately in 5-dm<sup>3</sup> buckets filled with nutrient solution differing in their composition according to the specific physiological requirements of each species. Wheat's nutrient solution was changed twice a week and had the following composition (M): KNO<sub>3</sub>, 2 10<sup>-3</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 10<sup>-6</sup>; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75 10<sup>-3</sup>; CaCl<sub>2</sub>, 1.65 10<sup>-3</sup>; MgSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-3</sup>; NaFeEDTA, 0.1 10<sup>-3</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4 10<sup>-6</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 6 10<sup>-6</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-6</sup>; CuSO<sub>4</sub>, 1 10<sup>-6</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 10 10<sup>-6</sup>. Chickpea's nutrient solution was changed first time after 15 days and then twice a week, and had the same composition as for durum wheat except for the chemical form of N and Fe, which were added as (M): CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 1 10<sup>-3</sup>; FeEDDHA, 0.24. The nutrient solution of chickpea was adjusted daily to 6.5 with KOH (0.01M). Chickpea was inoculated with *Mesorhizobium ciceri* (UPM Ca7) 3 days after transfer

in hydroponics allowing sufficient root length for inoculation. At the end of the pre-culture phase, 6 plantlets of each species were harvested in order to serve as reference plants before transfer on soil for the culture stage. For the culture stage, plants were transferred into the mini-rhizobox device with sufficient root biomass to allow the root mat to cover the whole soil surface (8 x 8 cm) to yield the corresponding rhizosphere. In the intercrop treatment, one wheat plantlet was placed on one side of the mesh bags and one chickpea on the other side; in the sole crop treatments, one durum wheat plantlet was placed on each side or one chickpea plantlet on each side. Additional devices with soil without plant were prepared to serve as no plant control soil, which is thereafter called unplanted soil. During the culture stage soils of each mini-rhizobox were moistened with the same P-free solution as for the incubation stage and renewed daily.

#### 1.2.5. Plant and soil harvest

Plants and soil were harvested after 11 days of growth in contact with the soil. The root-mat-containing mesh bags were gently removed from the soil surface and separated into shoots and roots. Soils of planted and unplanted treatments were immediately cut in 1-mm thick slices parallel to the root mats. To do so, 1-mm thick (8 x 8 cm) plates were placed at the bottom of the perspex rhizobox and pushed to extrude the soil. The extruded (1-mm thick slice of) soil was then obtained by slicing with a 12-cm razor blade along the top part of the perspex rhizobox. Half of the slices were cut from one side of the device and the other half from the opposite side to ensure more homogeneous slice thickness. For the 10-mm width similar cutting process was used but the two last slices were combined. In intercrop the cutting process started from the side of the chickpea root mat.

#### 1.2.6. Plant and soil analyses

Harvested plants were separated into shoots and roots. In intercrop the two species were harvested separately. Shoots and roots were oven-dried at 70°C for 3 days and weighed for dry biomass determination. Shoots and roots were then ground (MM 2000, Retsch) and subsamples were digested in a microwave oven (ETHOS, Milestone) with concentrated HNO<sub>3</sub> (65%) at 180°C and 2 MPa. Phosphorus content was determined using the vanado-molybdate method (AFNOR, 1969).

Rhizosphere and bulk soil corresponding to control soil without plant were oven-dried at 50°C for 3 days. Soil P availability was determined by water extraction (thereafter called water-P for simplicity), which is often used as indicator of available P over the course of crop growth (Johnson et al., 2003). We extracted P at a soil:extractant (mass:volume) ratio of 1:5 and then centrifuged the extracts at 25,000 g for 10 min. After centrifugation, supernatants were filtered through 0.2-µm cellulose acetate membrane filters (VWR international). Phosphate concentrations were measured with the malachite green method (Ohno and Zibilske, 1991). Soil pH was determined in the water extracts with a Metrohm-744 pH meter with a combined glass electrode.

### I.2.7. Statistical analyses

Two-ways analyses of variance (ANOVA) were performed on plant parameters considering width treatment x crop treatment. Two-ways repeated measures ANOVA considering width treatment x soil treatment were performed for soil parameters because of the statistical dependency of each slice of soil within a treatment. For each width treatment, effect of crop treatment on total biomass and P content parameters was tested using one-way ANOVA with crop treatment as factor. ANOVA were conducted with the probability level of 0.05. Significant difference between means was separated by LSD multiple comparison tests with adjusted p-values with Benjamini and Yekutieli procedure at the 0.05 probability level to consider the above mentioned statistical dependency. The 2.13.2 version of R software (R development Core Team 2011) was used for statistics.

## I.3. Results

### I.3.1. Plant growth

**Table 5.1.** Shoot, root and total biomass per plant for wheat and chickpea in the different treatments. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  SE (standard errors). Reference values are relative to plants harvested at the time when other plants were placed in contact with the soil. For total biomass, values were compared to reference plant and different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ). Values of probability of two-way ANOVA (Soil width x Crop treatment) were indicated.

Soil width	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot biomass (g plante <sup>-1</sup> )	Root biomass (g plante <sup>-1</sup> )	Total biomass (g plante <sup>-1</sup> )	Shoot biomass (g plante <sup>-1</sup> )	Root biomass (g plante <sup>-1</sup> )	Total biomass (g plante <sup>-1</sup> )
3	Reference	0.32 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.02 b	1.13 $\pm$ 0.29	0.49 $\pm$ 0.13	1.62 $\pm$ 0.31 a
	Sole crop	0.67 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.14 a	2.10 $\pm$ 0.10	0.89 $\pm$ 0.05	2.99 $\pm$ 0.14 a
	Intercrop	0.57 $\pm$ 0.04	0.34 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.13 ab	1.74 $\pm$ 0.44	0.99 $\pm$ 0.18	2.73 $\pm$ 0.62 a
5	Reference			0.47 $\pm$ 0.02 b			1.62 $\pm$ 0.31 b
	Sole crop	0.59 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.06 a	2.00 $\pm$ 0.16	0.82 $\pm$ 0.09	2.82 $\pm$ 0.25 ab
	Intercrop	0.73 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 0.07 a	2.62 $\pm$ 0.21	1.33 $\pm$ 0.10	3.95 $\pm$ 0.25 a
10	Reference			0.47 $\pm$ 0.02 b			1.62 $\pm$ 0.31 a
	Sole crop	0.61 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.10 a	1.67 $\pm$ 0.16	0.79 $\pm$ 0.07	2.46 $\pm$ 0.11 a
	Intercrop	0.55 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.02	0.99 $\pm$ 0.02 a	2.48 $\pm$ 0.58	1.00 $\pm$ 0.04	3.47 $\pm$ 0.62 a
Soil width		0.51	0.29	0.48	0.51	0.20	0.65
Crop treatment		0.88	0.11	0.50	0.21	0.005	0.68
Soil width x Crop treatment		0.87	0.59	0.32	0.20	0.14	0.71

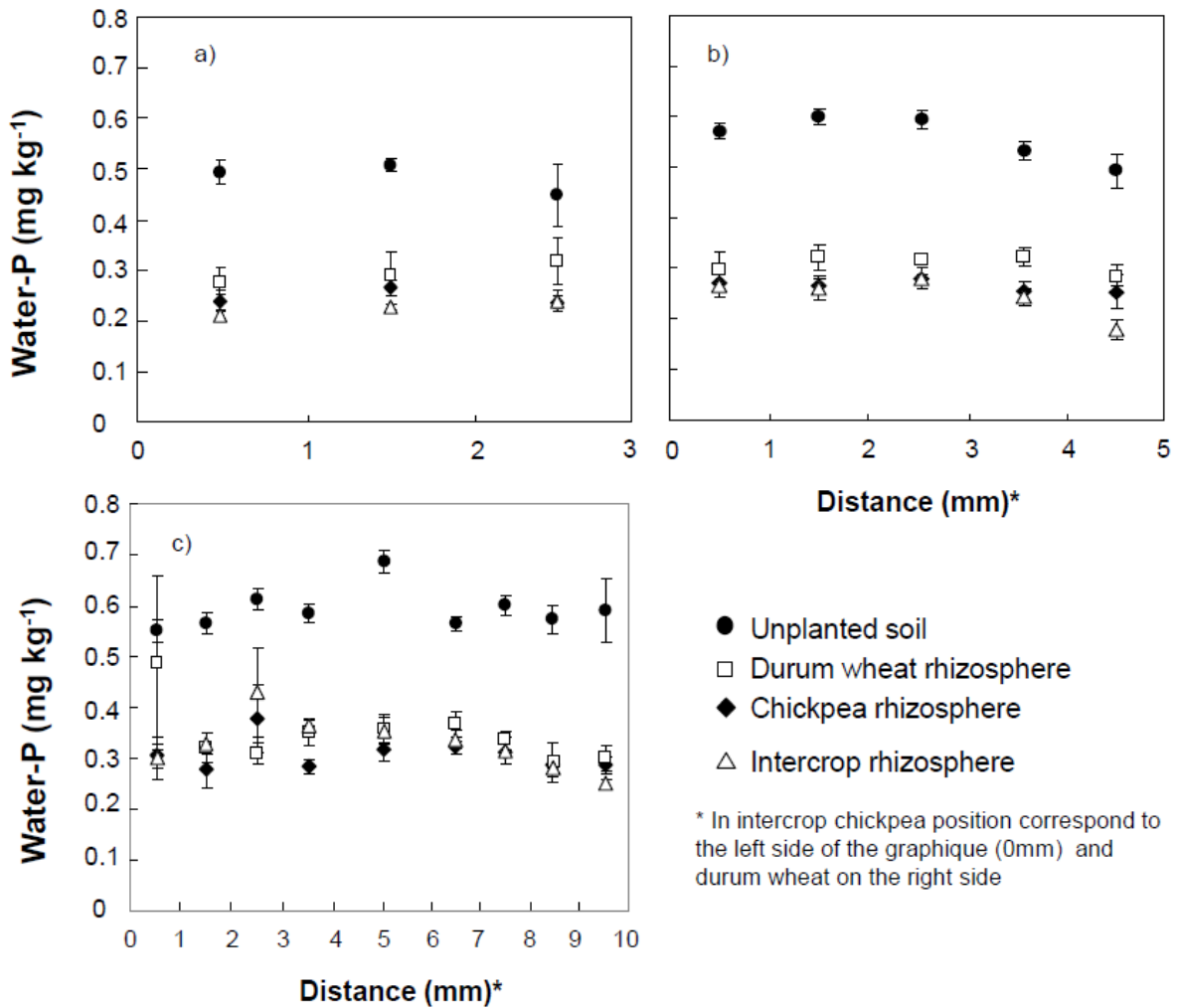
Table 5.1 shows aboveground biomass for the two species for the different treatments. Total biomass of durum wheat was systematically doubled compared to the reference plant harvested at the time of transfer onto soil and significantly for 5 and 10-mm soil width treatments. For chickpea similar trend was observed with a 2-fold increase of total biomass compared to reference plants, with significant increase observed for the 10-mm width. No differences in plant biomass were observed in intercrop compared to sole crop except for root biomass of chickpea. Root biomass of chickpea was increased by 34% when intercropped with durum wheat. No differences in biomass were observed for the different soil width treatments. Table 5.2 shows P nutrition parameters such as P concentration in the dry biomass and P content for the two species and the different treatments. As for biomass, little differences were observed between crop and width treatments. For durum wheat, P concentrations in shoots were decreased by 13% when intercropped with chickpea. For chickpea, P concentrations in roots were decreased by 25% when intercropped with durum wheat. No changes were detected between P content in the reference plant and the plant over the period of growth in contact with the soil.

**Table 5.2.** Phosphorus concentration in shoots and roots and total P content for wheat and chickpea in the different treatments. Reference values are relative to plants harvested at the time when other plants were placed in contact with the soil. Values represent the mean of three replicates  $\pm$  SE (standard errors). For P content, values were compared to reference plants and different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ). Values of probability of two-way ANOVA (Soil width x Crop treatment) were indicated.

Soil width	Crop treatment	Durum wheat			Chickpea		
		Shoot P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Total P content (mg plant <sup>-1</sup> )	Shoot P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Root P concentration (mg g <sup>-1</sup> )	Total P content (mg plant <sup>-1</sup> )
3	Reference	6.3 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.1 a	3.1 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 1.5 a
	Sole crop	3.0 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.4 a	2.2 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	6.0 $\pm$ 0.5 a
	Intercrop	2.5 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.2 a	2.1 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 1.1 a
5	Reference			2.7 $\pm$ 0.1 a			5.1 $\pm$ 1.5 a
	Sole crop	3.2 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.04 a	2.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.6 a
	Intercrop	2.7 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2 a	2.2 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.5 a
10	Reference			2.7 $\pm$ 0.1 a			5.1 $\pm$ 1.5 a
	Sole crop	3.1 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.2 a	2.2 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.3	4.9 $\pm$ 0.4 a
	Intercrop	2.9 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1 a	2.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 2.6 a
Soil width		0.52	0.20	0.13	0.65	0.20	0.37
Crop treatment		0.04	0.29	0.3	0.68	0.04	0.37
Soil width x Crop treatment		0.74	0.91	0.19	0.71	0.58	0.30

1.3.2. Phosphorus concentration profiles in soil

Phosphorus concentration profiles are presented in the figure 5.2 for the different treatments. The indicated distance was chosen relative to the side where cutting process was started, which means that in intercrop it correspond to the side where the root mat of chickpea was positioned. Unplanted soil was used as reference.



**Figure 5.2.** Profiles of water-extractable P for the different crop and width treatments (a) 3-mm, (b) 5-mm and (c) 10-mm. Black circles stand for unplanted control, open squares for durum wheat in sole crop, black diamonds for chickpea in sole crop and open triangles stand for the intercrop. Values are the mean of 3 replicates. Bars indicate standard errors. The distance starts from one side of the device where the root mats are positioned for the planted device. In intercrop the distance starts from the root mat of chickpea.

Table 5.3 indicates values of one-way ANOVA to test differences between the different slices of soil at different distances from the root mats. Table 5.3 also indicates results of the two-way ANOVA testing differences between soil treatments and the effect of soil width corresponding to three distances devices (3, 5 and 10-mm). Values of P concentration measured in water extract, thereafter called water-P, were similar within a soil treatment,

and thus no gradient was observed. A decrease in water-P was systematically observed in the rhizosphere compared to the unplanted soil. Values were decreased by 40% for durum wheat, while for chickpea and the intercrop a decrease by 51% occurred compared to the unplanted soil. All values of P concentration were increased to the same extent with soil width. Values in the 10-mm width treatment were 6-fold higher than for either 3-mm and 5-mm width treatments.

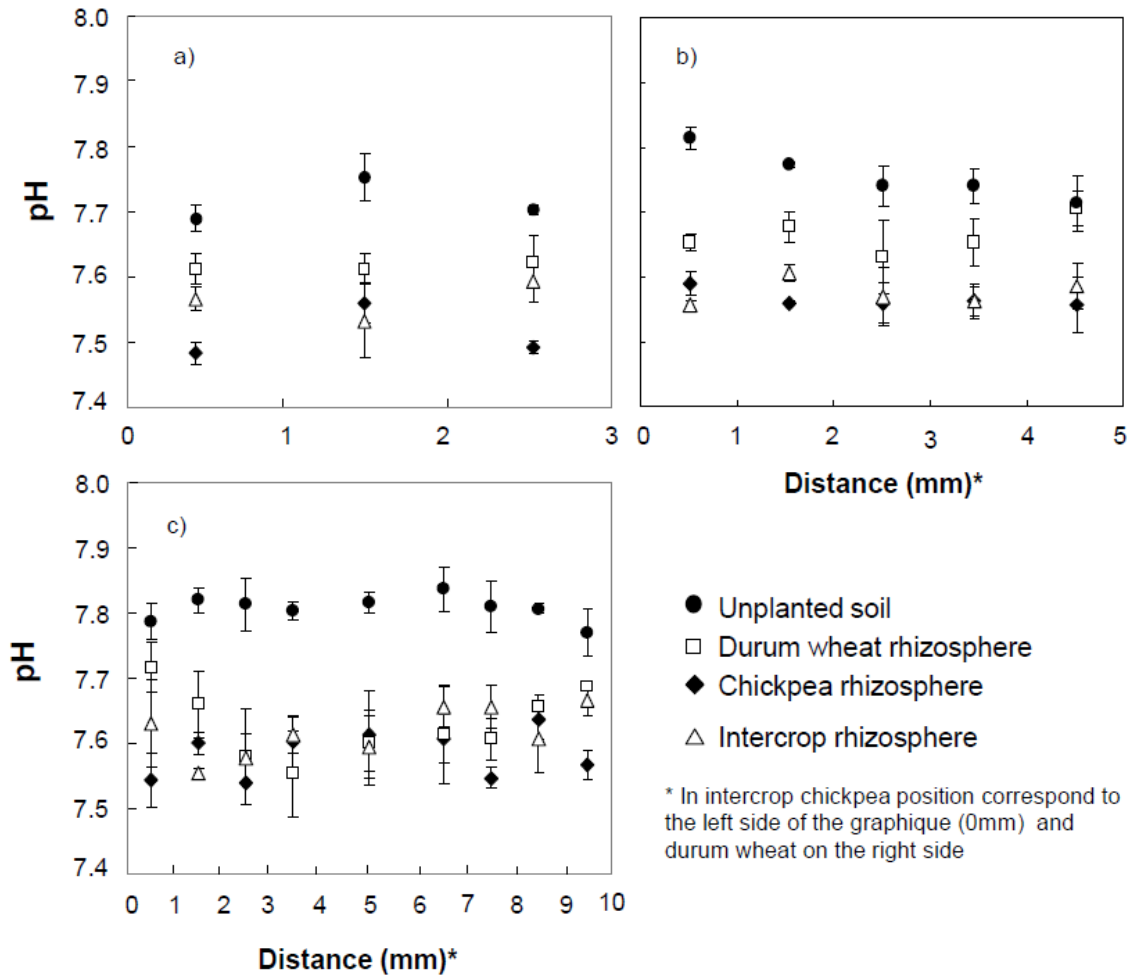
**Table 5.3.** P concentration in water extracts (Water-P) and pH measured for the different positions of soil layers for the different soil treatments (unplanted soil vs rhizospheres) and for the different soil width. The position of each soil layer stands for the distance from one edge of the device corresponding for rhizosphere treatments to one of the two root mats. Values of one-way ANOVA for repeated measurements with Soil layer position as factor were indicated for water-P and pH to test differences between soil layers within each replicate. Values of probability of two-way ANOVA (Soil treatment x Soil width) for repeated measurements were indicated for water-P and pH. Different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ).

	Water-P	pH
<b>One-way ANOVA</b>		
Soil layer position	0.28	0.42
<b>Two-way ANOVA</b>		
Soil treatment	<0.01	<0.01
<i>Unplanted soil</i>	a	a
<i>Durum wheat rhizosphere</i>	b	b
<i>Chickpea rhizosphere</i>	c	c
<i>Intercrop rhizosphere</i>	c	c
Soil width	<0.01	0.01
3	a	a
5	a	b
10	c	c
Soil treatment x Soil width	0.52	0.46

### 1.3.3. Profiles of pH in the soil

Profiles of pH are presented in the figure 5.3 for the different treatments. Table 3 indicates values of one-way ANOVA to test differences between the different slices of soil at different distances from root mats. Table 5.3 also indicates results of the two-way ANOVA testing differences between soil treatments and the effect of soil width corresponding to three distances devices (3, 5 and 10-mm). Values of pH were the same within a soil treatment and

showed homogeneous profiles. Acidification corresponding to a pH decrease was systematically observed in the rhizosphere compared to the unplanted soil. When considering all the width treatments, values were decreased to 7.63 for durum wheat and to 7.57 for chickpea and the intercrop while the unplanted soil was about 7.8. All the pH values increased with increasing width treatments, *i.e.* by 0.04 and 0.06 units for 5-mm and 10-mm width respectively, compared to 3-mm width.



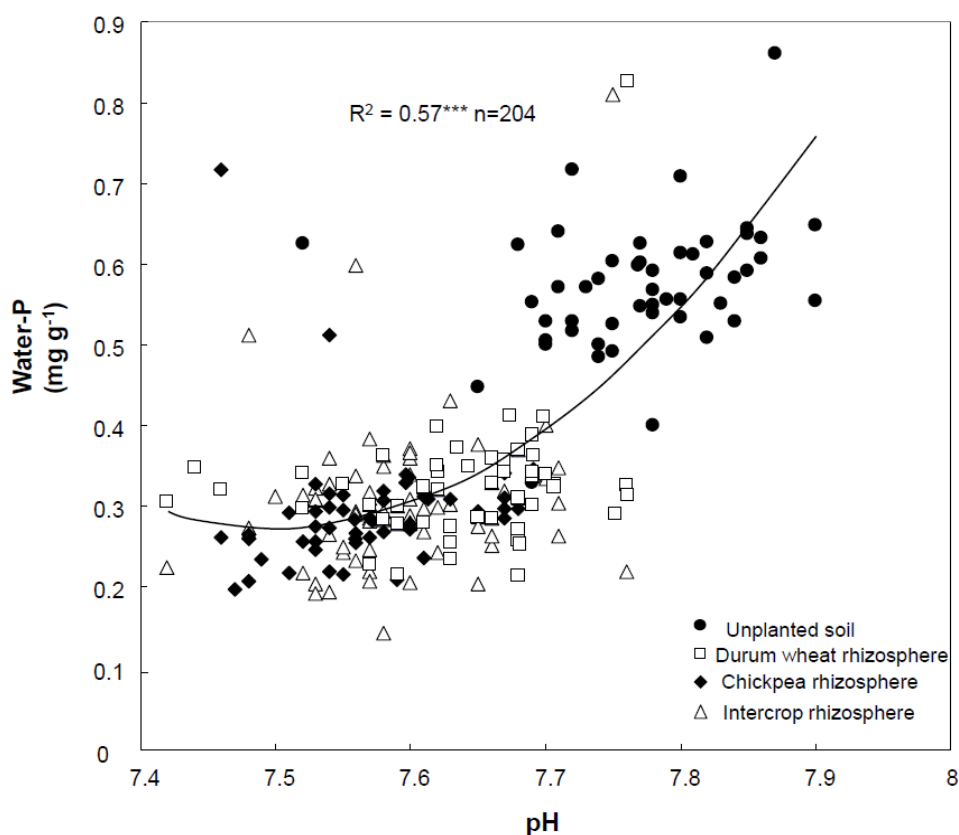
**Figure 5.3.** Profiles of pH for the different crop and width treatments (a) 3-mm, (b) 5-mm and (c) 10-mm. Black circles stand for unplanted control, open squares for durum wheat in sole crop, black diamonds for chickpea in sole crop and open triangles stand for the intercrop. Values are the mean of 3 replicates. Bars indicate standard errors. The distance starts from one side of the device where the root mats are positioned for the planted device. In intercrop the distance starts from the root mat of chickpea.

#### 1.3.4. Phosphorus availability and pH in the soil

Figure 5.4 shows the relationship between P concentration in water extracts and soil pH. Water-P increased with soil pH according to the following equation:

$$\text{Water-P} = 169.9 \text{ pH}^2 - 4.2 \text{ pH} + 3.0 \quad (R^2 = 0.57^{***} \text{ n}=204)$$





**Figure 5.4.** Relationship between values of P concentration and pH in water extracts for bulk soil and rhizosphere for all soil width treatments. Black circles stand for unplanted control, open squares for durum wheat in sole crop, black diamonds for chickpea in sole crop and open triangles for the intercrop.

#### I.4. Discussion

##### I.4.1. Decreased P availability in the rhizosphere

Decreased P availability was systematically observed in the rhizosphere for all the treatments irrespective of the distance separating the root mats (*i.e.* 3-mm, 5-mm and 10-mm). Depletion of P in the rhizosphere is expected to occur whenever the uptake of roots exceeds the capacity of the soil to resupply P to the root surface mainly through diffusion process (Barber, 1995; Tinker and Nye, 2000). Some experimental and modelling works showed that this decrease in P concentration in the rhizosphere correspond to a concentration gradient determining a depletion zone and driving the transport of phosphate ions to the root. Considering the range of values evaluated for phosphate ions and experimental observation, depletion zone is expected to extend to about 1-mm (see Hinsinger et al. 2005 for review). In our case, values of P concentration in the rhizosphere were equal all along the distance between root mats for all the treatments, irrespective of the distance separating the root mats. Such uniform concentration profiles would suggest that the sink effect of absorbing roots affect all the soil profile up to 5-mm. Raynaud et al. (2008) simulated the development of concentration gradients at equilibrium (*i.e.* when the uptake rate of root is equal to the nutrient supply) between two roots of different plants 5-mm apart for two extreme values of diffusion of nutrient in soil, called diffusive supply. For low diffusive supply results showed two steep concentration gradients at the surface of the

two roots, but at high diffusive supply uptake of roots resulted in a homogeneous profile between the roots. Considering the range of values of diffusive supply for phosphate ions, concentrations profiles are supposed to vary between those two extremes cases without reaching the flat profile. Those authors only considered the interaction between the uptake process and soil properties as factor governing the flux of nutrient and, thus, the development of concentration profiles. Among soil properties, water content influences the nutrient diffusion process in a given soil, increasing the diffusive flux when soil moisture is increasing (Dunham and Nye, 1976; Barber, 1995; Jungk and Claassen, 1997). Although the extension of the depletion gradient with soil moisture shown by experimental and modelling works are still limited and is not sufficient to explain our results obtained for 10-mm where concentration of phosphate ions were uniformly decreased on the entire soil profile. For instance, Gahoonia et al. (1994) observed an increase in the extent of P depletion zone from 1-mm to 2-mm when changing soil water content from 14% to 20%. In our case soil water content was evaluated to about 25%. The extension of the P depletion zone has also been attributed to anatomical or morphological parameters of roots such as root hairs and hyphae of mycorrhizal fungi. In our experiment 30- $\mu$ m mesh bags prevented the roots to go through, but allow root hairs and mycorrhizal hyphae to grow into the soil. Root hairs can grow up to several millimetres away from the root surface and can induce the extension of the rhizosphere (Bhat et al. 1976; Gahoonia et al., 1996, 2003). Although the depletion zone can double in the presence of root hairs, it did not extend much beyond 2-mm, which is far less than what we observed for the 5 and 10-mm width. In the contrary mycorrhizal hyphae can extend to several centimetres from the root surface and thus considerably expand the depletion zone in the rhizosphere (Bolan, 1991; Jakobsen et al., 1992; Schnepf et al. 2008). Li et al. (1991) evaluated the interaction between root-induced change in pH and mycorrhizal fungi on the shape of the P depletion zone and observed a depletion zone up to 20 times larger for mycorrhizal roots of white clover (*Trifolium repens* L.) after seven weeks of growth. Schnepf et al. (2008) simulated the effect of different types of growth and uptake patterns of mycorrhizal fungi on development of concentration gradient along the plant growth time course and obtained a maximum extent of the P depletion zone of 6-mm from the root after 21 days. Such phenomenon was unlikely to occur in our experiment because the colonization of roots by mycorrhizal fungi may not have occurred considering the rather short time of growth in contact with soil (11 days) and the absence of inoculation of the roots prior to this contact. In addition no gradient was observed in our experiment, which contrasts with these previous works. The flat profile that we obtained suggests that other root-induced process may have been involved than uptake by roots, root hairs and mycorrhizal hyphae.

When comparing the concentrations profiles obtained for the different plant treatment higher depletion was obtained in the rhizosphere of chickpea compared to that of durum wheat. Such differences between plant species have been observed by different authors who also showed contrasted shapes for the P depletion gradients when testing efficiency for P uptake in various crops (Gahoonia and Nielsen, 1996; Wang et al., 2008; Zhang et al.,

2009). Contrary to what is usually assumed and observed in intercrops studies, the concentration profile for the intercrop was not between the two respective sole crops. The behaviour in the intercrop was the same as for chickpea, suggesting that root activity of intercropped chickpea was the main driver of the observed P depletion, even more so when considering the difference of root biomass between the two species with 2.8-times higher values in chickpea compared with durum wheat. Such difference in root biomass between the two species may also be advocated for to interpret the lower decrease in P concentration observed for durum wheat compared to chickpea when in sole crop.

The observed increase of P concentration with increasing soil width for all the soil treatments even for the unplanted soil suggests that this phenomenon was due to the device. Water content was similar for all the soil widths, but the density of soil in the 3-mm device was higher than for the 10-mm, 13 and 11-g respectively. Other processes may have influenced the chemical soil properties and consequently the transport of phosphate ions such as fluxes of solutes from the nutrient solution, gas or root or microbial exudates.

#### 1.4.2. Root-induced decrease in pH in the rhizosphere

As for P concentration, pH systematically decreased in the rhizosphere for all the treatments. Different root processes can induce changes in pH in the rhizosphere. It is generally proposed that roots released  $H^+$  and  $OH^-$  in the rhizosphere to maintain the cation-anion balance (Nye, 1981; Hinsinger et al., 2003). Among the ions taken up by plants, nitrogen (N) ions have been shown to have a major impact on  $H^+/OH^-$  efflux, as it occurs under various chemical forms which can be taken up by plants (Haynes, 1990; Hinsinger et al., 2003). Considering the influence of cation-anion balance and N nutrition on the release by roots of  $H^+/OH^-$  our results suggest that the plants took up more cations than anions, including ammonium ions ( $NH_4^+$ ) and in the specific case of chickpea  $N_2$  through nitrogen fixation. Another underestimated process that can substantially influence soil pH is with the build-up of  $CO_2$  as a consequence of soil respiration (Hinsinger et al., 2003). Respiration can derive both from roots and microorganisms, but few studies evaluated root respiration in the rhizosphere (Hinsinger et al., 2009). Increased  $pCO_2$  in the rhizosphere can decrease pH in all the soils except the most acidic as a result of the rapid transformation of  $CO_2$  in  $H_2CO_3$  which is a weak acid ( $pK=6.36$ ) (Nye et al., 1981; Hinsinger et al. 2003). In our experiment root and microorganism respiration may have significantly contributed to the observed decrease in pH in the rhizosphere. Effective diffusion coefficient in soil of gaseous compounds and  $H^+/OH^-$  released by roots allows these chemicals to diffuse away up to millimetres or centimetres depending on soil properties (Darrah, 1993; Hinsinger et al. 2003; Raynaud, 2010). Thus our results are in line with Wang et al., (2008) who reported a decrease of pH over 4-mm away from the root surface for different species or Bravin et al., (2009) who observed an increase of pH over 6-mm from the root surface of durum wheat grown in an acid soil. These authors however found a clearly visible gradient of pH, while we observed a flat pH profile. Gollany et al. (1993) measured a quite flat profile of  $CO_2$

concentration in the rhizosphere, due to the ability of CO<sub>2</sub> to diffuse far away from roots. This would yield a flat pH gradient, as computed by Hinsinger et al. (2003) from the pCO<sub>2</sub> gradient measured by Gollany et al. (1993).

Similar trends for pH than for P concentration were observed in the rhizosphere for the different crop treatments with the lowest values observed for chickpea and the intercrop. The decrease in pH observed for chickpea amounted to 0.2 units compared to the unplanted soil, which was surprisingly low for a nodulated plant. Chickpea had been inoculated and presented active nodules at transfer, while such little decrease in pH suggests low N<sub>2</sub> fixation activity. For the intercrop treatment, values of pH were similar to those observed for chickpea in sole crop. Those results contradict what is usually reported for N<sub>2</sub> fixing legumes and what was observed by Cu et al., (2005) with bread wheat (*Triticum aestivum* L.)-white lupin (*Lupinus albus* L.) intercrop and Li et al. (2008) with durum wheat-common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercrop who reported a decrease by several pH units in the legume's rhizosphere and intermediate values in the intercrops. Our results can be due to the physiological state of plant that were transferred into soil at flowering stage for chickpea which usually corresponds to the peak of N<sub>2</sub> fixation for legumes and were harvested at pod filling stage (Peña-Cabriales et al., 1993; Kyei-Boahen et al., 2002). We may assume that little N was fixed and taken up by chickpea during its period of contact with the soil.

As for P concentrations profiles, values of pH for all the profiles increased with the soil width and similar processes as proposed for P may be proposed. Higher soil density, and consequently lower porosity, for the 3-mm devices may have induced a greater accumulation of CO<sub>2</sub> from respiration explaining the associated lower values of pH.

#### 1.4.3. Root-induced processes influencing P availability

Root-induced changes in pH are recognized as one of the major factors influencing the biogeochemical process determining P availability in soils (Hinsinger, 2001). Gahoonia et al., (1992) reported enhanced P depletion in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.) with increasing acidification of the rhizosphere in a Luvisol. Such enhanced P depletion was associated with increased P-uptake and growth. No such phenomenon was observed in our experiment where the decrease in P concentration in the rhizosphere was not associated with significantly enhanced P uptake. The relationship that we found between P concentration and pH in water extracts confirmed that root-induced pH change was a major driver of P availability in this soil. Our results showed an increase of P availability for pH values up to 7.6 units and confirmed the relationship observed and modelled by Devau et al. (2011a, b) in the same soil. The good fit between their simulations and experimental data showed that the observed relationship was mainly explained by adsorption-desorption process. Changes in pH determined by H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> concentrations in the soil solution changed chemical properties of the soil and thus the surface charge of the minerals influencing the partitioning of phosphate ions between the soil solution and the different soil minerals. To correctly fit their simulation to the observed value in the rhizosphere, Devau et al., (2011a,

b) highlighted the role of the uptake of calcium by roots in the control of P availability. When considering the higher mobility in soil of chemicals influencing pH (*e.g.* CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup>) compared to phosphate ions, adsorption of P on the solid phase may be advocated to explain the decrease of P concentration up to 5-mm. Thus the effect of P-uptake on P depletion may have been masked by the effect of pH change resulting in a decrease of P availability over a large distance from plant roots.

#### I.4.4. Plant growth

Crop treatments and distance separating roots had little effect on plant growth parameters as plant biomass and P concentrations. No increase in biomass was observed as usually reported for cereal-legume intercrop with enhanced biomass observed for the cereal compared to its performance in sole crop. We only observed higher root biomass for chickpea when intercropped with durum wheat. Similarly enhanced root growth with change in neighbour identity has already been reported in different studies, but the mechanisms are still poorly understood. There is still a debate on the respective influence of resource availability and signal molecules released by roots or by microorganism (*e.g.* Plant growth promoting rhizobacteria PGPR) to explain such differences in root growth (Callaway et al. 2003; de Kroon, 2007; Cahill and Mc Nickel., 2011). The P concentrations in plants corresponded to adequate P status reported for durum wheat and chickpea (Reuter and Robinson, 1997). Decreased P concentrations in shoots were observed for durum wheat when intercropped with chickpea. Because those changes were not associated with modification of plant biomass, chickpea may have been more competitive than durum wheat for P acquisition. For chickpea, the observed decrease in P concentration in roots when intercropped with durum wheat can be explained by the concomitant increase in root biomass. Those results suggest that the effect of durum wheat on P acquisition by the intercropped chickpea was similar to that of the associated chickpea when in sole crop. Those results suggest that the identity of plant neighbour associated with chickpea had no effect on its P acquisition and thus that the effect of interactions was similar. No difference in P content or P uptake in plants was observed between the various treatments. Therefore contrary to most of literature on P acquisition in intercrops we did not observe any positive interactions. Yet, the absence of observed P-uptake may have been imposed by the device and the limited number of replicates that did not allow detecting small amount of P taken up during the short time of contact with soil.

#### I.5. Conclusions

The aim of our study was to determine the influence of plant species interactions on changes in pH and P availability in the rhizosphere and subsequent P partitioning between durum wheat and chickpea. More precisely we were interested to evaluate the influence of the intensity of overlapping of the rhizosphere of the two species on positive and negative interactions for P acquisition. Our experimental design allowed us to measure P

concentrations and pH in soil at 1-mm spatial resolution at different distances from the root mats for two species intercropped or grown as sole crops. For those two soil parameters we observed uniform profiles with lower values compared to the unplanted soil for all soil widths (3 to 10-mm between neighbouring root mats). Those results suggested that the rhizosphere of associated plants completely overlapped. Contrary to what is usually expected, P depletion occurred up to 5-mm away from the root surface. Considering the low mobility of P in soils it suggested that P-uptake by roots was not the only root-induced process involved in such P depletion. The relationship observed between P concentration and pH and former studies on biogeochemicals process governing P availability in the same soil suggest that the root-induced acidification of the rhizosphere may have influenced the adsorption-desorption process and enhanced the adsorption of phosphate ions on the soil constituents, thereby resulting in a decreased P availability. Because of the high mobility of CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> possibly involved in root-induced acidification diffusion of such compounds in the soil over several millimetres may explain the observed decrease of P concentration up to 5-mm. Furthermore, considering that no significant P-uptake was detected we can assume that P-uptake of plant had little effect on P availability compared to the root-induced acidification of the rhizosphere. Values for soil parameters in the intercrop were not between those of the respective sole crops but were rather similar to those observed for chickpea grown as sole crop. This implied that root activity of chickpea in intercrop was the main driver of root-soil interactions. No clear information was obtained about P partitioning. Species interactions did not seem to affect either positively or negatively the plant growth parameter and no facilitation was observed for either P-uptake or plant biomass.

## References

- AFNOR. 1969. Dosage spectrophotométrique de l'anhydride phosphorique: méthode vanadomolybdique. AFNOR, Paris, pp 242–246.
- Bagayoko, M., Alvey S., Neumann G., Buerkert A. 2000. Root-induced increases in soil pH and nutrient availability to field-grown cereals and legumes on acid sandy soils of Sudano-Sahelian West Africa. *Plant and Soil* 225:117-127.
- Barber, S. A. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. Wiley, New York 384pp.
- Betencourt, E., Duputel M., Colomb B., Desclaux D., Hinsinger P. 2012. Intercropping promotes the ability of durum wheat and chickpea to increase rhizosphere phosphorus availability in a low P soil. *Soil Biology & Biochemistry* 46:181-190.
- Bhat, K. K. S., Nye P. H., Baldwin J. P. 1976. Diffusion of phosphate to plant roots in soil .4. Concentration distance profile in rhizosphere of roots with root hairs in a low-P soil.. *Plant and Soil* 44:63-72.
- Bolan, N. S. 1991. A critical-review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil* 134:189-207.

- Bravin, M. N., Tentscher P., Rose J., Hinsinger P. 2009. Rhizosphere pH Gradient Controls Copper Availability in a Strongly Acidic Soil. *Environmental Science and Technology* 43:5686-5691.
- Brooker, R. W., Maestre F. T., Callaway R. M., Lortie C. L., Cavieres L. A., Kunstler G., Liancourt P., Tielboerger K., Travis J. M. J., Anthelme F., Armas C., Coll L., Corcket E., Delzon S., Forey E., Kikvidze Z., Olofsson J., Pugnaire F., Quiroz C. L., Saccone P., Schiffers K., Seifan M., Touzard B., Michalet R. 2008. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* 96:18-34.
- Cahill, J. F., G. G. McNickle. 2011. The Behavioral Ecology of Nutrient Foraging by Plants. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 42:289-311.
- Callaway, R. M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61:306-349.
- Callaway, R. M., Pennings S. C., Richards C. L. 2003. Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* 84:1115-1128.
- Casper, B. B., Schenk H. J., Jackson R. B. 2003. Defining a plant's belowground zone of influence. *Ecology* 84:2313-2321.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J. M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Cordell, D., Drangert J. O., White S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change-Human and Policy Dimensions* 19:292-305.
- Cu, S. T. T., Hutson J., Schuller K. A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.
- Dakora, F. D. Phillips D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245:35-47.
- Darrah, P. R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition-A quantitative approach. *Plant and Soil* 155:1-20.
- Dawson, C. J. Hilton J. 2011. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy* 36:S14-S22.
- de Kroon, H. 2007. Ecology - How do roots interact? *Science* 318:1562-1563.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.
- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gerard F. 2011. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil* 348:203-218.
- Dunbabin, V. M., McDermott S., Bengough A. G. 2006. Upscaling from rhizosphere to whole root system: Modelling the effects of phospholipid surfactants on water and nutrient uptake. *Plant and Soil* 283:57-72.
- Dunham, R. J., Nye P. H. 1976. Influence of soil-water content on uptake of ions by roots .3. Phosphate, potassium, calcium and magnesium uptake and concentration gradients in soil. *Journal of Applied Ecology* 13:967-984.
- FAO-UNESCO, 1989. Soil map of the world at 1: 5 000 000, third ed. FAO Press, Paris.
- Gahoonia, T. S., Claassen N., Jungk A. 1992. Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant and Soil* 140:241-248.

- Gahoonia, T. S., Raza S., Nielsen N. E. 1994. Phosphorus depletion in the rhizosphere as influenced by soil-moisture. *Plant and Soil* 159:213-218.
- Gahoonia, T. S., Nielsen N. E. 1996. Variation in acquisition of soil phosphorus among wheat and barley genotypes. *Plant and Soil* 178:223-230.
- Gahoonia, T. S. Nielsen N. E. 2003. Phosphorus (P) uptake and growth of a root hairless barley mutant (bald root barley, brb) and wild type in low- and high-P soils. *Plant Cell and Environment* 26:1759-1766.
- Geelhoed, J. S., Van Riemsdijk W. H., Findenegg G. R. 1999. Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. *European Journal of Soil Science* 50:379-390.
- Gollany, H. T., Schumacher T. E., Rue R. R., Liu S. Y. 1993. A carbon-dioxide microelectrode for in-situ pCO<sub>2</sub> measurement. *Microchemical Journal* 48:42-49.
- Haynes, R. J. 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance - A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil* 126:247-264.
- Hinsinger, P., Gilkes R. J. 1995. Root-induced dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of lupins grown in alkaline soil. *Australian Journal of Soil Research* 33:477-489.
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64:225-265.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C. X., Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* 248:43-59.
- Hinsinger, P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168:293-303.
- Hinsinger, P., E. Betencourt, L. Bernard, A. Brauman, C. Plassard, J. B. Shen, X. Y. Tang, and F. S. Zhang. 2011. P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Hübel, F. Beck E. 1993. In-situ determination of the P-relations around the primary root of maize with respect to inorganic and phytate-P. *Plant and Soil* 157:1-9.
- Jakobsen, I., Abbott L. K., Robson A. D. 1992. External hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of <sup>32</sup>P over defined distances. *New Phytologist* 120:509-516.
- Johnson, A. H., Frizano J., Vann D. R. 2003. Biogeochemical implications of labile phosphorus in forest soils determined by the Hedley fractionation procedure. *Oecologia* 135:487-499.
- Jungk, A., Seeling B., Gerke J. 1993. Mobilization of different phosphate fractions in the rhizosphere. *Plant and Soil* 155:91-94.
- Jungk, A. Claassen N. 1997. Ion diffusion in the soil-root system. *Advances in Agronomy* 61:53-110.
- Kyei-Boahen, S., Slinkard A. E., Walley F. L. 2002. Time course of N(2) fixation and growth of chickpea. *Biology and Fertility of Soils* 35:441-447.
- Li, X. L., George E., Marschner H. 1991. Extension of the phosphorus depletion zone in v-mycorrhizal white clover in calcareous soil. *Plant and Soil* 136:41-48.



- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11192-11196.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Clairotte M., Drevon J. J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139-150.
- Lynch, J. P. 2007. Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* 55:493-512.
- Nye, P. H. 1981. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil* 61:7-26.
- Nye, P. H. 1983. The diffusion of 2 interacting solutes in soil. *Journal of Soil Science* 34:677-691.
- Ohno, T., Zibilske, L., 1991. Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using malachite green. *Soil Science Society of America Journal* 55, 892-895.
- Peña-Cabriales, J. J., Gragedacabrera O. A., Kola V., Hardarson G. 1993. Time-course of N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 152:115-121.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:665-693.
- Raven, J. A., Franco A. A., Dejesus E. L., Jacobneto J. 1990. H<sup>+</sup> extrusion and organic-acid synthesis in N<sub>2</sub>-fixing symbioses involving vascular plants. *New Phytologist* 114:369-389.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P. W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient Bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. *American Naturalist* 171:44-58.
- Raynaud, X. 2010. Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model. *Soil Biology and Biochemistry* 42:210-219.
- Rengel, Z. 2002. Genetic control of root exudation. *Plant and Soil* 245:59-70.
- Rengel, Z., Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* 168:305-312.
- Reuter, J.B., Robinson, D.J., (Eds) 1997. *Plant analysis: an interpretation manual*, second ed. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Richardson, A. E., Barea J.M., McNeill A. M., Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321:305-339.
- Richardson, A. E., Lynch J. P., Ryan P. R., Delhaize E., Smith F. A., Smith S. E., Harvey P. R., Ryan M. H., Veneklaas E. J., Lambers H., Oberson A., Culvenor R. A., Simpson R. J. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil* 349:121-156.
- Schnepf, A., Roose T., Schweiger P. 2008. Impact of growth and uptake patterns of arbuscular mycorrhizal fungi on plant phosphorus uptake - a modelling study. *Plant and Soil* 312:85-99.
- Tinker, P. B. Nye P. H. 2000. *Solute movement in the rhizosphere. Solute movement in the rhizosphere*. Oxford, UK. Oxford University Press.

- Vance, C. P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* 127:390-397.
- Wang, X., Tang C., Guppy C. N., Sale P. W. G. 2008. Phosphorus acquisition characteristics of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.) and white lupin (*Lupinus albus* L.) under P deficient conditions. *Plant and Soil* 312:117-128.
- Zhang, H., Huang Y., Ye X., Shi L., Xu F. 2009. Genotypic differences in phosphorus acquisition and the rhizosphere properties of *Brassica napus* in response to low phosphorus stress. *Plant and Soil* 320:91-102.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif central de cette thèse a été la compréhension des interactions entre espèces pour l'acquisition du phosphore (P) du sol dans le cas de l'association d'une céréale et d'une légumineuse. Plus précisément, il s'agissait d'identifier les mécanismes rhizosphériques déterminant le partage de la ressource en P du sol entre ces espèces végétales associées et particulièrement ceux impliqués dans des processus de facilitation de l'acquisition de P.

L'hypothèse centrale sur laquelle s'est fondée ma thèse proposait que les modifications de pH induites par les racines soit le processus rhizosphérique majeur dans la détermination de la disponibilité en P et son partage entre espèces dans le cas de l'association céréale-légumineuse. Plus précisément mon hypothèse était que la légumineuse faciliterait l'acquisition de P par la céréale associée suite à l'acidification de la rhizosphère, en lien avec la fixation symbiotique de  $N_2$ , lorsque ces deux espèces sont cultivées sur des sols neutres à alcalins. La fixation de  $N_2$  par la légumineuse apparaissait dès lors comme un processus clé à la fois dans la détermination du partage de N mais également du P, impliquant ainsi une interaction étroite entre ces deux nutriments majeurs. Compte tenu de la faible mobilité des ions phosphates dans la solution du sol, j'ai également supposé que l'établissement d'interactions de type facilitation était influencé par le degré de recouvrement des rhizosphères des deux espèces associées, dont un des déterminants est la proximité de leurs racines respectives. De plus il a été proposé dans la littérature que la disponibilité d'une ressource influence les interactions entre plantes. La facilitation augmenterait aux dépens de la compétition pour de faibles valeurs de disponibilité de cette ressource. J'ai donc tenté d'éprouver cette hypothèse également, dans le cas de la disponibilité de P. Ces questionnements ont abouti à la mise en place d'une démarche organisée selon 3 grandes étapes :

(i) La première étape m'a permis d'évaluer l'effet des interactions entre plantes sur la disponibilité en P dans la rhizosphère ainsi que l'influence de la disponibilité en P initiale du sol (Chapitre III). Une première approche a été mise en œuvre au champ, en parcelle d'essai agronomique, intégrant l'effet de nombreuses variables de l'environnement biotique et abiotique. L'expérimentation suivante, réalisée cette fois en pots en conditions contrôlées, a permis d'évaluer les mécanismes rhizosphériques impliqués et en particulier les modifications de pH induites par les racines.

(ii) Suite à la première étape, il s'est avéré nécessaire de déterminer l'influence de la fixation de  $N_2$  par la légumineuse dans les interactions pour l'acquisition de P et son implication dans les mécanismes de facilitation, notamment à travers son effet sur le pH de la rhizosphère des deux espèces associées (Chapitre IV). L'influence de la fixation de  $N_2$  a été

testée en mini-rhizobox permettant d'isoler plus précisément certains processus rhizosphériques tout en imposant des niveaux de fixation de N<sub>2</sub> contrastés.

(ii) La dernière étape m'a permis d'évaluer l'effet du degré de recouvrement des rhizosphères des espèces en association sur les interactions pour l'acquisition de P et donc l'effet de la distance séparant les racines des deux espèces associées (Chapitre V). L'expérimentation a été réalisée en mini-rhizobox dont la géométrie a été adaptée à la mesure des gradients rhizosphériques, pour différents scénarios simulant des distances croissantes entre les systèmes racinaires des deux espèces associées.

Toutes ces étapes ont été réalisées sur un même Luvisol provenant de l'essai de fertilisation phosphatée de longue durée (40 ans de fertilisation contrastée) d'Auzeville-Toulouse (Colomb et al., 2007). Le blé dur et différentes légumineuses ont été cultivés seuls et en association ; la majorité des expérimentations a été réalisée en considérant l'association blé dur-pois chiche (voir Chapitre II).

Dans la suite, je vais m'attacher à décrire les grandes conclusions qui peuvent être tirées de ma thèse, en discutant les acquis obtenus à chacune de ces trois étapes, leurs contradictions éventuelles et leur portée générale, mais aussi leurs limites, telles qu'elles me sont apparues, et *in fine* les perspectives qui s'en dégagent.

## I. Discussion générale et conclusions

### I.1. Interactions pour l'acquisition de P entre espèces associées : implication de l'augmentation de la disponibilité de P dans la rhizosphère

L'augmentation de la concentration en P inorganique mesurée dans des extraits à l'eau (P-eau) et des extraits Olsen (P-Olsen) dans la rhizosphère des espèces étudiées a systématiquement été observée au cours de nos différentes expérimentations, à la fois au champ et en conditions contrôlées de laboratoire, en pots ou en mini-rhizobox, excepté dans l'expérience relative à l'évaluation de l'effet du degré de recouvrement des rhizosphères (Chapitre V). Nos résultats donc contredisent ce qui est habituellement observé et proposé dans la littérature, c'est à dire la diminution des concentrations en P inorganique en réponse aux effets combinés du prélèvement par les racines et de la faible diffusion des ions phosphates dans la solution du sol (Barber, 1995 ; Hinsinger, 2001 ; Hinsinger et al., 2011a). L'observation de cette augmentation pour différents dispositifs de culture et méthodes d'échantillonnage du sol rhizosphérique, renforce ainsi la robustesse et la validité de nos résultats. De plus, ils viennent confirmer des travaux antérieurs rapportant des augmentations de concentration en P pour différentes fractions à la fois inorganiques (Bagayoko et al., 2000 ; voir la synthèse de Hinsinger, 2001 ; Devau et al., 2010, 2011) et organiques (Chen et al., 2002 ; Li et al., 2008 ; Vu et al., 2008). L'augmentation de la teneur en P disponible au voisinage des racines suggère donc la mise en place d'autres processus

rhizosphériques que le prélèvement. Des approches plus fines des variations de concentration en P dans la rhizosphère ont en effet permis de mettre en évidence des profils complexes présentant à la fois une zone d'appauvrissement à la surface des racines et une zone d'accumulation à une distance plus importante des racines (Hübel et Beck, 1993 ; Hinsinger et Gilkes, 1996). Alors que la zone d'épuisement s'explique par l'effet de prélèvement de la plante, la zone d'accumulation suggère l'implication d'autres processus rhizosphériques contrebalançant l'effet puits des racines. Différents travaux de modélisation ont permis de confirmer ces derniers résultats expérimentaux et de mettre en évidence l'implication de différents exsudats racinaires : (i) de façon empirique dans le cas des interactions entre les ions phosphates et les protons dans la rhizosphère (Nye, 1983) ou (ii) à l'aide de modèles géochimiques plus mécanistes permettant de prendre en compte l'effet de l'exsudation de composés comme le citrate sur la disponibilité en P (Geelhoed et al., 1999). Alors que ces travaux de simulation n'avaient nécessité la prise en compte que d'un processus rhizosphérique supplémentaire à celui d'absorption des ions phosphate, les travaux de Devau et al. (2010, 2011) ont permis de mettre en évidence des interactions plus complexes. En effet la simulation correcte des augmentations de disponibilité mesurées par Devau et al. (2010, 2011) dans la rhizosphère du blé dur a nécessité la prise en compte l'exsudation d' $\text{OH}^-$  par les racines et le prélèvement de calcium, en plus de celui de P.

Au cours de nos différentes expérimentations, l'augmentation de la disponibilité de P dans la rhizosphère a été observée dans le cas des divers cultivars de blé dur et de pois chiche, ainsi que pour différentes espèces de légumineuses. Nos résultats ont montré une augmentation plus fréquente et importante de la disponibilité du P dans la rhizosphère des légumineuses que dans celle du blé dur. Ceci confirme ce qui est habituellement proposé dans la littérature présentant les légumineuses comme ayant des capacités supérieures à mobiliser le P relativement aux autres espèces telles que les céréales. Toutefois, l'expérimentation pour laquelle les interactions ont été évaluées pour différents niveaux d'apports d'azote (N) sous forme de nitrate ( $\text{N-NO}_3^-$ ) (Chapitre IV) a permis de relativiser cette première tendance. Dans le cadre de cette expérimentation, les variations de concentration en P mesurées dans les extraits à l'eau présentaient en effet des valeurs équivalentes selon les espèces pour certains niveaux d'apport de  $\text{N-NO}_3^-$ . Cette constatation a également été faite par différents auteurs pour de mêmes extractions mais également certaines autres fractions de P, mettant en évidence peu ou pas de différences entre céréales et légumineuses (Nurruzaman et al., 2006 ; Vu et al., 2008 ; Rose et al., 2010). De plus, nos résultats montrant une augmentation de la disponibilité de P dans la rhizosphère à la fois du blé dur et des légumineuses en culture monospécifique suggèrent que des mécanismes de facilitation seraient envisageables dans les deux sens et non pas uniquement de la légumineuse vers la céréale contrairement à ce qui est sous-entendu dans la plupart des études sur l'effet des associations sur l'acquisition de P. Il semble que le sens de la facilitation dépende des caractéristiques du sol et notamment de sa réponse en termes de disponibilité en P à l'activité racinaire des deux espèces.

L'intérêt supplémentaire de notre travail est d'avoir mis en évidence une augmentation de la disponibilité de P encore plus importante dans le cas des espèces en association et de manière significative dans le cas de l'expérimentation en pot (Chapitre III) et de celle en mini-rhizobox (Chapitre IV). Ce phénomène a été observé au champ dans le seul cas du pois, sans toutefois que la différence soit significative (Chapitre II). Ceci suggère une modification de l'intensité et/ou de la nature des processus rhizosphériques impliqués par l'association de deux espèces végétales fonctionnellement contrastées. Ces observations ont été permises par la mise en place de dispositifs et d'une stratégie d'échantillonnage permettant de dissocier les rhizosphères de chacune des deux espèces végétales en association. Jusqu'à présent, très peu de travaux s'étaient intéressés aux variations des concentrations en P dans la rhizosphère d'espèces en association (Cu et al., 2005 ; Song et al., 2007 ; Wang et al., 2007 ; Li et al., 2008 ; Wang et al., 2012) et aucun d'entre eux n'avait étudié indépendamment la rhizosphère des deux espèces en association. Les auteurs ayant étudié une rhizosphère commune ont ainsi rapporté des valeurs intermédiaires en association (Cu et al., 2005 ; Li et al., 2008 ; Wang et al., 2012) et n'ont donc pas permis de détecter de possibles différences dans la rhizosphère de chacune des deux espèces associées. L'observation au cours de nos différentes expérimentations de valeurs de disponibilité en P plus importantes en association est également à relativiser au regard de l'expérimentation sur l'apport de N (Chapitre III) où dans un cas particulier, lorsqu'aucune fertilisation  $\text{N-NO}_3^-$  n'a été apportée, la disponibilité de P dans la rhizosphère du pois chiche en association avec le blé dur s'est avéré être deux fois moins importante que celle du pois chiche en culture monospécifique, et égale à celle du sol non rhizosphérique (*i.e.* « bulk soil »).

## **I.2. Implication des modifications de pH induites par les racines dans les interactions pour l'acquisition de P**

Les résultats des différentes expérimentations ont permis de valider le rôle déterminant du pH dans la disponibilité de P, sans toutefois le vérifier systématiquement. Les résultats obtenus au cours de mes différentes expérimentations (*i.e.* en pot et en mini-rhizobox) ont confirmé la relation obtenue par Devau et al. (2010, 2011) entre la concentration en P et pH du sol dans des extraits à l'eau. Le pH est ainsi apparu comme le principal facteur déterminant la disponibilité pour des gammes de pH extrêmes avec, pour les plus acides (env.  $\text{pH} < 6.5$ ), une diminution de la disponibilité de P lorsque le pH augmente et l'inverse pour les valeurs les plus alcalines (env.  $\text{pH} > 7.5$ ). Dans la zone de pH intermédiaire, aux alentours de la neutralité, dans laquelle se situe la valeur de pH initiale du sol étudié, la disponibilité en P n'était pas influencée par le pH. Devau et al. (2010) ont correctement simulé cette relation en tenant uniquement compte du processus d'adsorption/désorption des ions phosphates sur les différents minéraux (argiles et oxydes) du sol. Les ions  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  exsudés par les racines modifient ainsi les propriétés chimiques de la rhizosphère, notamment les charges de surface de ces différents minéraux du sol, qui influencent les échanges entre la phase solide et liquide du sol pouvant aboutir, *in fine*, suivant la gamme de pH concernée, à des augmentations substantielles de disponibilité en P.

Cette relation précise l'effet des variations de pH sur la disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces en associations selon le sens et l'importance de la variation de pH ainsi que la valeur de pH initiale du sol. Elle permet d'expliquer pour quelles raisons contrairement à ce qui a été proposé jusqu'à présent l'acidification de la rhizosphère n'a pas systématiquement abouti à une augmentation de disponibilité mais parfois à une diminution. Elle permet également de justifier pour quelles raisons les augmentations de disponibilité en P observées dans la rhizosphère des espèces en association n'ont pu être attribuées au simple effet du pH. Aucune augmentation de disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces en association n'a ainsi été observée dans le cas d'une diminution de pH. Au cours de l'expérimentation en mini-rhizobox relative à l'apport de différentes quantités de  $\text{N-NO}_3^-$ , la diminution de pH observée dans la rhizosphère des espèces associées a en effet été insuffisante pour induire une augmentation de disponibilité significative, contrairement au pois chiche en culture monospécifique. De façon similaire, une acidification de la rhizosphère a été mesurée simultanément à une diminution de la disponibilité de P dans le cas de l'expérimentation testant l'effet du degré de recouvrement des rhizosphères des deux espèces associées (Chapitre V). Cette diminution s'étendant jusqu'à une distance de 5 mm de la surface des racines n'a pas pu être justifiée par un effet du prélèvement de P par les racines. Compte tenu de la relation entre le pH et le P du sol étudié, la diminution de disponibilité observée a pu, en l'occurrence, être expliquée par la modification de pH induite par les racines. La diminution de la disponibilité de P dans la rhizosphère par rapport au sol témoin sans plantes s'expliquerait ainsi par l'adsorption des ions P suite à la diminution du pH d'une valeur de 7.8 à environ 7.6 dans le cas des traitements avec plantes. Dans ce cas, la valeur initiale de pH du sol était en effet nettement supérieure (env. 7.5) à celle observée dans les expérimentations antérieures en pot et en mini-rhizobox (Chapitres III et IV). Dans le cas de l'alcalinisation de la rhizosphère comme potentiel mécanisme permettant une augmentation de disponibilité et par conséquent pouvant être proposé comme mécanisme de facilitation (pouvant permettre dans ce cas à la céréale de faciliter l'acquisition de P par la légumineuse associée), seule l'expérimentation en pot a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration en P dans la rhizosphère avec une augmentation de pH. Néanmoins, dans ce cas, l'absence de relation entre la concentration en P et le pH sous-entend l'implication d'autres processus rhizosphériques que la seule alcalinisation de la rhizosphère et le prélèvement de P par les racines.

Pour les valeurs intermédiaires de pH, les augmentations de disponibilité de P supérieures dans la rhizosphère des espèces en association au cours de nos différentes expérimentations, suggèrent la modification de la nature et de l'intensité des interactions entre processus rhizosphériques. Certains auteurs avaient ainsi proposé l'implication de différents processus responsables de modifications des propriétés physiques, chimiques et biologiques déterminant la disponibilité en P du sol au voisinage des racines et du partage de P par les espèces végétales cultivées en association : l'exsudation de carboxylates (Li et al., 2010), de phosphatases (Li et al., 2004), l'implication de microorganismes (Song et al., 2002 ;

Wang et al., 2007). Ces modifications peuvent être aussi le résultat de différences de prélèvement de nutriments autres que les ions phosphate comme l'avaient montré Devau et al. (2010) dans le cas du blé dur, ou d'une différence de prélèvement de P. L'ensemble de ces résultats impose une réévaluation de l'hypothèse de départ sur l'effet des modifications de pH sur la disponibilité de P et les mécanismes de facilitation via l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse, nécessitant en outre la prise en compte des caractéristiques initiales du sol considéré.

Nos expérimentations ont permis de souligner l'importance de considérer les effets combinés des processus rhizosphériques mis en œuvre par les deux espèces sur la modification des propriétés physiques, chimiques et biologiques de la rhizosphère déterminant la disponibilité en P du sol. En effet, les propriétés des rhizosphères des espèces en association sont la résultante de l'activité racinaire de chacune des deux espèces. Les valeurs de pH observées dans la rhizosphère des espèces en association ont ainsi eu tendance à se situer entre celles relatives à la rhizosphère de chacune des deux cultures monospécifiques, plus particulièrement dans le cas des dispositifs en mini-rhizobox et de façon moins marquée dans le cas du dispositif en pot. Bien que les processus rhizosphériques des espèces prises séparément puissent affecter positivement la disponibilité en P dans leur rhizosphère, il faut garder en mémoire que l'effet des processus rhizosphériques en association est la résultante du comportement de l'activité racinaire de deux espèces pouvant potentiellement avoir des effets antagonistes et masquer l'effet positif sur la disponibilité de P observé dans le cas des espèces considérées séparément. Dans le cadre de mes travaux, il avait ainsi été initialement proposé que l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse fixatrice de  $N_2$  ait un rôle clé *via* l'augmentation de la disponibilité en P. Par ailleurs, il était attendu que ce phénomène soit accentué suite à l'augmentation du taux de fixation de la légumineuse régulièrement observée en association (Corre-Hellou et al., 2006 ; Fan et al., 2006 ; Bedoussac et al., 2010). Or, ce raisonnement ne tenait pas compte de l'effet opposé de la céréale sur le pH de la rhizosphère résultant de l'activité des deux espèces et donc du flux net de  $H^+$  et  $OH^-$  exsudés respectivement par la légumineuse et le blé dur en relation avec leur nutrition azotée. Sachant que la forme majoritaire prélevée par la céréale dans la plupart des sols agricoles est considérée comme étant le nitrate ( $NO_3^-$ ), il faut s'attendre que l'exsudation résultante d' $OH^-$  par la céréale tamponne l'effet d'acidification de la légumineuse et, *in fine* son effet positif potentiel sur la disponibilité en P. De plus, de nombreuses études ont montré qu'en association le taux de fixation de la légumineuse était augmenté en comparaison de son comportement en culture monospécifique, en raison de la forte compétition exercée par la céréale pour le prélèvement de l'azote minéral du sol, notamment  $NO_3^-$  (Corre-Hellou et al., 2006 ; Fan et al., 2006 ; Bedoussac et al., 2010). Ce phénomène pouvait suggérer une augmentation respective du flux de  $H^+$  dans la rhizosphère de la légumineuse et d' $OH^-$  dans la rhizosphère de la céréale, mais pas nécessairement un effet d'acidification supérieur en association, ainsi que l'avaient montré Li et al. (2008). Cette homogénéisation des valeurs de pH pour les espèces en associations n'ayant néanmoins pas systématiquement été observée (Chapitre



III) il semblerait que certaines conditions puissent amener à conserver des rhizosphères relativement distinctes en association.

La figure 1 synthétise la progression dans la détermination des processus rhizosphériques potentiellement impliqués comme mécanismes de facilitation dans le cas du sol étudié, au cours de ma thèse. Elle tente d'illustrer la complexité des interactions mises en jeu, les compromis qui en résultent et ce que pourrait être le processus dominant dans les différents domaines de pH du sol concernés.

### **I.3. Effet du degré de superposition des rhizosphères des deux espèces végétales associées sur les interactions pour l'acquisition de P**

Au cours de nos différentes expérimentations nous avons pu percevoir l'effet de la proximité des racines dans les interactions pour l'acquisition de P entre espèces associées. L'établissement d'interactions entre plantes implique la superposition de leurs zones d'influence respectives, leur degré de recouvrement influençant la nature et l'intensité de ces interactions (Huston et De Angelis, 1994 ; Rubio et al., 2001 ; Casper et al., 2003 ; Berger et al., 2008 ; Raynaud et al., 2008 ; Armas et Pugnaire, 2011). Dans le cas de l'acquisition de ressources du sol comme les nutriments cela revient à considérer la superposition des rhizosphères, leur degré de recouvrement étant influencé par la proximité des racines des deux espèces ainsi que par l'étendue des processus rhizosphériques sous-jacents, leur extension radiale notamment. Cette distance à la racine détermine jusqu'où la racine d'une espèce végétale peut influencer positivement la disponibilité en P du sol et donc induire des interactions de type facilitation. L'expérimentation en mini-rhizobox a permis de tester plusieurs distances entre les racines en simulant une proximité plus ou moins grande des systèmes racinaires. Les résultats issus des expérimentations en mini-rhizobox pour différents apports de  $\text{N-NO}_3^-$  et en pots ainsi qu'en parcelle expérimentale au champ permettent également de compléter de manière plus indirecte l'évaluation de l'effet du recouvrement des rhizosphères. Les expériences conduites en mini-rhizobox ont permis un développement plus contraint des racines dans l'espace puisque les systèmes racinaires sont réduits à se développer en deux dimensions et que la distance entre les racines des deux espèces associées est fixée à une valeur unique par l'épaisseur de la couche de sol séparant les deux tapis de racines. À l'inverse, les systèmes racinaires se développent en trois dimensions avec des distances éminemment variables entre les racines des deux espèces associées en pots et plus encore au champ.

L'expérimentation spécifiquement établie pour tester l'effet du recouvrement des rhizosphères a mis en évidence, un recouvrement total des rhizosphères des deux espèces associées, quelle que soit la distance entre les systèmes racinaires, dans la gamme des distances testées (3 à 10 mm). De façon surprenante, les différents paramètres mesurés, pH et concentration en P dans des extraits à l'eau, sont restés constants, quel que soit le degré de recouvrement des rhizosphères, alors que des gradients se chevauchant plus ou moins étaient attendus. Ces résultats confirment en fait l'approche de modélisation de Raynaud et al. (2010) qui proposent que, dans le cas des ions  $\text{H}^+$ , compte tenu de leur coefficient

apparent de diffusion relativement élevé dans les sols, ces ions diffusent rapidement jusqu'à induire une augmentation de disponibilité en P de façon homogène à assez grande distance dans la rhizosphère. Dans notre cas, la répartition de la disponibilité en P était homogène, mais compte tenu des caractéristiques du sol, plutôt qu'une augmentation, c'est une diminution de la disponibilité qui a été observée. Lors de l'expérimentation en mini-rhizobox avec différents apports de  $\text{N-NO}_3^-$ , les systèmes racinaires étaient séparés d'une distance constante de 2 mm. Dans la majorité des cas, aucune différence entre les rhizosphères des espèces en association n'a pu être détectée. Les valeurs de pH et de disponibilité en P présentant des valeurs intermédiaires par rapport aux rhizosphères des espèces cultivées seules, comme rapporté par Li et al. (2008) pour un dispositif similaire ainsi que par Cu et al. (2005). Les résultats obtenus en mini-rhizobox sous entendent une homogénéisation du pH ainsi que de la disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces en association.

L'expérimentation en pot a permis également un développement des racines en 3D, mais il ne semble pas avoir abouti à un enchevêtrement total des racines en association. Le comportement différent obtenu dans le cas de l'expérimentation en pot est en effet plus difficile à interpréter car les espèces en association présentant des valeurs de pH distinctes des autres traitements suivant le niveau de disponibilité initial du sol. Ces observations tendraient à proposer que dans le cas de l'expérimentation en pot, les racines étant moins proches les unes des autres, les rhizosphères seraient moins superposées qu'en mini-rhizobox et garderaient leur comportement propre indépendamment des quantités de  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  exsudés par l'espèce associée. Ces résultats semblent donc confirmer le scénario proposé par Raynaud et al. (2008) dans le cas d'un soluté diffusant lentement ou étant dégradé rapidement dans la rhizosphère, tel qu'un carboxylate comme le citrate. Contrairement à la proposition de ces auteurs s'appuyant sur la diffusion rapide des ions  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  dans le sol, nos expérimentations supposeraient toutefois l'homogénéisation en terme de pH de l'ensemble du sol ne se serait pas déroulée dans notre cas. Les simulations de ces mêmes auteurs montrent le rôle déterminant de la teneur en eau du sol dans la diffusion des solutés et la mise en place de gradients de solutés exsudés par les racines, l'augmentation de la teneur en eau du sol et la distance de diffusion étant positivement liées (Raynaud, 2010). Bien que Raynaud et al. (2008) considèrent que cela ait peu d'importance dans le cas des protons, l'humidité du sol rhizosphérique a varié de manière importante entre l'expérimentation en pot et celles conduites en mini-rhizobox, avec respectivement des teneurs moyennes de 9% et 26-36%. Ce facteur pourrait donc avoir joué un rôle dans les différences de comportement observées entre ces différents dispositifs expérimentaux. D'autres caractéristiques relatives aux plantes pourraient être évoquées comme l'âge des racines qui influence le taux d'exsudation ou leur disposition dans l'espace suivant les dispositifs expérimentaux (Raynaud et al., 2008 ; Raynaud, 2010). Concernant la disposition des racines dans l'espace, Raynaud et al. (2008) soulignent que leur modèle ne prend pas en compte l'effet de l'agrégation des racines qui, selon eux, pourrait avoir une influence. L'effet de la variabilité spatiale de l'activité racinaire peut également avoir eu un impact sur ces résultats. Il est en effet connu que l'exsudation de  $\text{H}^+$  varie le long de l'axe racinaire entre

l'apex et la partie basale des racines (voir Hinsinger et al., 2003). Dans le cas des expérimentations en mini-rhizobox, la rhizosphère échantillonnée rend compte de l'effet moyen des racines qui peut aboutir à une surestimation de l'intensité du processus rhizosphérique ne traduisant pas l'hétérogénéité spatiale de la rhizosphère. Dans le cas de l'expérimentation en pot, pour des raisons pratiques, la rhizosphère des deux espèces n'a pu être totalement échantillonnée. Il est possible d'avoir ainsi favorisé la récolte de portions de racines particulières, présentant un efflux de  $H^+$  spécifique.

Dans le cadre de l'expérimentation en parcelle expérimentale au champ, différents types d'organisation spatiale des espèces en association avaient été choisis en lien avec des contraintes techniques de semis selon des pratiques d'agriculteurs. Le pois a ainsi été associé au blé dur en mélange sur la même ligne, alors que, pour le blé dur associé à la féverole les deux espèces étaient disposées sur des lignes distinctes. Au regard des résultats et des modifications de disponibilité plus fréquentes observées dans le cas de l'association blé dur-pois, il semblerait que les interactions entre ces deux espèces aient été plus intenses. Compte tenu du nombre important de facteurs autres que l'organisation spatiale des racines ayant pu intervenir (*e.g.* différentes espèces de légumineuse, différents cultivars de blé dur) les interprétations en ce sens restent néanmoins limitées.

#### **I.4. Relations NxP et effet de la disponibilité en P sur les interactions entre espèces associées pour l'acquisition de P**

Les processus rhizosphériques ainsi que leur effet sur la disponibilité en P sont fortement influencés par l'état nutritionnel des plantes, non pas uniquement concernant le P mais également le N. Or, les associations céréale-légumineuse ont principalement été étudiées pour leurs effets bénéfiques concernant la nutrition azotée. Dans ce contexte, les interactions pour le P sont difficilement dissociables de celles qui concernent N. Dans le cadre de mes expérimentations, je me suis d'abord intéressée à l'effet de la disponibilité initiale en P sur les interactions pour l'acquisition de ce même nutriment. Une hypothèse en écologie est que les interactions positives seraient plus importantes ou intenses dans le cas d'environnements abiotiques plus stressants : « stress gradient hypothesis » (Bertness et Callaway, 1994 ; Brooker et al., 2003). Appliqué au cas d'un nutriment, cela sous entendrait que les mécanismes de facilitation pour son acquisition prédomineraient dans le cas où sa disponibilité dans le sol serait faible. Cette relation entre la part relative des interactions de type facilitation et compétition le long de gradients de stress environnementaux continue cependant à faire débat (Maestre et al., 2009 ; Malkinson et Tielbörger, 2010 ; Le Roux et Mc Geoch, 2010).

Pour éprouver cette hypothèse dans le cas de la disponibilité en P, j'ai réalisé une expérimentation en parcelles expérimentales au champ sur l'essai de fertilisation P de longue durée de Toulouse-Auzeville qui offrait la possibilité d'évaluer l'effet de 3 niveaux de disponibilité en P correspondant à des apports contrastés de P allant de l'absence de fertilisation depuis 40 ans (avec un stress avéré sur les cultures en terme de carence en P) à une fertilisation évaluée substantiellement supérieure à l'exportation annuelle et couvrant

largement les besoins nutritionnels des cultures (Colomb et al., 2007). Les résultats obtenus n'ont cependant pas permis d'établir de relations claires, sans doute du fait de l'influence de nombreux autres facteurs limitants ayant pu masquer l'effet de la disponibilité en P du sol. Des mesures du taux de fixation de  $N_2$  par les légumineuses (Eric Justes, communication personnelle) ont montré une diminution lorsque la disponibilité en P diminue ; ceci a pu limiter les performances de l'association par une diminution de son effet bénéfique concernant N.

L'expérimentation en pot nous a permis d'évaluer plus avant l'effet de la disponibilité initiale en P sur les interactions pour un sol présentant deux niveaux contrastés. Les augmentations de disponibilité en P mesurées dans la rhizosphère du blé dur et du pois chiche étaient plus marquées dans le cas du traitement non fertilisé (-P). Ces résultats ont ainsi confirmé ce qui avait été proposé par Devau et al. (2011) sur le même sol dans le cas d'un cultivar de blé dur différent. En ce qui concerne les variations entre les espèces en association ou en culture monospécifique, les résultats de biomasse ont montré une amélioration significative de la croissance du blé dur associé au pois chiche et uniquement dans le traitement -P correspondant à un niveau de disponibilité en P considéré comme limitant pour la croissance des plantes, répondant ainsi au « stress gradient hypothesis ». Concernant les autres variables mesurées, les résultats ont cependant été plus contrastés et dépendant en partie des interactions complexes entre nutriments N et P. En effet, afin de permettre le maintien de l'activité fixatrice de  $N_2$ , compte tenu de l'effet inhibiteur du nitrate (e.g. Voisin et al. 2002), une faible quantité de N avait en effet été apportée sous forme d'urée. Dans le cas du traitement non fertilisé (-P) les résultats ont ainsi montré une limitation du fonctionnement des plantes par P, alors que dans le traitement fertilisé (+P) les plantes semblent avoir été limitées par N.

Outre ces difficultés méthodologiques, l'expérimentation en pot a permis d'observer des variations de disponibilité en P dans la rhizosphère et l'effet des interactions pour le P pour différentes valeurs de disponibilité en P initiale du sol. Dans le cas du traitement -P, des valeurs plus élevées de disponibilité ont été observées dans la rhizosphère du blé dur en association avec le pois chiche. Néanmoins, cette augmentation n'était pas le résultat de l'acidification de la rhizosphère par la légumineuse fixatrice de  $N_2$ . En effet, la faible disponibilité en P semble avoir limité de façon importante l'activité fixatrice du pois chiche comme montré par différents auteurs dans la littérature (Graham et Vance, 1999; Vitousek et al., 2002 ; Reed et al., 2007). Dans l'hypothèse où la fixation de  $N_2$  par la légumineuse aurait un effet déterminant dans les interactions pour l'acquisition de P le modèle de « stress gradient hypothesis » ne serait ainsi pas valable au regard de la disponibilité initiale en P du sol pour de très faibles valeurs. Des observations similaires en conditions extrêmes de stress abiotiques ont été relayées par différentes études en écologie proposant ainsi une révision de l'hypothèse de départ en particulier dans le cas de conditions extrêmes de stress abiotique (Le Roux et Mc Geoch, 2010 ; Malkinson et Tielbörger, 2010). D'autres auteurs comme Maestre et al. (2009) ont également souligné la complexité des relations entre interactions et stress abiotique notamment suivant les caractéristiques du stress, les

critères, l'étendue du gradient. Ces constatations permettent de réévaluer les travaux de Li et al. (2007) montrant la diminution de l'avantage en termes de rendement de l'association maïs-féverole sur celle de l'association maïs-blé lorsque le niveau de fertilisation en P augmente, aucune indication sur la disponibilité du sol n'étant indiquée par ces auteurs. De plus, au cours de ces expérimentations, les quantités de N apportées afin de s'affranchir d'une limitation par le P peuvent avoir inhibé l'effet de la fixation de N<sub>2</sub> par la légumineuse. Cette démarche a pour conséquence de limiter la nature des mécanismes impliqués en comparaison des pratiques habituelles des cultures associées céréale-légumineuse visant à optimiser la complémentarité d'acquisition de N entre les deux espèces en favorisant la fixation symbiotique de N<sub>2</sub>.

## II. Perspectives

### II.1. Relations entre effet des interactions entre espèces sur la disponibilité en P et sur son acquisition

Au cours de nos différentes expérimentations, nous avons pu observer des modifications importantes de disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces étudiées et plus particulièrement des augmentations par rapport au sol non rhizosphérique (« bulk soil »). Il a également été possible d'observer des variations de l'importance de ces augmentations suivant les espèces mais aussi, pour une espèce donnée, entre sa culture monospécifique et sa culture en association pouvant *in fine* aboutir à de la facilitation par amélioration de l'acquisition de P. Néanmoins, ces modifications de disponibilité au niveau de la rhizosphère n'ont que très rarement été associées avec des variations des performances des espèces en termes de biomasse, concentration en P ou prélèvement de P. Plusieurs explications peuvent être proposées pour ce décalage entre l'effet des interactions sur la disponibilité de P et la réponse des plantes à ces modifications. La première explication est d'ordre méthodologique. Afin de pouvoir étudier les interactions au niveau de la rhizosphère et d'essayer de déterminer les mécanismes impliqués dans les variations de disponibilité, il a été nécessaire de choisir des dispositifs permettant de contraindre le plus grand nombre de variables. Dans un premier temps le choix s'est porté sur des expérimentations en pot en conditions contrôlées sous serre. Cette approche nous a permis de détecter des variations de biomasse et d'évaluer le prélèvement de P et de N par les plantes mais également au niveau de la rhizosphère. Néanmoins une limite de ce dispositif est la faible quantité de sol ainsi récoltée qui réduit le nombre d'analyses possibles et augmente la variabilité des mesures entre échantillons. L'utilisation de dispositifs de type mini-rhizobox a permis en revanche la récolte de grandes quantités de sol rhizosphérique. L'amélioration de la précision de l'analyse des mécanismes rhizosphériques s'est néanmoins faite au détriment de l'évaluation du prélèvement de P par les plantes au cours du faible temps de contact avec le sol. En effet, les plantes ont été cultivées au préalable en hydroponie afin de permettre un développement suffisant du système racinaire pour couvrir l'ensemble de la surface du sol, de sorte que celui-ci puisse être ensuite considéré comme entièrement rhizosphérique. Le temps de contact est court car les conditions sont très contraignantes pour la nutrition des

plantes dans ce type de dispositif, en particulier la nutrition phosphatée, du fait du volume de sol restreint auquel ont accès les plantes (de 14 à 32 g plante<sup>-1</sup> selon les dispositifs). De ce fait, la quantité de P prélevée pendant la période de contact avec le sol est souvent faible et masquée par la variabilité entre plantes. L'étude des interactions entre espèces consistant en la comparaison des rhizosphères de chaque espèce en culture associée et en culture monospécifique, l'objectif était alors de pouvoir détecter des différences entre ces deux traitements. Ceci suggère que la différence induite par le traitement soit suffisamment importante. Cela s'est avéré possible dans le cas où la différence entre la disponibilité en P dans la rhizosphère du pois chiche en culture monospécifique a été augmentée de 200% par rapport à celle dans la rhizosphère du pois chiche associé au blé dur. Dans ce cas le prélèvement du pois chiche en culture monospécifique a pu être détecté et l'augmentation du P contenu dans la biomasse était supérieure de 42%. Un moyen de parer à cette limite serait d'augmenter sensiblement le nombre de répétitions. Pour des raisons pratiques, l'augmentation du nombre de répétitions impliquerait une diminution du nombre de traitements afin de ne pas démultiplier le nombre de dispositifs. Cela contraindrait à des expérimentations plus simples, limitant le nombre de facteurs testés.

Une autre explication, plus conceptuelle pourrait être proposée quant à l'effet des interactions sur la disponibilité en P observé dans la rhizosphère qui n'a pas pu être détecté et exprimé en termes de prélèvement de P par les plantes. Les mesures effectuées sont ponctuelles dans le temps. Il est ainsi supposé que l'image instantanée de la rhizosphère reflète l'effet des racines au cours de la période de culture. La période de prélèvement est habituellement choisie pendant la phase clé pour l'acquisition de P, considérée comme étant celle du développement végétatif. Ce présupposé implique que les propriétés de la rhizosphère soient stables au cours du temps. Or la rhizosphère est déterminée par de nombreux gradients de solutés dont le développement varie au cours du temps et dans l'espace (Darrah et al., 2006 ; Hinsinger et al., 2005 ; Raynaud, 2010). Leur établissement dépend du transport des solutés dans le sol par les mouvements d'eau (*i.e.* advection) ou par diffusion. Ces gradients concernent à la fois les flux sortants de solutés pouvant agir sur la disponibilité de P et les flux entrants comme ceux des ions phosphate en lien avec le prélèvement par les racines. Dans le cas des cultures annuelles, il est considéré que les paramètres caractérisant la croissance des racines et le prélèvement de P sont constants au cours de la période végétative puis déclinent après la floraison (Hinsinger et al., 2011a). En revanche, l'exsudation de composés par les racines ou encore les prélèvements d'eau peuvent modifier les propriétés de la rhizosphère sur des pas de temps très courts. Il a été montré que des changements des flux de solutés sortants peuvent survenir rapidement en lien par exemple avec les rythmes nycthéméraux d'exsudation de protons ou d'échanges gazeux des racines (Blossfeld et Gansert 2007 ; Blossfeld et al. 2011). La même constatation a été faite pour les flux d'eau dans la rhizosphère, en lien avec les variations du flux transpiratoire au cours de la journée (Doussan et al. 2003 ; Raynaud, 2010). Certaines fonctions n'apparaissent qu'à certains moments du développement de la plante comme la formation des racines en « cluster » exsudant de larges quantités de protons et de

carboxylates à maturité et disparaissant au bout de quelques jours chez certaines espèces comme le lupin blanc (Neumann et Martinoia, 2002), la mise en place des symbioses (*e.g.* mycorhization des racines ou nodulation des légumineuses) ou la structuration des communautés microbiennes en relation avec l'exsudation de composés carbonés (Marschner et al., 2002). La réponse à des modifications de disponibilité peut également être de l'ordre de quelques heures et être réversible (Metlen et al., 2009). Ainsi une mesure ponctuelle ne permet pas forcément d'avoir une vision intégrative des changements opérant dans la rhizosphère et pouvant influencer la disponibilité de P et son acquisition par la plante.

Afin de s'affranchir de cette variabilité dans l'interprétation des variations des propriétés de la rhizosphère au cours du temps il serait nécessaire d'en effectuer un suivi dynamique. Ce suivi dynamique peut être entrepris par des prélèvements répétés dans le temps qui sont cependant méthodologiquement lourds à mettre en place. Parmi les techniques existantes permettant un suivi *in situ*, il est possible de citer la famille des senseurs optiques permettant de suivre au cours du temps des variations de pH ou de concentration en O<sub>2</sub> (Blossfeld et al., 2011). Ces senseurs ont également été développés pour les ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Strömberg, 2008). Néanmoins, ces systèmes sont coûteux et de petite taille, de sorte que le suivi de la variation des paramètres est souvent spatialement localisé et restreint à de petites portions de racines. Des optodes pour le pH ont été utilisées lors de l'expérimentation en mini-rhizobox relative à l'évaluation de la proximité des racines et du recouvrement des rhizosphères sur les interactions pour le P entre espèces associées. Les résultats obtenus n'ont à l'heure actuelle pas pu être complètement exploités mais tendent à montrer une évolution progressive des gradients de pH dans la rhizosphère au cours du temps (Annexe A.2).

## **II.2. Amélioration de l'acquisition de P : hiérarchisation des mécanismes et influence de la facilitation**

Les résultats ont été obtenus dans un seul type de sol dont les caractéristiques déterminent sa réponse aux variations de ses propriétés physiques, chimiques et biologiques influençant la disponibilité en P. Il serait alors intéressant pour éprouver le caractère générique de nos résultats d'évaluer, dans différents types de sols, l'influence respective des mécanismes rhizosphériques et en particulier l'implication des modifications de pH dans les interactions pour l'acquisition de P en culture associée. Dans le cas du sol étudié, nous avons ainsi pu confirmer le rôle déterminant du pH sur la disponibilité de P du sol. Les variations de pH induites par les racines apparaissent donc comme un processus rhizosphérique clé permettant d'induire des augmentations de disponibilité en P dans la rhizosphère des espèces associées et pouvant ainsi être proposé comme mécanisme de facilitation. Bien que les modifications de pH induites par les racines puissent être impliquées comme mécanisme de facilitation, nous avons toutefois été confrontés à des cas où les augmentations de disponibilité en P observées dans la rhizosphère des espèces en association n'ont pu être attribuées au simple effet du pH. D'autres processus rhizosphériques sont donc à prendre en

compte, ainsi que leurs possibles interactions. Cette hiérarchisation de l'influence respective des processus pourrait également permettre d'évaluer l'importance de l'activité des microorganismes du sol sur la détermination de la disponibilité en P dans la rhizosphère. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de souligner l'importance de la prise en compte de l'activité racinaire des deux plantes dans la modification des propriétés physiques, chimiques et biologiques de la rhizosphère des espèces en association. Il semble alors nécessaire de déterminer la part de chacune des espèces dans ces modifications des propriétés de la rhizosphère. Si l'on se focalise sur un processus rhizosphérique donné, les deux espèces peuvent ainsi induire des processus aux effets synergiques ou antagonistes, comme montré dans le cas particulier des cultures associées céréale-légumineuse en ce qui concerne le pH. Si à présent il est pris en compte les possibles interactions entre plusieurs processus et le comportement contrasté des deux espèces, l'évaluation des processus rhizosphériques impliqués dans des mécanismes de facilitation augmente en complexité. De plus, l'activité racinaire des plantes et donc les caractéristiques des processus rhizosphériques qui y sont liés sont influencés par l'état nutritionnel de la plante, lui-même déterminé par de nombreuses interactions entre nutriments comme cela a été illustré entre P et N pour les associations céréale-légumineuse.

En plus de la nécessité de prendre en compte l'effet combiné des deux espèces, une étape supplémentaire serait de considérer de l'effet de la disposition des racines dans l'espace. Dans notre cas, l'étude des mécanismes rhizosphériques a nécessité la mise en place de dispositifs très artificialisés ne permettant pas de rendre compte totalement de l'importance du positionnement des racines dans l'espace qui influencent grandement la géométrie de leurs rhizosphères et leur degré de recouvrement, ainsi que, *in fine*, l'intensité des interactions entre les espèces associées. Ce facteur semble particulièrement important à prendre en compte dans le cas des agroécosystèmes. En effet, contrairement aux écosystèmes naturels, dans le cas des associations d'espèces cultivées, leur positionnement est dirigé, résultant des choix techniques des agriculteurs lors du semis. De plus, il serait également nécessaire de prendre en compte, en plus de la dynamique spatiale de la rhizosphère, sa dynamique temporelle pour que l'analyse des interactions et des processus rhizosphériques impliqués soit plus complète. L'intégration du rôle des mycorhizes dans le développement spatial du système racinaire et des interactions entre espèces végétales associées serait alors également à considérer. Un niveau de complexité supplémentaire est introduit par la plasticité racinaire en réponse à la présence d'un individu et/ou à l'hétérogénéité du sol. Au final, cette dernière étape prenant en compte l'organisation spatiale des espèces et de leurs systèmes racinaires pourrait être un moyen d'évaluer l'importance respective des mécanismes de facilitation et de complémentarité essentiellement spatiale et temporelle dans les phénomènes d'interactions positives entre espèces associées se traduisant par une amélioration de l'acquisition de P.

La revue de ces différents points amène à un niveau de complexité tel que l'approche expérimentale ne permettrait pas de l'intégrer. La modélisation s'avère alors un outil incontournable pour la compréhension et la hiérarchisation des différents mécanismes



rhizosphériques impliqués dans les interactions de type facilitation et l'évaluation de leur importance dans l'amélioration de l'acquisition du P des espèces en association. Plusieurs tentatives de modélisation ont été entreprises afin de rendre compte de l'effet des interactions entre plantes sur le partage des ressources en nutriments avec des niveaux variables de complexité, prenant en compte un nombre plus ou moins important de paramètres pouvant avoir une influence. Différents facteurs qui ont été précédemment cités pour leur capacité d'influencer l'acquisition des nutriments ont été pris en compte essentiellement dans des modèles à l'échelle de la racine mais peu à l'échelle de l'ensemble du système racinaire, et *a fortiori* dans des modèles plus complexes intégrant des interactions entre plantes (voir la synthèse de Hinsinger et al., (2011b) ; Postma et Lynch, 2012). Parmi ces différents modèles, Raynaud et collaborateurs ont progressivement complexifié leur premier modèle de compétition (Raynaud et al., 2004) en prenant en compte la capacité des plantes à augmenter la disponibilité d'un nutriment dans leur rhizosphère (Raynaud et al., 2008). Alors que ces auteurs ont considéré la répartition des racines dans un espace à deux dimensions, Postma et Lynch (2012) ont quant à eux proposé un modèle permettant de prendre en compte la répartition des racines dans un espace à trois dimensions. En plus de la simulation de l'architecture racinaire, ces auteurs ont également pris en compte l'influence de la fixation symbiotique sur l'acquisition de N et l'exsudation de composés mobilisateurs de P sur son acquisition. Les simulations de Postma et al. (2012) ont eu pour but d'évaluer l'importance de la complémentarité spatiale entre les racines des espèces en association sur les interactions pour l'acquisition de nutriments à partir de l'exemple de l'association de maïs-haricot-courge, traditionnelle en Amérique latine. Ces auteurs ont ainsi conclu que dans le cas de nutriments à faible mobilité dans le sol tels que P, la distance entre les racines des espèces en association était trop importante pour permettre la superposition des rhizosphères et ainsi l'établissement d'interactions. Les modèles proposés par Raynaud et al. (2004, 2008) ainsi que par Postma et Lynch, (2012) privilégient la représentation de différents facteurs influençant l'acquisition des nutriments, respectivement les modifications des propriétés chimiques de la rhizosphère et l'architecture racinaire. Ces choix sont susceptibles d'influencer les interprétations sur l'évaluation de la part relative des mécanismes de facilitation et la complémentarité spatiale des racines dans l'amélioration de l'acquisition des nutriments entre espèces. Ces approches paraissent complémentaires et pourraient être affinées afin de prendre en compte un ensemble complet de facteurs pouvant influencer l'acquisition des nutriments, comme ceux précédemment cités dans le cas de P. Alors que Postma et Lynch, (2012) prennent en compte l'architecture racinaire et Raynaud et al. (2004, 2008) considèrent les modifications de disponibilité dans la rhizosphère en réponse à l'activité des racines, il serait par exemple intéressant de pouvoir prendre en compte leur variabilité spatiale voire temporelle comme proposé par Doussan et al. (2006) dans le cas du prélèvement d'eau de plantes isolées. Les champignons mycorhiziens peuvent également avoir un rôle important dans l'étendue de la rhizosphère des espèces et donc potentiellement leurs interactions. Les travaux de Schnepf et al. (2008, 2011) ont récemment permis de modéliser l'effet des mycorhizes sur le

prélèvement de P par les racines ainsi que leur dynamique de prélèvement dans le temps et dans l'espace. Une telle démarche pourrait alors être envisagée dans le cas de plusieurs plantes en interactions et espèces en association. La prise en compte de ces différents acteurs et mécanismes augmente le niveau de complexité de ces modèles mécanistes et donc le nombre de paramètres à considérer, qui peuvent être parfois difficiles à mesurer expérimentalement.

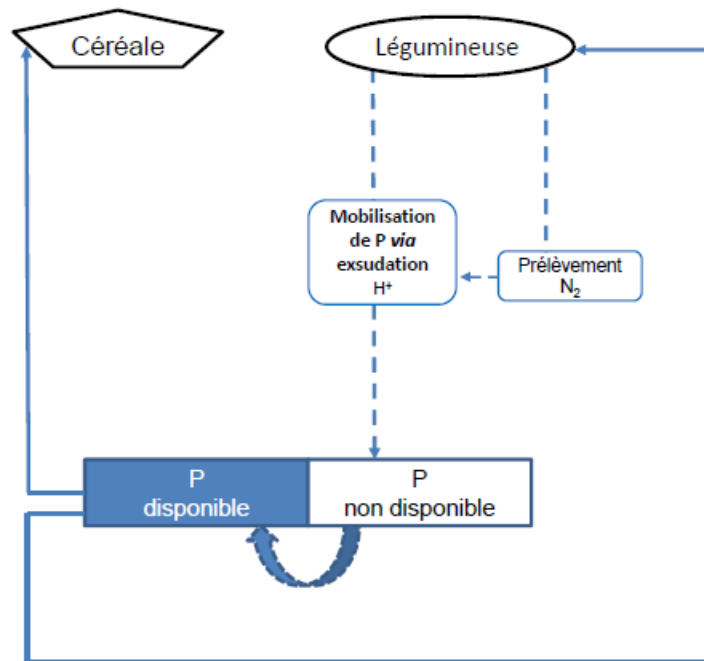
### **II.3. Valorisation de la diversité génotypique/fonctionnelle en agriculture : potentiel vis à vis du P**

Les résultats obtenus suite à l'expérimentation en pot ont mis en évidence la facilitation de la croissance du blé dur par le pois chiche associé. Cette amélioration a été observée uniquement pour une disponibilité en P considérée comme limitante pour la croissance des plantes. Bien que les mécanismes à l'origine n'aient pu être clairement démontrés, ces résultats suggèrent un avantage des associations pour des agroécosystèmes à faible niveau d'intrants. Les performances des associations au champ restent plus mitigées mais ont néanmoins permis de montrer un avantage des associations en termes de biomasse et d'exportation de P par rapport au blé dur cultivé seul. Afin d'évaluer de manière plus complète le potentiel des associations céréale-légumineuse sur l'amélioration des performances en relation avec la nutrition phosphatée des travaux de recherches supplémentaires seraient nécessaires. Alors qu'il existe une littérature abondante sur l'effet positif des associations céréale-légumineuse sur la nutrition azotée, très peu de travaux concernent le P. L'essentiel de la littérature à ce sujet provient de Chine, pays dans lequel ces systèmes sont une pratique agricole courante ; il est toutefois important de souligner que ces systèmes diffèrent de ceux proposées par la recherche en Europe. Ces cultures associées sont en effet pratiquées dans le cas de semis de chaque espèce en larges bandes intercalées (« strip intercropping »), le semis et la récolte étant éventuellement décalés dans le temps en fonction de la phénologie des espèces associées. En Europe, la majorité des travaux de recherche sur les associations céréale-légumineuse s'est focalisée sur des associations pour lesquels les espèces sont disposées en rangs ou en mélange sur le rang, semés et récoltés en même temps. Parmi les différents travaux ayant étudié l'effet positif de ce type d'association céréale-légumineuse sur le P, une des études les plus complètes a été réalisée par Hauggaard-Nielsen et al. (2009). Ces auteurs rapportent les résultats de l'analyse des performances de cultures associées orge-pois dans le cas d'un réseau européen de parcelles en agriculture biologique et reste une des seules références actuelles sur le P. Dans cette étude, un nombre restreint de parcelles ont pu être analysées et montrent un effet positif des associations concernant le P. En parallèle, des travaux ont été effectués sur les associations de céréales et de légumineuses fourragères. Ce modèle pratiqué pour la valorisation des produits en élevage concerne le plus souvent des semis en relais, la légumineuse étant récoltée ou non. De manière générale très peu de données sont disponibles concernant P dans ces travaux. Il est important de souligner que les sols agricoles européens sont souvent riches en P suite à une fertilisation importante, voire

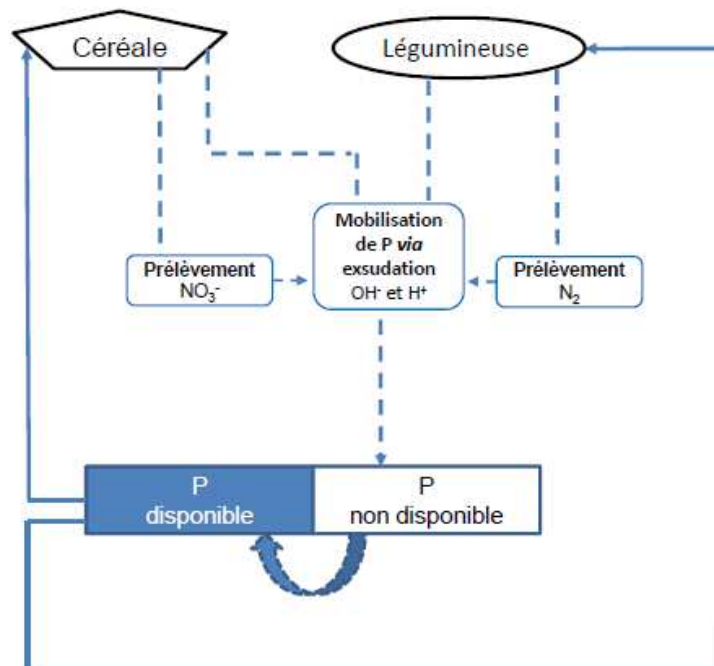
excessive. La plupart des études sur les cultures associées ont été réalisées pour des valeurs de disponibilité en P du sol considérées comme non limitantes pour la croissance des plantes, l'amélioration des performances concernant le P étant alors considérée comme un effet indirect résultant de l'amélioration de l'acquisition d'une autre ressource (Anil et al., 1998). Néanmoins, la diminution progressive de l'accès au fertilisant P pourrait permettre de développer la recherche sur les cultures associées afin d'évaluer plus largement leur potentiel vis à vis de la valorisation du P sol.

Dans le but d'améliorer l'efficacité des cultures associées à mobiliser le P, il semble probable que la mise en place, de nombreux itinéraires techniques introduisant la diversité génotypique et non pas uniquement spécifique soit la piste la plus prometteuse comme alternative à l'utilisation de fertilisants phosphatés. Cette diversité d'itinéraires techniques présente l'avantage de permettre et faciliter l'adaptation de ces systèmes aux conditions pédo-climatiques du milieu qui représente une variable clé, comme l'ont montré nos résultats. Ce fait a également été relayé concernant le P par Wang et al. (2007, 2012) pour l'association du blé tendre au lupin blanc, à la féverole ou au colza mais aussi dans le cas de l'association de plusieurs cultivars de haricot (Henry et al., 2010). Il serait alors intéressant de développer dans le cas du P comme cela a été envisagé de manière générale en agronomie la démarche employée en écologie quant aux traits fonctionnels (Garnier et Navas, 2012). Ces traits fonctionnels sont des caractéristiques phénologiques et physiologiques mesurables permettant de renseigner sur le fonctionnement des plantes comme par exemple le comportement vis à vis de l'acquisition d'une ressource ainsi que l'aboutissement des interactions entre espèces (Violle et al., 2007, 2009). Cette démarche encore récente semblerait intéressante pour orienter le choix des espèces à associer, à compléter par la prise en compte de l'importance des processus rhizosphériques dans l'acquisition des nutriments. Mon travail de thèse apporte ainsi les premières bases d'une démarche *via* les traits rhizosphériques indispensable à l'analyse des interactions pour l'acquisition d'un nutriment. Bien entendu, le développement de cette approche « traits fonctionnels et design de peuplements pluri-spécifiques performants » et la prise en compte de l'activité des racines sur la disponibilité des ressources nécessiterait des travaux de recherches supplémentaires.

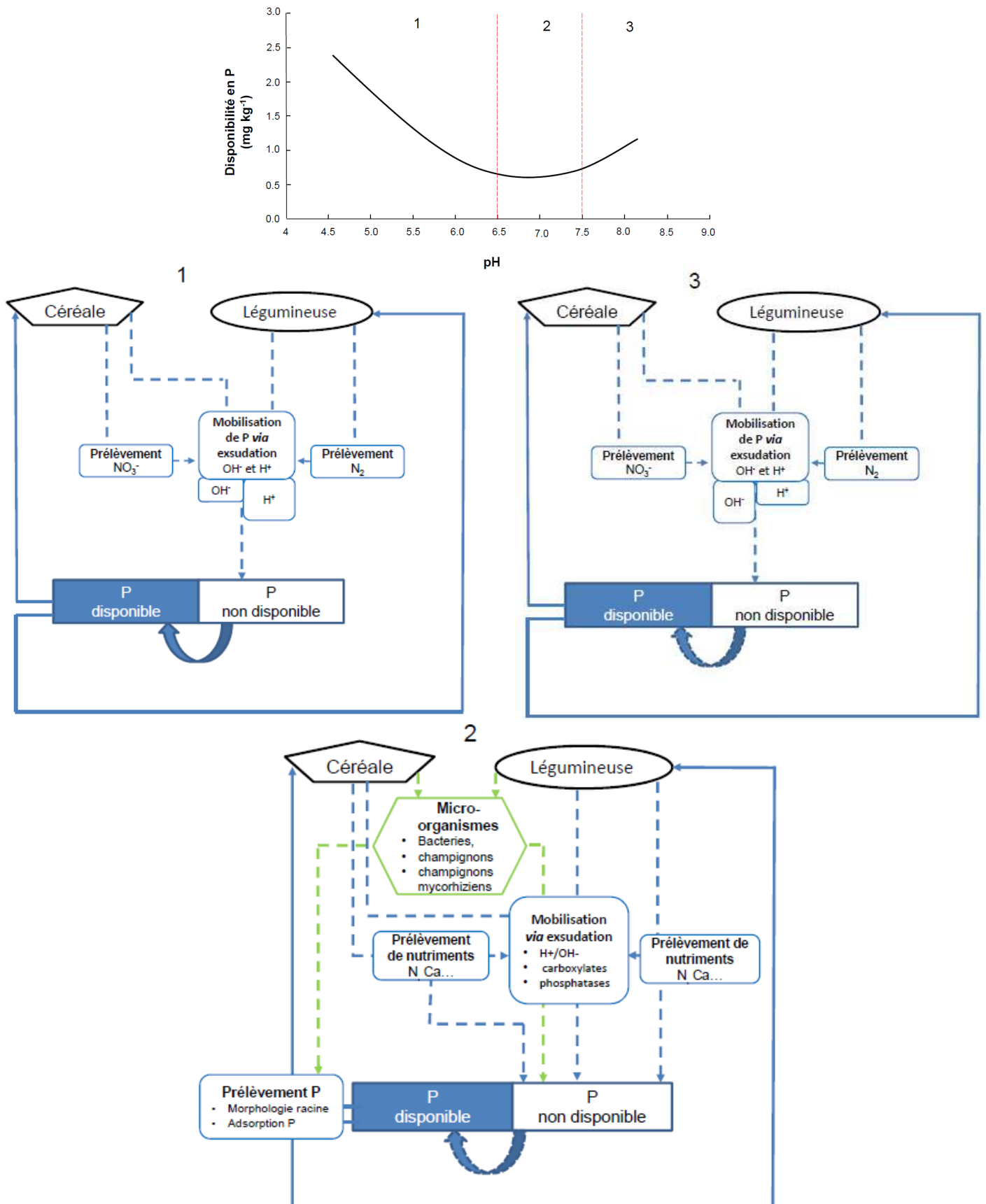
La page suivante présente différents schémas récapitulatifs adaptés de Hinsinger et al. (2011b) récapitulant les différents mécanismes rhizosphériques impliqués dans des interactions de type facilitation pour l'acquisition de P dans les associations céréale-légumineuse. Les flèches en pointillé indiquent comment les espèces modifient la disponibilité en P soit directement (en bleu) soit indirectement via les microorganismes du sol (en vert). Ces processus amènent à une augmentation de la disponibilité en P et in fine du prélèvement de P par les espèces (flèche pleine bleue) et à l'amélioration de l'acquisition (*i.e.* facilitation) d'au moins une des espèces en comparaison des cultures monospécifiques.



**Figure 1** Interactions de type facilitation pour l'acquisition de P dans les associations céréale-légumineuse. Hypothèse initiale. Légende voir plus haut.



**Figure 2** Interactions de type facilitation pour l'acquisition de P dans les associations céréale-légumineuse. Implication des modifications de pH induites par les racines des 2 espèces. Légende voir plus haut.



**Figure 3.** Interactions de type facilitation pour l'acquisition de P dans les associations céréale-légumineuse. Implication des différents processus rhizosphériques comme mécanismes de facilitation selon les caractéristiques du sol dans le cas du sol étudié pour trois gammes de pH renseignées par la courbe de réponse de la disponibilité en au pH. Légende voir plus haut.

## Références bibliographiques

- Armas, C., Pugnaire F. I. 2011. Belowground zone of influence in a tussock grass species. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 37:284-289.
- Bagayoko, M., Alvey S., Neumann G., Buerkert A. 2000. Root-induced increases in soil pH and nutrient availability to field-grown cereals and legumes on acid sandy soils of Sudano-Sahelian West Africa. *Plant and Soil* 225:117-127.
- Barber, S. A. 1995. *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. Wiley, New York 384pp.
- Bedoussac, L. Justes E. 2010. Dynamic analysis of competition and complementarity for light and N use to understand the yield and the protein content of a durum wheat-winter pea intercrop. *Plant and Soil* 330:37-54.
- Berger, U., Piou C., Schiffers K., Grimm V. 2008. Competition among plants: Concepts, individual-based modeling approaches, and a proposal for a future research strategy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9: 121–135.
- Bertness, M. D., Callaway R. 1994. Positive interactions in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 191-193.
- Blossfeld, S., Gansert D. 2007. A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH dynamics in the rhizosphere of plants. *Plant Cell and Environment* 30: 176-186.
- Blossfeld, S., Gansert D., Thiele B., Kuhn A. J., Loesch R. 2011. The dynamics of oxygen concentration, pH value, and organic acids in the rhizosphere of *Juncus* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1186-1197.
- Brooker, R.W., Maestre F.T., Callaway R.M., Lortie C.L., Cavieres L.A. , Kunstler G., Liancourt P., Tielborger K., Travis, J.M.J., Anthelme F., Armas C., Coll L., Corcket E., Delzon S., Forey E., Kikvidze Z., Olofsson J., Pugnaire F., Quiroz C.L., Saccone P., Schiffers K., Seifan M., Touzard B., Michalet R. 2003. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* 96: 18-34.
- Casper, B.B., Schenk H.J., Jackson R.B. 2003. Defining a plant's belowground of influence. *Ecology* 84: 2313-2321.
- Chen, C. R., Condron L. M., Davis M. R., Sherlock R. R. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biology and Biochemistry* 34:487-499.
- Colomb, B., Debaeke P., Jouany C., Nolot J. M. 2007. Phosphorus management in low input stockless cropping systems: Crop and soil responses to contrasting P regimes in a 36-year experiment in southern France. *European Journal of Agronomy* 26:154-165.
- Corre-Hellou, Fustec G., J., Crozat Y. 2006. Interspecific competition for soil N and its interaction with N<sub>2</sub> fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant and Soil* 282:195-208.
- Cu, S. T. T., Hutson J., Schuller K. A. 2005. Mixed culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with white lupin (*Lupinus albus* L.) improves the growth and phosphorus nutrition of the wheat. *Plant and Soil* 272:143-151.
- Darrah, P. R., Jones D. L., Kirk G. J. D., Roose T. 2006. Modelling the rhizosphere: a review of methods for 'upscaling' to the whole-plant scale. *European Journal of Soil Science* 57: 13-25.
- Devau, N., Le Cadre E., Hinsinger P., Gerard F. 2010. A mechanistic model for understanding root-induced chemical changes controlling phosphorus availability. *Annals of Botany* 105:1183-1197.

- Devau, N., Hinsinger P., Le Cadre E., Gerard F. 2011. Root-induced processes controlling phosphate availability in soils with contrasted P-fertilized treatments. *Plant and Soil* 348:203-218.
- Doussan, C., Pages L., Pierret A. 2003. Soil exploration and resource acquisition by plant roots: an architectural and modelling point of view. *Agronomie* 23: 419-431.
- Doussan, C., Pierret A., Garrigues E., Pages L. 2006. Water uptake by plant roots: II - Modelling of water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system - Comparison with experiments. *Plant and Soil* 283:99-117.
- Fan, F., Zhang F., Song Y., Sun J., Bao X., Guo T., Li L. 2006. Nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) interacting with a non-legume in two contrasting intercropping systems. *Plant and Soil* 283: 275-286.
- Garnier, E. Navas M. L. 2012. A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32:365-399.
- Geelhoed, J. S., van Riemsdijk W. H., Findenegg G. R. 1999. Simulation of the effect of citrate exudation from roots on the plant availability of phosphate adsorbed on goethite. *European Journal of Soil Science* 50:379-390.
- Graham, P. H., Vance C. P. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research* 65: 93-106.
- Hauggaard-Nielsen, H., Gooding M., Ambus P., Corre-Hellou G., Crozat Y., Dahlmann C., Dibet A., von Fragstein P., Pristeri A., Monti M., Jensen E. S. 2009. Pea-barley intercropping for efficient symbiotic N<sub>2</sub>-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crops Research* 113:64-71.
- Henry, A., Carlos Rosas J., Beaver J. S., Lynch J. P. 2010. Multiple stress response and belowground competition in multilines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* 117:209-218.
- Hinsinger, P. Gilkes R. J. 1996. Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science* 47:533-544.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil* 237:173-195.
- Hinsinger, P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248:43-59.
- Hinsinger P., Gobran G.R., Gregory P.J., Wenzel W.W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist* 168:293-303.
- Hinsinger, P., Brauman A., Devau N., Gérard F., Jourdan C., Laclau J-P., Le Cadre E., Jaillard B. 2011a. Acquisition of phosphorus and other poorly mobile nutrients by roots. Where do plant nutrition models fail? *Plant and Soil* 348:203-218.
- Hinsinger, P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J. B., Tang X. Y., Zhang F. S. 2011b. P for Two, Sharing a Scarce Resource: Soil Phosphorus Acquisition in the Rhizosphere of Intercropped Species. *Plant Physiology* 156:1078-1086.
- Hubel, F., Beck E. 1993. In-situ determination of the P-relations around the primary root of maize with respect to inorganic and phytate-P. *Plant and Soil* 157:1-9.
- Huston, M. A., De Angelis D. L. 1994. Competition and coexistence: the effects of resource transport and supply rates. *American Naturalist* 144: 954-977.

- Le Roux, P. C., McGeoch M. A. 2010. Interaction intensity and importance along two stress gradients: adding shape to the stress-gradient hypothesis. *Oecologia* 162:733-745.
- Li, S. M., Li L., Zhang F. S., Tang C. 2004. Acid phosphatase role in chickpea/maize intercropping. *Annals of Botany* 94:297-303.
- Li, L., Li S.M., Sun J.H., Zhou L.L., Bao X.G., Zhang H.G., Zhang F.S. 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11192-11196.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Clairotte M., Drevon J. J., Le Cadre E., Hinsinger P. 2008. Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) grown in monocropping and intercropping systems. *Plant and Soil* 312:139-150.
- Li, H., Shen J., Zhang F., Marschner P., Cawthray G., Rengel Z. 2010. Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil. *Biology and Fertility of Soils* 46:79-91.
- Maestre, F. T., Callaway R. M., Valladares F., Lortie C. J. 2009. Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97:199-205.
- Malkinson, D. Tielboerger K. 2010. What does the stress-gradient hypothesis predict? Resolving the discrepancies. *Oikos* 119:1546-1552.
- Marschner, P., Neumann G., Kania A., Weiskopf L., Lieberei R. 2002. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant and Soil* 246:167-174.
- Metlen, K. L., Aschehoug E. T., Callaway R. M. 2009. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant Cell and Environment* 32:641-653.
- Neumann, G., Martinoia E. 2002. Cluster roots - an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science* 7: 162-167.
- Nuruzzaman, M., Lambers H., Bolland M. D. A., Veneklaas E. J. 2006. Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant and Soil* 281:109-120.
- Nye, P. H. 1983. The diffusion of 2 interacting solutes in soil. *Journal of Soil Science* 34:677-691.
- Postma, J. A., Lynch J. P. 2012. Complementarity in root architecture for nutrient uptake in ancient maize/bean and maize/bean/squash polycultures. *Annals of Botany* 110:521-534.
- Raynaud, X., Leadley P.W. 2004. Soil characteristics play a key role in modeling nutrient competition in plant communities. *Ecology* 85:2200-2214.
- Raynaud, X., Jaillard B., Leadley P.W. 2008. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. *The American Naturalist* 171: 44-59.
- Raynaud, X. 2010. Soil properties are key determinants for the development of exudate gradients in a rhizosphere simulation model. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 210-219.
- Reed, S. C., Seastedt T. R., Mann C. M., Suding K. N., Townsend A. R., Cherwin K. L. 2007. Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentrations in a restored prairie. *Applied Soil Ecology* 36: 238-242.



- Rose, T.J., Hardiputra, B., Rengel, Z. 2010. Wheat, canola and grain legume access to soil phosphorus fractions differs in soils with contrasting phosphorus dynamics. *Plant and Soil* 326 :159-170.
- Rubio, G., Walk T., Ge Z. Y., Yan X. L., Liao H., Lynch J. P. 2001. Root gravitropism and below-ground competition among neighbouring plants: A modelling approach. *Annals of Botany* 88:929-940.
- Schnepf, A., Jones D., Roose T. 2011. Modelling Nutrient Uptake by Individual Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Temporal and Spatial Scales for an Experimental Design. *Bulletin of Mathematical Biology* 73:2175-2200.
- Schnepf, A., Roose T., Schweiger P. 2008. Impact of growth and uptake patterns of arbuscular mycorrhizal fungi on plant phosphorus uptake - a modelling study. *Plant and Soil* 312:85-99.
- Song, Y. N., Zhang F. S., Marschner P., Fan F. L., Gao H. M., Bao X. G., Sun J. H., Li L. 2007. Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 43:565-574.
- Stromberg, N. 2008. Determination of ammonium turnover and flow patterns close to roots using Imaging optodes. *Environmental Science and Technology* 42:1630-1637.
- Violle, C., Navas M. L., Vile D., Kazakou E., Fortunel C., Hummel I., Garnier E. 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116:882-892.
- Violle, C., Garnier E., Lecoecur J., Roumet C., Podgeur C., Blanchard A., Navas M. L. 2009. Competition, traits and resource depletion in plant communities. *Oecologia* 160:747-755.
- Vitousek, P. M., Cassman K., Cleveland C., Crews T., Field C. B., Grimm N. B., Howarth R. W., Marino R., Martinelli L., Rastetter E. B., Sprent J. I. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57: 1-45.
- Voisin, A. S., Salon C., Munier-Jolain N. G., Ney B. 2002. Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil* 243:31-42.
- Vu, D. T., Tang C., Armstrong R. D. 2008. Changes and availability of P fractions following 65 years of P application to a calcareous soil in a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 304:21-33.
- Wang, D., Marschner P., Solaiman Z., Rengel Z. 2007. Growth, P uptake and rhizosphere properties of intercropped wheat and chickpea in soil amended with iron phosphate or phytate. *Soil Biology & Biochemistry* 39:249-256.
- Wang, Y., Marschner P., Zhang F. 2012. Phosphorus pools and other soil properties in the rhizosphere of wheat and legumes growing in three soils in monoculture or as a mixture of wheat and legume. *Plant and Soil* 354:283-298.

## ANNEXES

### Annexe A.1. Chickpea genotype screening

Research conducted by Elodie Betencourt and Marek Duputel (PhD students) under supervision of Dr Philippe Hinsinger

UMR Eco&Sols (Montpellier Supagro-CIRAD-INRA-IRD) Bât. 12 Place Pierre Viala, 34060 MONTPELLIER Cedex 2, France

Tél. : +33 (0)4 99 61 22 49 / 28 56 – Fax : +33 (0)4 99 61 30 88

Email : philippe.hinsinger@supagro.inra.fr

#### I. Objectives

The release of protons (ie. rhizosphere acidification) by roots of legume species is related to nitrogen fixation through cation-anion imbalance. Nitrate is known to limit nitrogen fixation. The aim of this experiment was to select a genotype of chickpea with high ability to acidify its rhizosphere even in the presence of nitrate in hydroponic conditions.

In this preliminary experiment we considered several indicators to select one genotype:

- time for nodule appearance,
- proton release intensity,
- proton release sensitivity to nitrate,
- root and shoot biomass.

#### II. Material and methods

##### II.1. Experimental design and plant growth conditions

Experimental design was summarized in figure A.1.1. Twenty chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes obtained from ICARDA (Table A.1.1) were grown in nutrient solution in a growth chamber in Montpellier in May 2011. Climatic conditions were set at 25/20°C day/night temperature with a day/night relative humidity of 80/70%, 14/10 h light/dark cycle, 400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photo flux density.

Ten seeds of each chickpea genotypes were surface sterilized with  $\text{H}_2\text{O}_2$  during 10 minutes. Seeds were germinated for 7 days on filter paper humected with 600  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  and 2  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , and set at 30°C during five days. Five homogeneous chickpea plantlets of each genotype were transferred into 6 dm<sup>3</sup> buckets. Each bucket contained 5 dm<sup>3</sup> of nutrient solution of following composition (mM):  $\text{CaCl}_2$ , 1.65;  $\text{MgSO}_4$ , 1;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.75;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50  $10^{-3}$ ;  $\text{FeEDDHA}$ , 24  $10^{-3}$ ;  $\text{MnSO}_4$ , 6  $10^{-3}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4  $10^{-3}$ ;  $\text{ZnSO}_4$ , 1  $10^{-3}$ ;  $\text{CuSO}_4$ , 1  $10^{-3}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.1  $10^{-3}$ . Nitrogen was added as urea  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  at 1mM until 15 days after first transfer in nutrient solution. The pH of nutrient solution was adjusted daily to 6.5 adding KOH (0.1M) whenever pH was dropping below 6.5.

After 3 days in nutrient solution, chickpea plantlets were inoculated adding 5 cm<sup>3</sup> per bucket of a suspension of *Mezorhizobium ciceri* (UPMca7) strains containing approximately  $10^8$  cells cm<sup>-3</sup>. Twelve days after inoculation (15 days after first transfer), 3 homogeneous plants were transferred into new nutrient solution to test chickpea response to nitrogen added as nitrate. They were transferred to buckets containing 5 dm<sup>3</sup> of nutrient solution

with following composition (mM): CaCl<sub>2</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>, 0.6; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.45; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 10<sup>-3</sup>; FeEDDHA, 14.4 10<sup>-3</sup>; MnSO<sub>4</sub>, 3.6 10<sup>-3</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.4 10<sup>-3</sup>; ZnSO<sub>4</sub>, 0.6 10<sup>-3</sup>; CuSO<sub>4</sub>, 0.6 10<sup>-3</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.06 10<sup>-3</sup>. Nitrogen was added as nitrate with KNO<sub>3</sub> at a concentration of 0.6 mM. The first 3 days after the second transplanting nitrogen was added as nitrate with KNO<sub>3</sub> at a concentration of 0.6 mM. Solutions were changed for new ones presenting the same composition except nitrogen added as KNO<sub>3</sub> at a concentration of 0.3 mM.

## II.2. Plant measurements

Twelve days after inoculation (or 15 after first transfer) before transfer to new nutrient solution individual total fresh biomass was measured for each genotype. Number of nodulated plants for each genotype was recorded. At the end of the experiment (18 days after inoculation or 21 days after first transfer) plants were harvested. Shoots, roots and nodules were separated and oven-dried at 70°C for 3 days for biomass measurements. The number of nodules of the 3 plants of each genotype was recorded.

## II.3. pH measurements

From the first day of inoculation pH was measured daily. Solution pH was measured with a Metrohm-744 pH meter with a combined glass electrode in aliquot of 20 cm<sup>3</sup> of nutrient solution. Potassium hydroxide (0.1M) was added to readjust pH of the nutrient solution to 6.5 when pH dropped below this value.

## II.4. Statistical analyses

Total dry weight per plant, dry weight and number of nodules per plant were compared to corresponding mean values considering all genotypes. Analyses were conducted using Student test with 0.05 probability level, using the R software 2.10.1 (2009).

## III. Results

Among the 20 genotypes, the genotypes no 6 and 18 were not considered because of difficulties during germination phase.

### III.1. Plant growth and nodulation

Figure 2 showed total dry weight per plant after 21 days of growth in nutrient solution, *i.e.* 19 days after inoculation. Genotypes were ranked in ascending order of biomass production. Root to shoot ratio was also reported in Fig. A.1.2. Mean value for total plant dry weight was 1.44 g. Only total dry weight of genotype no 4 was significantly greater than the mean. Genotype no 4 presented also the higher value of root to shoot ratio. All genotypes except no 9 presented root biomass equal or higher than shoot biomass. Table A.1.2 and figure A.1.3 were relative to nodulation and ranked in ascending order of nodule appearance and number. Genotypes 8 and 11 were the first for nodule appearance 8 days after inoculation. Among 18 tested genotypes, 8 presented 5 out of 5 plants nodulated 12 days after inoculation. Genotypes 1, 13 and 15 did not nodulate. Mean number of nodules was 266 per plant and only genotype 12 had significantly more nodules (464). Genotypes 12 and 8 had significantly more nodule biomass. In contrast to number of nodules, genotypes were not ranked in the same order when considering nodule dry weight per plant (Fig. A.1.3 b). For instance genotype 8 was at the 4th position for nodule number and 7th position for nodule

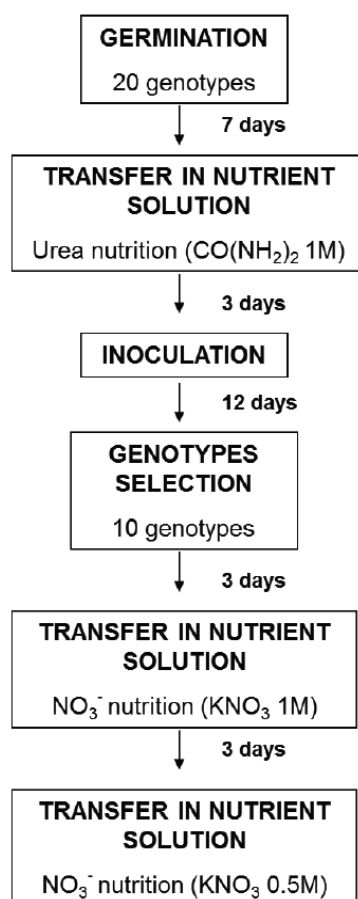
dry weight when ranked in ascending order. It shows that genotype 8 presented larger nodules than other genotypes and was confirmed when calculating dry weight per nodule.

### III.2. pH and H<sup>+</sup> release

Figure 5 presents the total amount of H<sup>+</sup> released per plant (a) and expressed per unit of fresh root biomass (b). Genotypes were ranked in ascending order. Mean value for total amount of H<sup>+</sup> was 0.79 mmol per plant and 0.11 mmol per g of fresh biomass of roots. Ranking of chickpea genotypes differed when considering root biomass. For instance genotype 20 presented the highest values for total H<sup>+</sup> released but when expressed per unit of root biomass it was the 13th position among the 18 tested genotypes ranked in ascending order. Nutrient solutions were changed 12 days after inoculation when chickpea were nodulated. Genotypes presenting 100% of nodulated plants were used to test the effect of nitrate nutrition on proton release. For the first 3 days nitrogen was added as nitrate at a concentration of 1mM to replace urea. First day after transfer in new solution (day 13 after inoculation) all genotypes decreased their solution pH (Table A.1.3) but the two following days chickpea increased the solution pH above 6.5. On day 15 after inoculation the nutrient solution was changed and nitrate added at lower concentration (0.3 mM). At this molarity, chickpea genotypes decreased the solution pH. Contrary to nitrate at 1mM, adding half the concentration affected less acidification activity. We concluded that nitrate at 0.3 mM affected less nitrogen fixation of chickpea than 0.6 mM.

### IV. Conclusion

Main indicator for screening was the ability of chickpea genotypes to release high amounts of protons in relation to nitrogen fixation. We wanted to select a genotype with high acidification ability, with fast and high nodulation activity (number and biomass). The selected genotype had also to present low sensitivity to nitrate when considering acidification activity. Considering plant dry weight the choice was made among genotypes presenting the highest biomass and root to shoot ratio. Genotype 8 (ILC 01302) appeared to be the best suited for our future experiments, followed by genotypes 11 and 12.



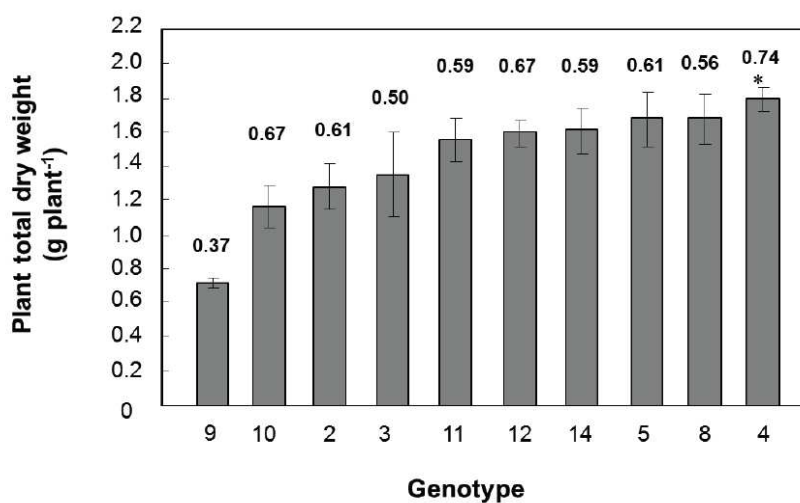
**Figure A.1.1** Experimental design

**Table A1.1** Chickpea genotypes

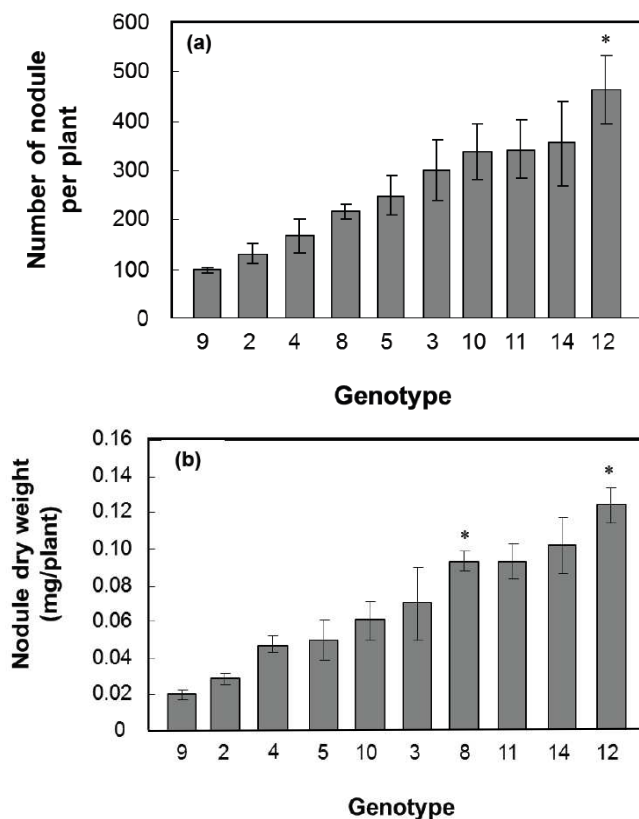
Genotype no	Genotype
1	FLIP84-188C
2	FLIP88-85
3	FLIP93-93
4	FLIP97-677C
5	FLIP97-7
6	FLIP97-706C
7	FLIP98-1065
8	ILC01302
9	ILC10722
10	ILC1929
11	ILC263
12	ILC3182
13	ILC3279
14	ILC482
15	ILC588
16	ILC8617
17	UC27
18	FLIP97-503C
19	FLIP97-530C
20	FLIP86-5C

**Table A.1.2.** Time (days) for first appearance of nodules and percentage of nodulated chickpeas among 5 plants for each genotype 12 days after inoculation.

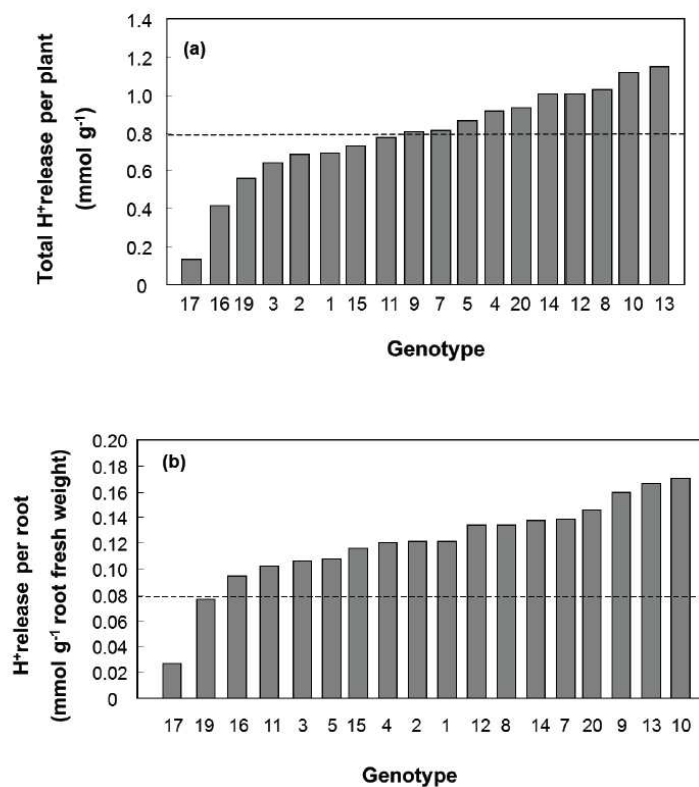
Genotype	Nodule appearance time (days after inoculation)	Percentage of nodulated plants (%)
1	-	0
2	11	80
3	12	100
4	10	60
5	11	100
7	12	80
8	8	100
9	11	100
10	11	100
11	8	100
12	11	100
13	-	0
14	11	100
15	-	0
16	12	80
17	11	20
19	12	60
20	12	100



**Figure A.1.2.** Plant total dry weight and root/shoot ratio. Bars indicate standard deviation. Star denotes value greater than the mean ( $p < 0.05$ ) with student test. Values indicate root/shoot ratio.



**Figure A.1.3.** Number (a) and biomass (dry weight) (b) of nodules per plant. Bars indicate standard deviation. Stars denote value greater than the mean ( $p < 0.05$ ) with student test.



**Figure A.1.4.** Total  $H^+$  (a) and amount of  $H^+$  per root biomass (b) released per plant. Dotted line indicates the mean value within genotypes.

**Table A.1.3.** Solution pH for each genotype after growing chickpea with nitrate supplied for 3 days at a concentration of 0.6 mM and then at 0.3 mM as KNO<sub>3</sub>

Genotype	N treatment		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0.3 mM)					
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0.6 mM)			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (0.3 mM)				
	Days after inoculation	13	14	15	16	17	18	
2		5.98	7.03	7.29	7.28	6.85	4.46	
3		5.04	6.72	7.12	7.00	6.62	4.38	
4		6.77	7.04	7.14	6.97	6.52	4.61	
5		6.70	6.86	6.95	6.90	6.74	4.77	
8		6.27	6.80	7.27	6.97	6.64	4.37	
9		6.79	6.93	7.02	6.70	6.68	6.70	
10		6.01	6.87	7.13	6.77	6.73	5.29	
11		5.53	6.71	7.03	6.92	6.65	4.60	
12		6.31	6.98	6.89	7.07	6.21	4.64	
14		6.61	6.83	6.94	7.16	6.28	4.71	

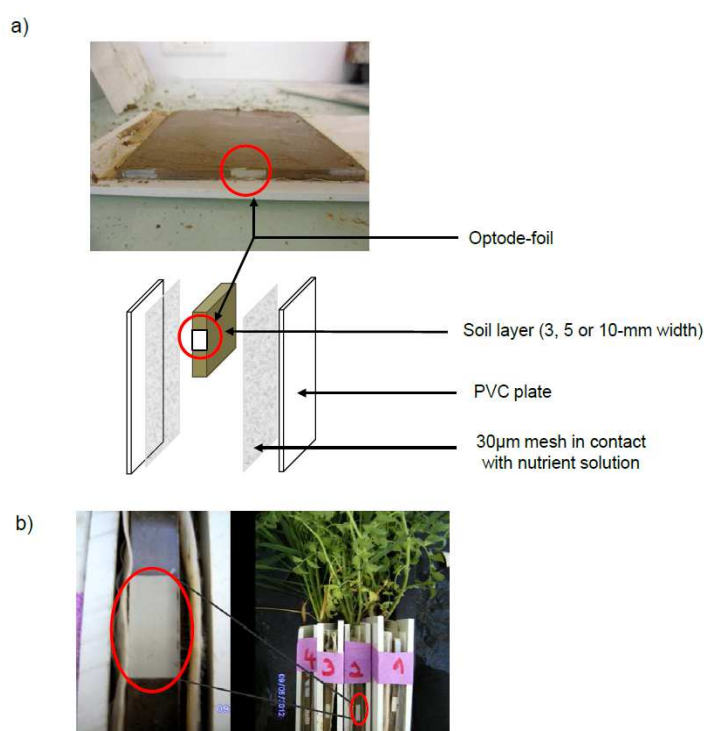


## Annexe A.2. pH measurement in soil *via* optode-foils during the experimental period

Au cours de l'expérimentation testant l'effet de la distance entre les racines des espèces en association sur le degré de recouvrement des rhizosphères et *in fine* les interactions pour l'acquisition de phosphore (Chapitre V), le pH a été suivi au cours du temps et dans l'espace par l'intermédiaire de feuillets d'optode. Cette mesure a été réalisée par Christina Schreiber et sera par la suite valorisé par la suite sous forme d'article.

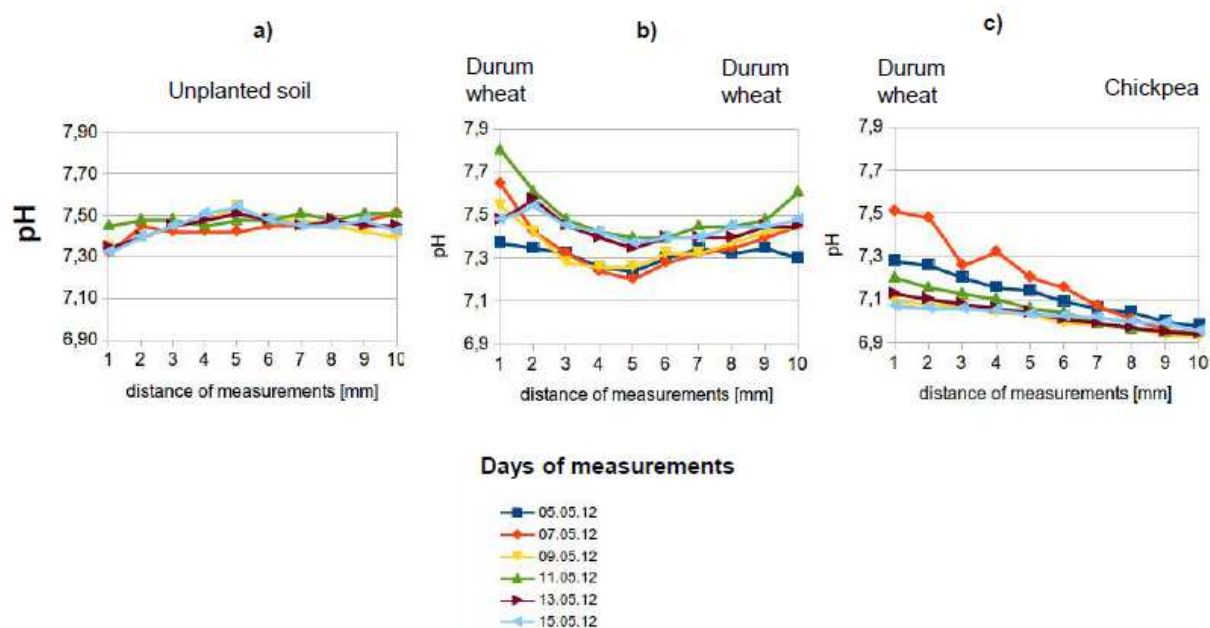
Since the final analyses of pH in soil only capture the *status quo* on that last day, monitoring method was implemented to observe pH dynamics at least on the soil surface during the whole 11 days of experiment. The chosen method was pH determination *via* optode-foils.

These sensor foils carry an analyte pH-sensitive and an insensitive fluorescent dye in a buffer matrix. After excitation with a 470 nm light pulse, the ratio between the quenched signal of the sensitive and the reference signal of the insensitive fluorophore can be related to the ambient pH value in high spatial and temporal resolution (*e.g.* Blossfeld and Gansert, 2007). The decoupling of the sensor (the optode-foil) in direct contact with the soil and the detector (CCD-camera) outside the system allows a non-invasive measurement over a longer time period without disturbing the soil or the plant. The optode-foils were fixed to the front side of the transparent squares which contained the soil disks, covering the distance between root mats of the two plants positioned on each side of the soil (Fig.A1.1). The pH values given by the optodes correspond to those obtained after  $\text{CaCl}_2$  extraction (1:5, soil:water ratio).



**Figure A1.1.** Optode-foil position on mini-rhizobox device. Example from the unplanted device for the 5-mm width (a). Example with unplanted soil and different cropping treatment for the 5-mm width (b).

Figure A1.2 shows the change in pH during the whole experiment in the unplanted soil and two of the three cropping treatments (*i.e.* durum wheat sole crop, durum wheat-chickpea intercrop) for the device corresponding to 10-mm width. It becomes clear that the systems underwent high variability during these 11 days. While the unplanted soil (Fig. A1.2a) showed only minimal differences from day to day, with a maximum of 0.2 pH unit, quite stable over the 10-mm width, the cropping treatments differed strongly between the start and the end of the experiment. Between the root mats of durum wheat (Fig. A1.2b) the pH values were initially evenly distributed around 7.3-7.4 on the first day of measurement. They began to rise towards the roots, reaching a peak of 7.8 resp. 7.6 on day 6, while at mid distance from root mats the pH values were lower changing from 7.25 (day 1) to 7.4 (day 6). Towards the end of the experiment the distribution became less pronounced again, with pH values between 7.4-7.5 over the distance. Between the root mats of wheat and chickpea in intercrop (Fig. A1.2c) gradients of pH were observed as for wheat cropping treatment. The values on wheat side first rise from 7.3 to 7.5, then decreased to 7.1 over time, the more acidifying chickpea on the opposite side affected the whole distance over time. Towards the end of the experiment, pH values were quite stable over the distance, yet at a lower level (around 7.1) than between the two wheat root mats (Fig. A1.2b).



**Figure A1.2** pH dynamics captures by sensor foils over a transect of 10-mm in an unplanted soil (a) and between two root mats of durum wheat

There were clearly developments of pH influence of root activity over time, driven likely by plant state or microclimatic conditions during the experiment-the time and circumstances of sampling appears to be quite important for the interpretation of the results. The results from the different cropping treatments suggest the establishment of equilibrium in this small

soil volume, possibly masking the effects of pH influence on soil properties as concentration of phosphate ions after a critical period of time. A pH sampling of soil slides along the distance between root mats as done after 11 days of culture (see chapter V) would have yielded different results if done five days earlier. Being able to obtain continuous measurements during such experiments will help to improve result interpretation in future experimental designs and track down dynamic and reasons for heterogeneity in plant-soil systems.

### **References**

Blossfeld, S., Gansert D. 2007. A novel non-invasive optical method for quantitative visualization of pH dynamics in the rhizosphere of plants. *Plant Cell and Environment* 30:176-186.

