



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Physiologie, Biologie des organismes, Populations, Interactions

Préparée au sein de « Université Caen Normandie »

Potentiel agronomique et environnemental des associations Fabacées-colza

Présentée et soutenue par
Thaïs GENARD

Thèse soutenue publiquement le 13 décembre 2016
devant le jury composé de

Madame Joëlle FUSTEC	Maître de conférences HDR, Ecole Supérieure d'Agricultures Angers Loire, Angers	Rapporteur
Monsieur Philippe SIMIER	Professeur, Université de Nantes, Nantes	Rapporteur
Monsieur Jean-Claude YVIN	Directeur de recherche R&D, Centre Mondial d'Innovation, Saint-Malo	Examineur
Monsieur Alain OURRY	Professeur, Université de Caen Normandie, Caen	Examineur
Monsieur Sylvain DIQUELOU	Maître de conférence, Université de Caen Normandie, Caen	Co-Encadrant
Monsieur Philippe LAINE	Maître de conférences HDR, Université de Caen Normandie, Caen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Philippe LAINE, laboratoire Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutrition NCS (EVA)

UNICAEN
UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE


EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement


Ecophysiologie
Végétale,
Agronomie
& nutrition N,C,S

Remerciements

J'espère réussir à remercier chaque personne qui m'a apporté son soutien et a contribué à l'élaboration de cette thèse.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à mon directeur de thèse, Philippe Laîné et à mes encadrants de Thèse, Philippe Etienne et Sylvain Diquélou de m'avoir encadrée et conseillée tout au long de ces 4 années de thèse. Merci pour vos encouragements, votre patience et votre disponibilité. Merci pour toutes vos corrections et suggestions toujours pertinentes qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Vous avez su m'accompagner et me soutenir jusqu'aux dernières pages de ce manuscrit.

Je suis très reconnaissante envers Joëlle Fustec et Philippe Simier d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Je remercie également Alain Ourry et Jean-Claude Yvin, de prendre part à ce jury.

Je remercie Marie-Pascale Prud'Homme, directrice de l'UMR EVA, et Philippe Laîné, directeur adjoint, pour leur accueil au sein du laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ces travaux dans un cadre de travail idéal. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance.

Je tiens également à remercier le Centre Mondial d'Innovation d'avoir rendu financièrement possible les différentes expérimentations réalisées au cours de ce travail de recherche et tous les partenaires du projet Sérapis pour leur écoute attentive et tous les moments sympathiques passés lors des réunions de projet.

Je remercie l'Ecole Doctorale EdNBISE et l'Académie d'Agriculture de France pour leur aide financière qui m'a permis de participer à un congrès international au Canada.

Merci à Cécile Revellin de m'avoir fourni le protocole d'inoculation et les souches de rhizobiums. Merci aux Rennais pour leur accueil et leur aide pour les manip réalisées à l'INRA du Rheu. Merci à Nathalie Nesi pour son accueil, Sophie Rolland pour les analyses NIRS, Hélène Navier, Bernard Moulin et Elise Alix pour les battages de colza.

Je remercie évidemment tout le personnel du labo EVA qui a contribué de près ou de loin à mes travaux de thèse. Merci à tous les chercheurs, Alain, J-C, Jacques, Sophie B., Frédéric, Emmanuelle, Marie-Pascale, J-B, Annette et Servane, pour leur sympathie et les discussions scientifiques (ou non) que nous avons pu avoir, au RU, autour des traditionnels mots fléchés, lors des récoltes et lors de toutes les pauses café partagées. Au cours de cette thèse, j'ai bénéficié de nombreuses aides techniques qui ont participé à l'aboutissement de ces travaux. Dominique, un grand merci pour ton aide sur le terrain, ta gentillesse, le café à Frénoville et tous ces bons moments passés sur les cases lysimétriques. Un grand merci à Magali et Josiane pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour

les centaines d'échantillons broyés et les nombreuses récoltes; Merci à Anne-Françoise pour la gestion des cultures en serre ; Bénédicte pour le broyage des gros échantillons ; Patrick pour la résolution des problèmes informatiques ; Sophie V pour sa sympathie, la gestion de l'administratif, les bons de commandes, ordres de missions. Je remercie également l'ensemble du plateau Platin'. Frédérine, Jeanne, Fanny merci pour votre sympathie et toutes les analyses IRMS effectuées, Josette « reine des micropesées » merci pour ta gentillesse et les milliers de micropesées réalisées.

Je termine évidemment ces remerciements par vous, les Docs avec lesquels j'ai partagé cette thèse au quotidien et sans qui cette « folle » aventure n'aurait pas été la même, entre travail, pauses cafés et soirées inoubliables. Merci aux anciens, Philippe et Alex d'avoir montré « l'exemple ». Vincent, Caro merci pour toutes ces pauses café, RU, soirées « filles », potins, ces délires passés à vos côtés. A tous les docs du bureau n°1, Marine, Elise, Maxence, Emilie et Cylia bonne continuation pour la suite de vos thèses ! Sans oublier Aurélia et Solène qui font bien entendu partie de la bande des « jeun's »! Merci à vous tous pour vos sourires, rires et délires ! Bonne continuation à tous. Et bien sûr, je finis par vous, les « Sérapiettes » : Elise et Anne, avec qui j'ai tout partagé, entre travail, rires et larmes. Tant de moments inoubliables passés à vos côtés au bureau, labo et en dehors : soirées, sushis, rédaction, plage, manips, aquagym, RU, shopping, réunions Sérapis, Canada. Cette aventure du Doctorat n'aurait pas été la même sans vous et ces quelques mots ne suffisent pas pour résumer tout ce que nous avons vécu pendant 3 ans. Elise, merci pour ton amitié, ton aide et ton soutien jusqu'à l'impression de ce manuscrit.

Merci Céline, ma bretonne préférée, pour ton amitié depuis Strasbourg (que de soirées mémorables !), malgré nos emplois du temps chargés je suis heureuse que nous ayons pu garder cette complicité.

Merci aux copains : Teddy et Anne-Laure, Tom et Alicia, Romain (« Roger »), avec qui j'ai partagé les moments entre parenthèse. Une pensée pour les anciens du LAE : Marie-Line, Quentin et Clément avec qui j'ai passé des soirées et des délires mémorables.

Il me reste à remercier ma famille à qui je dois beaucoup. Papa, Maman, merci de m'avoir accompagnée tout au long de mes études, de m'avoir toujours soutenue et encouragée, d'avoir cru en mes capacités. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous et ces quelques mots ne suffisent pas pour exprimer tout mon amour et ma reconnaissance. Robin et Ophélie merci d'avoir toujours suivi mon travail, et simplement d'être là. Papi, Mamie merci pour tout votre soutien, merci de vous être toujours intéressés à ce que je faisais et de m'y avoir encouragé. Et bien sûr au reste de la famille, merci d'avoir toujours suivi ce que je faisais et merci pour vos encouragements. Merci Marie, Fanfan et David pour votre précieux soutien et vos encouragements.

Enfin, je termine ces remerciements par toi, mon Ju d'amour. Merci de m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) pendant ces 4 années de thèse. Merci de nous avoir construit un magnifique nid douillet et je ne sais comment te remercier par ces quelques mots pour que cela soit à la hauteur de ton dévouement. Alors simplement, merci pour tout. L'avenir nous comblera de bonheur j'en suis sûr.

Liste des abréviations

- A -

AAF : Académie d'Agriculture de France

ADP : Adénosine diphosphate

AlaT : Alanine aminoTransférase

ATP : Adénosine triphosphate

- B -

BBV : Bretagne Biotechnologie Végétale

BNF: biological nitrogen fixation

- C -

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CIPAN : Culture Intermédiaire Piège à Nitrate

CMI : Centre Mondial d'Innovation

CRBN : Conseil Régional de Basse-Normandie

- D -

DM : Dry Matter

DW : Dry Weight

- E -

EDTA : éthylène diamine tétra acétique

ERA : Efficience de Remobilisation de l'Azote

ESA : Ecole Supérieure d'Agriculture

EUA : Efficience d'Utilisation de l'Azote

EVA : Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N. C. S.

- F -

FEDER : Fonds Européens de Développement Régional

Fnodes : Facteurs nod

- G -

GEAPSI : Génétiques et Environnementaux de l'Adaptation des Plantes à des Systèmes de culture Innovants

GOGAT : Glutamine oxoglutarate aminotransferase

GS : glutamine synthétase

- H -

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

- I -

IGEPP : Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, Rennes

INN : Indice de Nutrition Azotée

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IRMS : Isotope-Ratio Mass Spectrometry

IRS : Indice de Récolte en S

- L -

LANO : Laboratoire Agronomique Normand

LegHb : Leghémoglobine

LER : Land Equivalent Ratio

LEVA : Légumineuses, Ecophysiologie
Végétale Agroécologique

- M -

M : masse atomique

MS : Matière Sèche

- N -

Ndfa : N derived from the biological fixation
of atmospheric nitrogen

Ndff : N derived from fertilizer

Ndfs : N dérivé du sol

Ndft : N derived from transfer

NIRS : Near Infra-Red Spectroscopy

NRT : nitrate transporter

N_{transfer} : N transferred

- P -

PAR : Photosynthetically Active Radiation

PEP case : Phospho-Enol-Pyruvate
Carboxylase

pH : potentiel Hydrogène

PROLEA : Filières française des huiles et
protéines végétales

- S -

SE : Standard Error

SPAD : Soil Plant Analysis Development

SSP-MAAF : Service de la statistique et de la
prospective du Ministère de l'Agriculture, de
l'Agroalimentaire et de la Forêt

SULTR : sulfate transporter

- U -

UCN : Université Caen Normandie

UE : Union Européenne

UMR : Unité Mixte de Recherche

UNIFA : Union Nationale des Industries
Françaises de la Fertilisation

USDA : United States Department of
Agriculture

Table des matières

Remerciements	i
Liste des abréviations	iii
Table des matières	v
Introduction générale : Contexte et enjeux globaux	1
Synthèse bibliographique	5
I. La culture de colza	5
I.1. Quelques caractéristiques du colza	5
I.1.1. Différents types de colza	5
I.1.2. Production et débouchés de la culture de colza	5
I.1.3. Besoins en soufre et fertilisation soufrée du colza	6
I.2. Besoins en azote et fertilisation azotée au cours du développement du colza d’hiver	7
I.2.1. Gestion de l’azote au cours du développement du colza d’hiver	7
I.2.1.1. Du semis au stade montaison (C)	8
I.2.1.2. Du stade montaison (C) au stade bourgeons accolés (E)	9
I.2.1.3. Du stade floraison (F) jusqu’à la récolte (G)	9
I.2.2. Fertilisation azotée et bilan agro-environnemental du colza	10
I.2.3. Obtention de nouveaux génotypes plus efficaces	11
I.2.4. Amélioration des pratiques culturales	12
II. Principe général, fonctionnement et intérêts agroécologiques des associations à base de Fabacées	14
II.1. Définition et contexte actuel	14
II.2. Les différents types de cultures associées à base de Fabacées	16
II.3. Fixation de l’azote atmosphérique : intérêt majeur dans les performances des cultures associées à base de Fabacées	17
II.3.1. Fixation symbiotique de l’azote atmosphérique	17
II.3.2. Complémentarité de niche pour l’azote	19
II.3.3. Transferts d’azote au sein des cultures associées	20
II.4. Intérêts agro-environnementaux des associations à base de Fabacées	21
II.4.1. Impact sur la production et la qualité	21
II.4.2. Sensibilité des plantes associées aux ravageurs et aux maladies	22
II.4.3. Association et régulation des adventices	22
II.5. Etat des connaissances actuelles sur les associations Brassicacée-Fabacée	23
II.5.1. Effets de l’association sur la croissance et le rendement des Brassicacées	23
II.5.2. Effets de l’association sur les insectes ravageurs du colza	24
II.5.3. Effets de l’association Fabacée-Brassicacée sur les adventices	24
II.5.4. Les associations Fabacées-Brassicacées : méthodes d’implantation	25

III. Les différentes voies et méthodes d'estimation du transfert d'azote au sein des associations.....	25
III.1. Transfert direct de l'azote	26
III.2. Transfert indirect de l'azote	26
III.2.1. La rhizodéposition	26
III.2.1.1. Sénescence des racines et des nodules.....	26
III.2.1.2. Exsudation des acides aminés et autres composé azotés solubles chez les Fabacées	27
III.2.1.3. Localisation et voies de libération de l'exsudation racinaire	29
III.3. Les différentes méthodes d'estimations du transfert d'azote au sein des associations.....	29
III.3.1. Abondance isotopique naturelle de ¹⁵ N	29
III.3.2. Méthodes de marquage indirect ou direct	30
III.3.2.1. Marquage du substrat (ou « dilution isotopique »)	30
III.3.2.2. Marquage des parties aériennes.....	31
III.3.2.3. Marquage des parties racinaires	32
III.3.2.4. Marquage de l'azote atmosphérique au ¹⁵ N ₂	32
Objectifs et stratégies de recherche	33
Matériel et Méthodes	35
I. Matériel végétal	35
II. Conditions de cultures	35
II.1. Culture et inoculation des Rhizobia.....	35
II.2. Cultures en pot (Chapitres 1 et 2)	36
II.3. Culture en «split-root» (Chapitre 3)	37
II.4. Cultures en cases lysimétriques (Chapitre 4)	38
II.4.1. Présentation du dispositif expérimental.....	38
II.4.2. Conditions pédoclimatiques.....	38
II.4.2.1. Conditions climatiques	38
II.4.2.2. Caractéristiques du sol	39
II.4.3. Itinéraire technique.....	39
III. Mesures et Méthodes d'analyses.....	40
III.1. Mesure des paramètres physiologiques des plantes	40
III.1.1. Détermination de la hauteur et de la surface foliaire (Chapitres 1 et 2).....	40
III.1.2. Mesure de la teneur relative en chlorophylles des feuilles de colza (Chapitre 2).....	40
III.1.3. Détermination du rendement grainier du colza (Chapitre 4)	40
III.2. Méthodes d'analyses.....	41
III.2.1. Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates des graines de colza (Chapitre 4)	41
III.2.2. Dosages du nitrate et du sulfate présents dans les eaux de percolation des cases lysimétriques (Chapitre 4)	41
III.2.3. Dosage de l'azote et du soufre total et des compositions isotopiques ¹⁵ N/ ¹⁴ N par Spectrométrie de masse isotopique (Chapitres 1, 2, 3 et 4).....	41

III.2.4. Calcul du pourcentage d'azote dérivé de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) (Chapitres 1 et 2)	43
III.2.5. Calcul du transfert d'azote des Fabacées vers le colza (Chapitre 3)	44
IV. Exploitation statistique des résultats	45
Chapitre 1 : Criblage des Fabacées en conditions contrôlées	46
I. Introduction	46
II. Résultats	47
II.1. Biomasses sèches	47
II.2. Surfaces foliaires et hauteurs des parties aériennes.....	48
II.3. Quantités d'azote et de soufre total	48
II.4. Pourcentage d'azote des Fabacées issu de la fixation de l'azote atmosphérique .	49
III. Discussion et Conclusion.....	49
III.1. Discussion	49
III.2. Conclusion	52
Chapitre 2 : Plant growth and N balance in early stages of development of Rapeseed-Legume mixtures	53
Préambule.....	53
Abstract.....	55
Key words.....	55
Abbreviations.....	55
I. Introduction	56
II. Materials and Methods	58
II.1. Plant growth conditions and experimental design.....	58
II.2. Growth of rhizobium strains and plant inoculation conditions	58
II.3. Plant harvest.....	59
II.4. Total N, $\delta^{15}\text{N}$ and total S analysis	59
II.5. Determination of the N_2 fixation capacity of each legume species (β value)	59
II.6. Determination of the %Ndfa by legume species grown in monocrops or in mixtures with oilseed rape	60
II.7. Data and statistical analysis.....	60
III. Results	61
III.1. In mixture, the growth of oilseed rape is unaffected.....	61
III.2. Oilseed rape grown with clover shows higher leaf SPAD values.....	61
III.3. The BNF of legumes is increased in mixtures.....	61
III.4. Lupine or clover maintains oilseed rape N contents and preserves soil N resources	62
III.5. In mixtures, the total S contents decreased in legumes but not in oilseed rape...	62
IV. Discussion	62
IV.1. The oilseed rape R monocrop as a relevant control.....	62
IV.2. Effect of legumes on oilseed rape growth.....	63

IV.3.	Effect of oilseed rape on the BNF of legumes and soil N resources.....	64
IV.4.	Competition for soil S resources	65
V.	Conclusions	65
	Acknowledgments.....	66
	Supplemental data.....	66

Chapitre 3 : Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition.....

	Préambule.....	67
	Abstract.....	68
I.	Introduction	69
II.	Materials and methods.....	71
II.1.	Experimental design and plant growth conditions	71
II.2.	Plant harvest and N transfer assessment.....	72
II.3.	Data and statistical analysis.....	73
III.	Results	73
III.1.	Biomass, total N amount and ¹⁵ N excess of legumes and rapeseed	73
III.2.	N transfer from clover and lupine to rapeseed	75
IV.	Discussion	76
V.	Conclusion.....	78
	Acknowledgments.....	78
	References.....	79

Chapitre 4 : Impact of sulfur fertilization level on agronomic performances of rapeseed-clover mixture

	Préambule.....	83
	Abstract.....	85
	Key words.....	85
	Abbreviations.....	85
I.	Introduction	86
II.	Materials and Methods	87
II.1.	Site and lysimeter description.....	87
II.1.1.	Experimental site and climatic characteristics	87
II.1.2.	Soil properties of the lysimeters	88
II.2.	Experimental design, ¹⁵ N labeling and harvest.....	88
II.3.	Elemental and biochemical analysis.....	89
II.3.1.	Determination of N-NO ₃ ⁻ and S-SO ₄ ²⁻ concentrations of leached water	89
II.3.2.	Total S, N and ¹⁵ N analysis in plants and soil.....	89
II.3.3.	Determination of oil, proteins and glucosinolate contents by NIRS	89

II.4.	Calculation of total N and S amounts and the percentage of N derived from dinitrogen (%Ndfa) and fertilizer (%Ndff).....	89
II.5.	Data and statistical analysis.....	90
III.	Results	90
III.1.	N-NO ₃ ⁻ and S-SO ₄ ²⁻ leaching	90
III.2.	Biomass and S and N contents of rapeseed and clover	90
III.3.	N nutrition of clover and rapeseed	91
III.4.	Yield and seed quality components of rapeseed	91
IV.	Discussion	92
	Acknowledgments.....	94
	Discussion générale et perspectives	95
I.	Discussion	95
I.1.	Contexte général et rappel des objectifs de la thèse	95
I.2.	Impact des associations sur la performance agronomique du colza au stade rosette et compétitivité des Fabacées	96
I.3.	Transfert d'azote de la vesce, du lupin et du trèfle vers le colza au stade rosette	100
I.4.	Effet du couvert de trèfle sur les performances agronomiques du colza au stade reproducteur et sur le lessivage du nitrate et du sulfate	102
I.5.	Effet de la fertilisation soufrée sur les performances de l'association colza-trèfle	103
II.	Perspectives	106
	Références bibliographiques	109

Introduction générale

Contexte et enjeux globaux



Introduction générale

Contexte et enjeux globaux

L'agriculture mondiale a connu au cours des dernières décennies un fort accroissement de sa productivité pour satisfaire les besoins alimentaires d'une population en constante augmentation (Tilman *et al.*, 2002). Cette hausse de productivité est basée notamment sur une intensification des systèmes agricoles au travers d'utilisation massive d'intrants tels que les engrais azotés et les produits phytosanitaires. Cependant, cette intensification engendre des conséquences négatives sur l'environnement tels que la pollution des nappes phréatiques par le nitrate, la dégradation des sols, et la diminution de la biodiversité (Giller *et al.*, 1997 ; Tilman *et al.*, 2002 ; Galloway *et al.*, 2003).

De par ses nombreux débouchés alimentaires ou industriels, la superficie occupée par la culture de colza ne cesse de croître depuis ces 25 dernières années, que ce soit au niveau français, européen ou mondial (+106% entre 1990 et 2013) (Source : FAO, 2013). Or, parmi les espèces de grande culture, le colza est une plante qui valorise peu l'azote absorbé puisque seulement 50% de l'azote provenant de la fertilisation se retrouve dans les produits récoltés (Schjoerring *et al.*, 1995). En conséquence, la culture de colza demande une fertilisation azotée particulièrement importante. Outre la perte financière non négligeable pour l'exploitant agricole due au coût d'achat des engrais azotés (qui fluctue en fonction des cours du pétrole) et leur mauvaise valorisation de leur apport, leur utilisation excessive a des effets néfastes sur le climat et les écosystèmes. En effet, la lixiviation du nitrate par les eaux de pluie entraîne une pollution importante des nappes phréatiques et la volatilisation des engrais apportés sous forme de N₂O, puissant gaz à effet de serre qui participe au changement climatique.

Face à ces enjeux économiques et environnementaux, il est nécessaire de développer de nouvelles pratiques agronomiques plus respectueuses de l'environnement, tout en maintenant un niveau élevé de production et de qualité des graines de colza (Griffon, 1999 ; Tilman *et al.*, 2002). Ainsi, plusieurs stratégies ou alternatives sont actuellement envisagées afin de réduire ce recours massif aux intrants azotés, tout en maintenant le rendement du colza. Parmi ces stratégies se distinguent celles qui reposent sur l'amélioration des pratiques culturales telles que l'agriculture de précision, l'utilisation de molécules d'origine biologique ou sur l'obtention de nouveaux génotypes de colza issus de la sélection ou de l'amélioration variétale plus efficaces dans leur utilisation de l'azote (Wiesler *et al.*, 2001a ; Rathke *et al.*, 2006). Une autre stratégie novatrice consiste à développer de nouvelles pratiques culturales telles que la culture du colza en association avec des

Fabacées. En effet, les Fabacées ont la capacité, grâce à leur association symbiotique avec des bactéries de la famille des Rhizobiacées, de fixer l'azote atmosphérique (N_2) au niveau de leurs nodules racinaires. L'azote organique issu de l'assimilation du N_2 atmosphérique participe ainsi à la croissance de la Fabacée, mais peut également être restitué aux plantes voisines non fixatrices au travers de la minéralisation de la nécromasse racinaire (ou foliaire) ou encore *via* l'exsudation racinaire de composés azotés (Fustec *et al.*, 2010). Le recours à ce nouveau type d'association peut être considérée comme une voie alternative et durable pour introduire de l'azote dans les agrosystèmes et pourrait ainsi contribuer à réduire l'utilisation des engrais azotés voire conduire à l'autonomie des systèmes de culture vis-à-vis de l'azote.

Plus précisément, une association de cultures est définie comme la co-culture d'au moins deux espèces différentes sur la même surface pendant une période significative de leur développement (Willey, 1979a). Elles peuvent aussi bien comprendre des cultures annuelles que pluriannuelles, par exemple, dans le cas de l'agroforesterie ou des prairies. De nombreux travaux ont montré au sein de l'association céréales-Fabacées, des intérêts agronomiques et économiques importants : niveaux de productivité élevés et stables (en terme de quantité et de qualité), meilleure résilience aux perturbations, réduction des maladies, des ravageurs et des adventices, diminution de l'érosion du sol (pour revue voir Malézieux *et al.*, 2009). Ces avantages s'expliquent par une meilleure valorisation des ressources disponibles principalement due à la complémentarité des deux espèces dans l'utilisation des deux sources d'azote (azote du sol et azote atmosphérique) et plus particulièrement dans les systèmes à bas niveaux d'intrants azotés (Willey 1979a,b ; Ofori et Stern 1987 ; Vandermeer 1989 ; Willey 1990 ; Fukai et Trenbath 1993 ; Jensen 1996a ; Hauggaard-Nielsen *et al.* 2003 ; Bedoussac et Justes 2010a). Récemment, des bénéfices équivalents ont été démontrés au sein de l'association Brassicacées-Fabacées et particulièrement avec le colza (Jamont *et al.*, 2013a ; Cadoux *et al.*, 2015). Toutefois, ces études étant récentes et peu nombreuses, une meilleure compréhension de leur fonctionnement (complémentarité de niche, fixation de l'azote atmosphérique, transfert d'azote) et une optimisation de leur performance (choix des espèces, densités de semis) sont nécessaires. Ainsi, l'objectif général de ma thèse est d'améliorer le bilan agro-environnemental du colza (diminution des intrants azotés et maintien du rendement) en étudiant les performances agronomiques et environnementales de l'association colza-Fabacées (nutrition azotée et soufrée des plantes, rendement grainiers du colza) en réponse à de faibles intrants azotés.

Ces travaux de thèse, cofinancés par le Conseil Régional de Basse-Normandie (**50% CRBN**) et les Fonds Européens de Développement Régional (**50% FEDER**) s'inscrivent dans le **projet SERAPIS** regroupant des partenaires du secteur privé (Centre Mondial d'Innovation (CMI) du Groupe Roullier de Saint-Malo, société Anaximandre de Landerneau, Végénov – BBV de Saint Pol de Léon, Unité de Recherche LEVA du Groupe ESA d'Angers) et du secteur public (UMR INRA-UCN 950 EVA de l'Université de Caen, UMR INRA 1347 GEAPSI Agroécologie de Dijon).

Les principaux objectifs de ce projet visent à optimiser la nutrition des plantes cultivées par l'apport d'engrais azotés et soufrés adaptés aux besoins réels des cultures, en développant notamment, des indicateurs de la fertilisation soufrée, des fertilisants innovants activateurs de la nutrition soufrée et des outils de pilotage en temps réel de la fertilisation, tout en contribuant à la préservation de l'environnement pour répondre aux exigences d'une agriculture raisonnée et durable. Il s'inscrit dans le pôle de compétitivité **Végépolys** qui encourage les projets visant à diminuer la consommation d'intrants et ayant des impacts favorables sur la biodiversité, la santé et l'environnement, et également dans le pôle de compétitivité agroalimentaire **Valorial** qui a pour but d'améliorer la qualité nutritionnelle et sanitaire des aliments pour les consommateurs.

Ce mémoire de thèse débute par une **synthèse bibliographique** des connaissances portant sur le bilan agro-environnemental du colza, sur les associations de cultures à base de Fabacées et plus particulièrement sur les associations Brassicées-Fabacées. Cette synthèse bibliographique se termine par une présentation des différentes méthodes utilisées pour estimer la fixation de l'azote atmosphérique et le transfert d'azote au sein des cultures associées. Les dispositifs expérimentaux utilisés et les différents calculs et analyses effectués au cours de ce travail doctoral sont détaillés dans une partie « **Matériel et Méthodes** ». Les **résultats** obtenus lors des différentes expérimentations sont présentés au travers de quatre chapitres, le premier rédigé en français et les trois suivants présentés sous forme d'articles scientifiques en anglais (un publié et deux en cours d'évaluation):

- **Chapitre 1** : Criblage des Fabacées en conditions contrôlées.
- **Chapitre 2** : « Plant growth and N balance in early stages of development of Rapeseed-Legume mixtures », soumis à Plant and Soil .
- **Chapitre 3** : « Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition, publié dans Heliyon », doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00150.
- **Chapitre 4** : « Impact of sulfur fertilization level on agronomic performances of rapeseed-clover mixture », soumis à Journal of Plant Nutrition and Soil Science ».

Ce manuscrit de thèse se termine par une **discussion** des résultats ainsi que par la présentation de **perspectives** qui découlent de ce travail doctoral.

Mes activités de recherche doctorale ont fait l'objet de présentations orales lors des réunions semestrielles du projet SERAPIS et de présentations affichées dans des congrès scientifiques (un national et un international). Par ailleurs ces travaux de thèse ont été récompensés par un prix décerné par l'Académie d'Agriculture de France (AAF).

Communication dans des congrès nationaux et internationaux :

Génard T., Etienne P., Diquélou S., Laîné P. (2014) Brassica-legume intercrops: Impact on growth and agronomic performance of *Brassica napus* L. in low N inputs conditions. 17^{èmes} Journées de l'École doctorale Normande, Biologie Intégrative, Santé et Environnement, 10-11 avril 2014, Le Havre, France.

Génard T., Etienne P., Diquélou S., Laîné P. (2015) Rapeseed-legumes intercropping : A new strategy to improve *Brassica napus* crop. 14th International Rapeseed Congress, 5-9 juillet 2015, Saskatoon, Canada. Abstract book p462.

Prix décerné par l'AAF:

Bourse de recherches Jean & Marie-Louise DUFRENOY décerné par l'Académie d'Agriculture de France en 2015.

Synthèse bibliographique



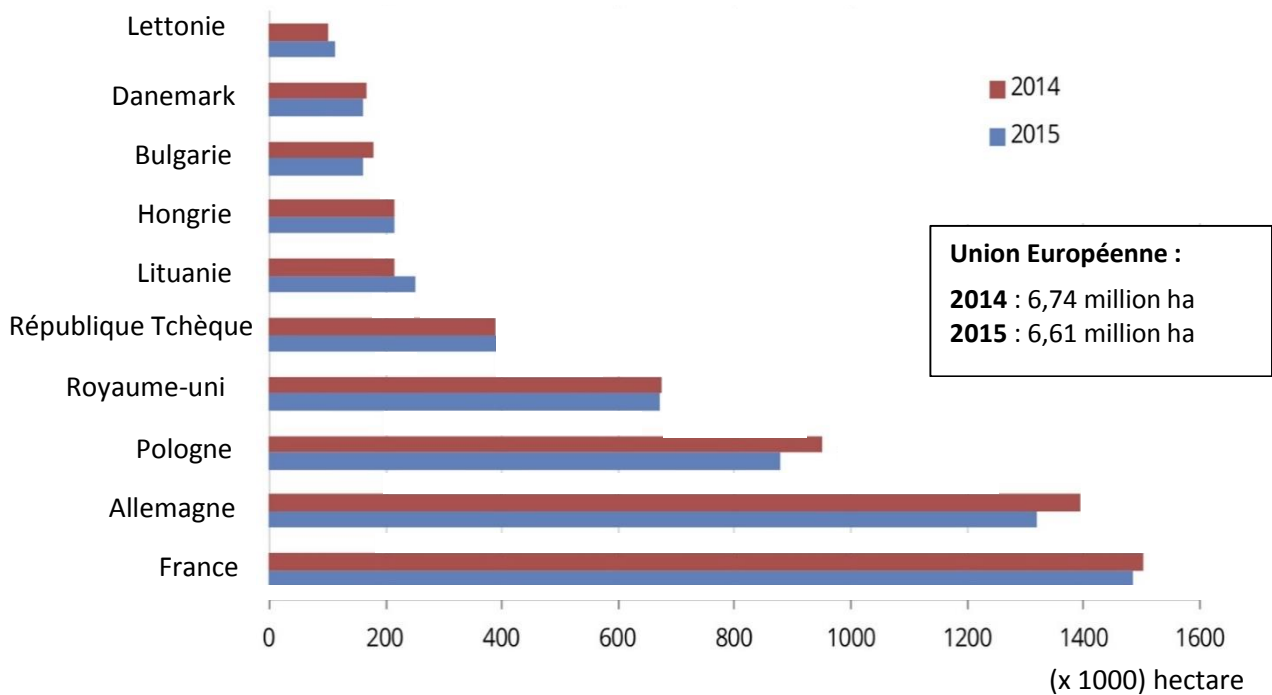


Figure 1: Pays présentant les superficies (hectare) de culture du colza (*Brassica napus* L.) les plus élevées au sein de l'Union Européenne en 2014 et en 2015. Les superficies totales de colza au sein de l'Union Européenne sont indiquées dans l'encadré (Source : European Commission, AMI, 2015).

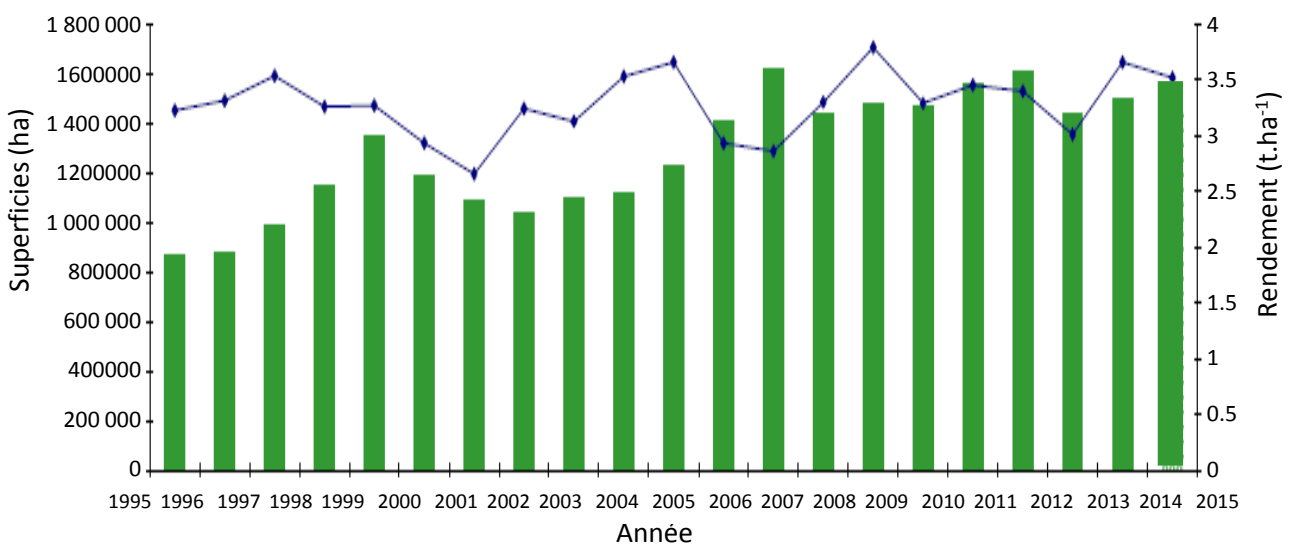


Figure 2: Evolution des superficies exprimées en ha (■) et des rendements exprimés en t.ha⁻¹ (◆) de colza en France entre 1995 et 2015 (Source : SSP-MAAF, 2015).

Synthèse bibliographique

I. La culture de colza

I.1. Quelques caractéristiques du colza

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante herbacée bisannuelle de la famille des **Brassicacées**. C'est une espèce amphidiploïde, issue d'un croisement naturel entre deux espèces diploïdes : le chou (*Brassica oleracea* L.) et la navette (*Brassica campestris* L.) (U, 1935).

I.1.1. Différents types de colza

Trois types de colza oléagineux peuvent être distingués en fonction de la période et la durée de leur cycle de développement : le colza d'hiver, le colza semi-hiver (aussi appelé colza intermédiaire) et le colza de printemps. Le **colza de printemps** (ou canola) est principalement cultivé au Canada et en Australie ainsi que dans l'Est et le Nord de l'Europe. La durée de son cycle est court (120-150 jours) puisqu'il est semé en mars pour être récolté en août et ne nécessite pas de vernalisation pour fleurir. Le **colza semi-hiver**, cultivé plus particulièrement en Chine, est semé entre octobre et mai, et fleurit en période de jours courts. Enfin, le **colza d'hiver** présente un cycle de développement plus long compris entre 250 et 330 jours. Le semis est généralement effectué fin août et la récolte est réalisée entre fin juillet et début août de l'année suivante. Ce colza, qui nécessite une période de vernalisation pour entrer en phase de floraison, est particulièrement adapté aux climats européens.

I.1.2. Production et débouchés de la culture de colza

De part ces nombreux débouchés alimentaires et non alimentaires, le colza est une culture largement répandue dans le monde. Sa production mondiale est estimée à 68,5 millions de tonnes en 2015 (USDA : United States Department of Agriculture, 2015). L'Union Européenne (UE) est actuellement le premier producteur mondial avec 22,1 millions de tonnes de graines de colza produit en 2015, suivi de la Chine, des Etats-Unis, du Canada, et de l'Inde. Au sein de l'UE, la France possédait la plus grande superficie de culture de colza en 2015 juste devant l'Allemagne (**Figure 1**). Le colza, quasiment absent du paysage français dans les années 70, occupe aujourd'hui plus de 12% des surfaces de grandes cultures et dépasse les autres oléagineux comme le tournesol. Avec un rendement moyen de 35 q.ha⁻¹ de graines, la production française de colza est en constante augmentation, et approche les 5,1 millions de tonnes lors de la campagne de 2014-2015 (**Figure 2**) (FAO, TERRES INOVIA).

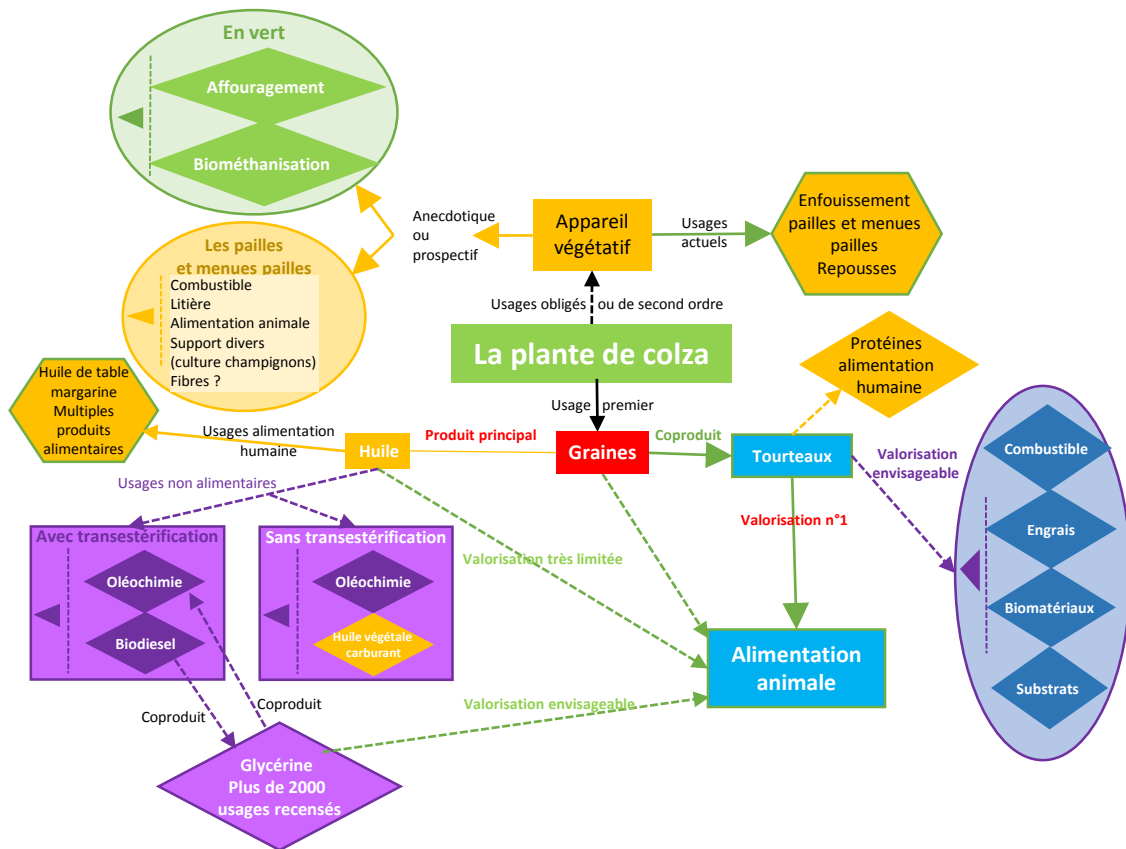


Figure 3: Représentation schématique des valorisations existantes ou potentielles des produits issus de la culture de colza (Hebinger, 2013).

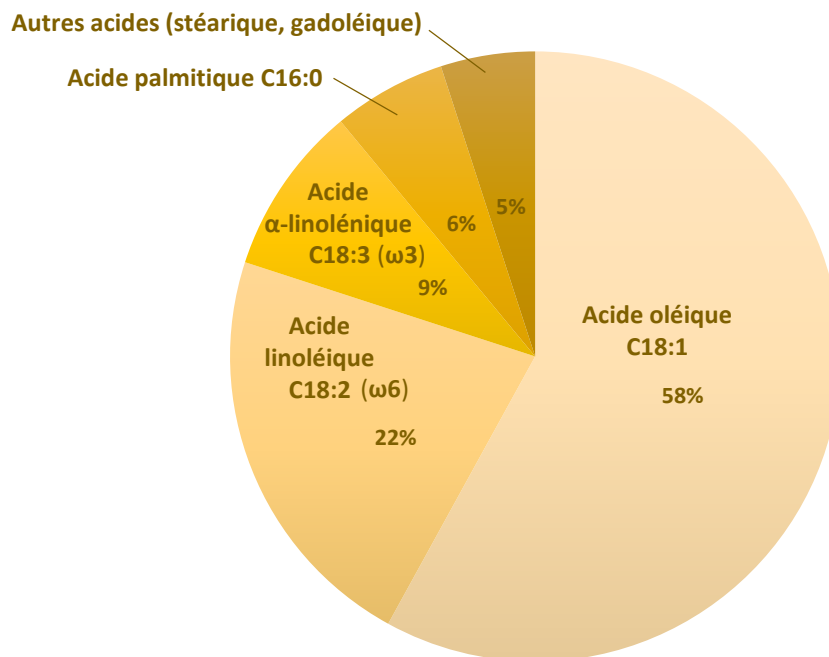


Figure 4: Composition standard en acides gras de l'huile de colza (Source : PROLEA, 2015).

Les débouchés alimentaires ou industriels du colza sont nombreux (**Figure 3**). Le colza est cultivé principalement pour son huile, issue de ses graines riches en lipides et notamment en acide linoléique (C18 :3, oméga 3, ω 3) et en acide α linoléique (C18 :2, oméga 6, ω 6) (**Figure 4**). Son faible rapport ω 3/ ω 6 ($\cong 2$) en fait une huile d'excellente qualité pour consommation humaine. Par ailleurs, transformée en ester méthylique, l'huile de colza est utilisée également dans l'industrie, pour la production de détergents, de produits cosmétiques ou encore de biodiesel (Hebinger *et al.*, 2013). Enfin, le tourteau de colza co-produit lors de l'extraction de l'huile *via* un processus de trituration est de plus en plus utilisé pour l'alimentation du bétail. En effet, sa richesse en protéines et en éléments minéraux, tels que le phosphore ou le calcium, en fait un aliment de plus en plus prisé pour l'alimentation animale (bovins et porcs principalement) puisqu'il permet de réduire de près de 50% les éléments minéraux habituellement apportés en compléments des tourteaux de soja.

I.1.3. Besoins en soufre et fertilisation soufrée du colza

Par comparaison avec d'autres espèces de grandes cultures comme la betterave ou le blé, qui ont des besoins en soufre (S) allant de 15 à 25 kg de S.ha⁻¹ (Oenema et Postma, 2003), le colza est une espèce particulièrement exigeante en S avec des besoins qui avoisinent 45 kg de S.ha⁻¹ (soit 110 kg SO₃.ha⁻¹). Le soufre est principalement absorbé sous forme de sulfate *via* des transporteurs spécifiques de la famille des SULTR (principalement SULTR1.1 et 1.2, transporteurs à faible affinité situés au niveau des poils absorbants) puis transporté *via* la sève brute jusqu'aux tissus foliaires où le sulfate pourra être assimilé grâce à l'intervention de nombreuses enzymes localisées dans les chloroplastes (voie d'assimilation réductrice) ou stocké au niveau vacuolaire. Ainsi, même si les besoins et les capacités d'absorption du sulfate sont élevés, des travaux montrent que l'indice de récolte en S du colza (IRS), c'est-à-dire le rapport entre la quantité de S retrouvé dans les graines et la quantité de S de la plante entière à la récolte, atteint seulement 20% en fin de cycle (McGrath et Zhao, 1996). Ce faible IRS s'explique notamment par une remobilisation peu efficace du sulfate vacuolaire lors du remplissage des graines (Parmar *et al.*, 2007 ; Dubousset *et al.*, 2010). Les besoins en S du colza sont particulièrement importants lors des stades de développement allant de la reprise de végétation jusqu'au remplissage des graines. Durant cette période, une déficience ou une carence en soufre peut avoir des conséquences négatives sur le rendement et la qualité des graines (D'Hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015). Actuellement, en l'absence d'indicateurs fiable permettant de diagnostiquer les carences en soufre, il est relativement difficile d'ajuster les doses de fertilisants soufrés aux besoins réels de cette plante. Cependant, Studer *et al.*, (1987) estiment des exigences moyennes allant de 2,8 à 3,2 kg de S par quintal de graines produites selon le cultivar étudié. D'autres études réalisées au Danemark et en Allemagne,

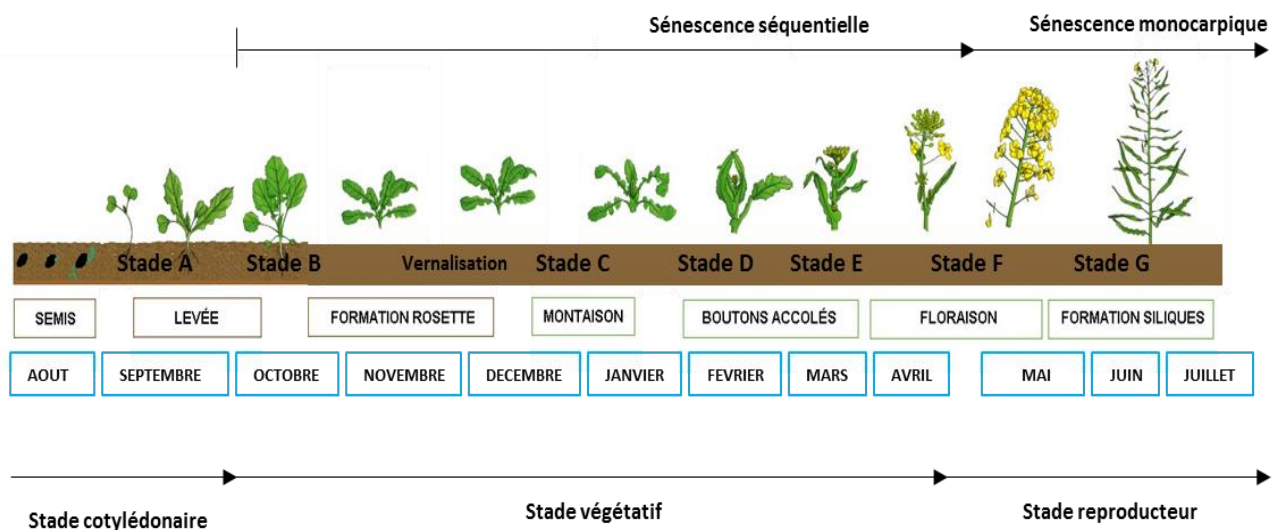


Figure 5: Cycle de développement du colza d’hiver, du semis à la formation des siliques. Les stades indiqués (A à G) correspondent à ceux définis par Terres Inovia (Source : Terres Inovia, 2015).

montrent qu'un apport compris entre 30 et 50 kg de S ha⁻¹ permettent d'éviter les déficiences en S (Pedersen *et al.*, 1998). Aux Etats-Unis, les recommandations pour satisfaire les besoins en S du colza sont d'environ 20 kg de S.ha⁻¹ (Jackson, 2000) alors qu'en France, Terres Inovia recommande un apport de 30 kg de S.ha⁻¹.

Les doses de S présentées ci-dessus ne constituent que des préconisations qui, dans les faits, ne sont pas toujours suivies puisqu'une étude récente montre qu'en France les doses de S réellement appliquées varient de 0 à 112 kg S.ha⁻¹ (Sarda *et al.*, 2014). Toutefois, le développement récent de nouveaux indicateurs du statut soufré des plantes devrait permettre, dans un proche avenir, un meilleur pilotage de la fertilisation soufrée du colza (Sorin *et al.*, 2015).

I.2. Besoins en azote et fertilisation azotée au cours du développement du colza d'hiver

I.2.1. Gestion de l'azote au cours du développement du colza d'hiver

L'azote (N) est un élément indispensable à la croissance et au développement des plantes et constitue l'un des principaux facteurs qui conditionnent le rendement de la culture. En effet, l'azote est essentiel pour la synthèse de molécules majeures comme les acides aminés (et donc les protéines) ou les chlorophylles indispensables à la croissance des plantes. Dans le sol, l'azote minéral (nitrate et ammonium) constitue la forme préférentiellement absorbée par les plantes grâce à l'intervention de transporteurs racinaires à faible et forte affinités (par exemple, familles de transporteurs NRT1 et NRT2 pour le nitrate ; Forde, 2000) qui permettent aux plantes de répondre aux concentrations nitrique et ammoniacale très fluctuantes dans les sols.

Le colza est une plante qualifiée de nitrophile, particulièrement exigeante en N pouvant être utilisée comme culture intermédiaire piège à nitrate (CIPAN). Sa capacité d'absorption de l'azote et ses besoins en azote varient pendant son cycle de développement, constitué de 7 stades (**Figure 5**) : stade cotylédonnaire (stade A), formation de la rosette (stade B), montaison (stade C), développement des bourgeons floraux (stades D et E), floraison (stade F) et développement des siliques/formation des graines (stades G). Un résumé des besoins en azote du colza de la phase végétative à la phase reproductrice est présenté dans les paragraphes suivants.

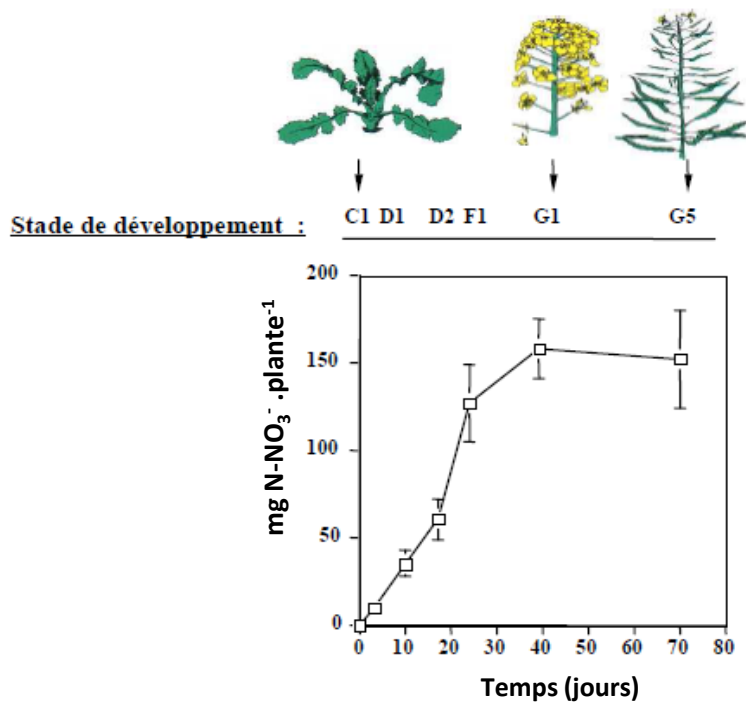


Figure 6: Absorption cumulée d'azote nitrique (exprimée en mg N-NO₃⁻·plante⁻¹) estimée chez le colza par marquage au ¹⁵NO₃⁻ pendant 70 jours en conditions de cultures hydroponiques. Les barres verticales indiquent ± l'écart-type de la moyenne pour n=6. Les stades indiqués (C à G) correspondent à ceux définis par Terres Inovia. C1 : montaison; F : début de floraison; G : début de formation des siliques; G5 : graines colorées. D'après Rossato *et al.*, 2001.

I.2.1.1. Du semis au stade montaison (C)

En France, le colza d'hiver est semé entre mi-août et mi-septembre avec une densité de 30 à 60 graines par m², permettant d'atteindre en sortie d'hiver une densité de 25 à 35 pieds par m². A la levée des semis, deux cotylédons apparaissent puis une vingtaine de feuilles pédonculées et découpées se développent pour former la rosette (**Figure 5**). En parallèle, le pivot se développe et accumule des réserves organiques qui seront utilisées lors de son développement ultérieur. Pendant la période hivernale, lorsque les températures atteignent environ 4°C (« zéro végétatif »), la croissance du colza ralentit progressivement jusqu'à s'arrêter (période de repos végétatif). Cette période de froid (vernalisation) est nécessaire pour le passage de la phase végétative à la phase reproductrice et conditionne la montaison et l'initiation florale du colza (Merrien et Pouzet, 1988).

Pendant cette période automno-hivernale, le colza présente une forte capacité d'absorption de l'N (nitrate principalement) et un fort potentiel de stockage de l'azote (Rossato *et al.*, 2001). Une comparaison des capacités d'absorption du nitrate de jeunes plantes de colza d'hiver avec celles de trèfle (*Trifolium alexandrinum* L., *Trifolium incarnatum* L.), de graminées (*Lolium perenne* L., *Lolium multiflorum* Lam., *Secale cereale* L.) et de plusieurs autres Brassicacées (*Sinapis alba* L., *Brassica rapa* L., *Raphanus sativus* L.) en conditions contrôlées a montré que le colza présente une capacité d'absorption du nitrate parmi les plus élevées (Lainé *et al.*, 1993). En dépit de sa forte capacité d'absorption d'azote, le colza est également connu pour restituer au sol de fortes quantités d'azote organique *via* la chute de ses feuilles dont les teneurs en azote peuvent atteindre 3,5% de la matière sèche (Colnenne *et al.* 1998 ; Dejoux, 1999 ; Malagoli *et al.*, 2005b) . Cette chute de feuilles, inféodée au processus de sénescence foliaire séquentielle marque le stade ultime du développement d'une feuille et se déroule tout au long du développement végétatif du colza. Cependant, pendant cette période, les conditions climatiques défavorables (basses températures et faible rayonnement par exemple) peuvent accélérer le processus de sénescence foliaire et ainsi augmenter les restitutions d'azote au sol qui peuvent atteindre 100 kg N. ha⁻¹ (Dejoux *et al.*, 2000). L'azote organique perdu au cours de la saison automno-hivernal n'est que faiblement réabsorbé par la culture en place et contribuera donc peu à la reprise de croissance au printemps et au remplissage des graines. Ainsi, une étude cinétique de décomposition des feuilles préalablement marquées au ¹⁵N a permis de montrer que seulement 28 % de l'azote restitué au sol étaient réabsorbés par le colza au stade floraison et 24 % au stade récolte (Dejoux *et al.*, 2000).

I.2.1.2. Du stade montaison (C) au stade bourgeons accolés (E)

Au printemps, une reprise de croissance du colza, caractérisée par le développement de feuilles lancéolées et entières, et par l'augmentation de la surface foliaire est observée. En parallèle, la tige commence à s'allonger (montaison) et les premières ramifications sont émises (**Figure 5**). L'utilisation d'un marquage continu au ^{15}N en conditions contrôlées, a permis de suivre l'absorption cumulée de nitrate $^{15}\text{NO}_3^-$ de la reprise de végétation jusqu'au remplissage des graines (**Figure 6** ; Rossato *et al.*, 2001). Cette étude met en évidence une forte absorption de l'azote jusqu'au stade G1 (chute des premiers pétales). L'azote minéral absorbé est principalement alloué aux parties aériennes (36% vers la tige, 30% vers les feuilles et 16,5% vers les inflorescences) et au pivot (10%) (**Figure 7A**). De plus, une quantité non négligeable d'azote endogène est remobilisée des feuilles matures au profit de la tige (51 %), des inflorescences (33 %) et du pivot (9 %).

I.2.1.3. Du stade floraison (F) jusqu'à la récolte (G)

Au cours du stade reproducteur, les inflorescences se développent aux apex caulinaires et la tige se ramifie alors que la montaison et la floraison se poursuivent. Le remplissage et la maturation des graines durent de 6 à 7 semaines. La récolte intervient entre mi-juillet et début août, et s'effectue lorsque le taux d'humidité des graines est inférieur à 15%.

La transition entre la phase végétative et la phase reproductrice constitue chez le colza l'étape la plus critique du cycle de développement pour l'élaboration du rendement. En effet, c'est au début de la floraison que le nombre potentiel de siliques, défini par le nombre d'inflorescences apparues, est déterminé par la biomasse produite pendant la montaison (Habekotté, 1993). Il est donc important que pendant cette phase, la disponibilité en azote nécessaire au développement et à la croissance des inflorescences puis des jeunes siliques, soit suffisante pour satisfaire la demande de ces nouveaux puits.

Au début de la formation des siliques, la quantité d'azote cumulée atteint un plateau indiquant une faible absorption d'azote jusqu'à la maturation des graines (**Figure 6** ; Rossato *et al.*, 2001). Cette diminution de l'absorption peut s'expliquer en partie par les conditions climatiques édaphiques rencontrées à cette période (Merrien *et al.*, 1988).

Des études réalisées en conditions contrôlées ont montré que cette diminution de l'absorption ne dépend pas uniquement de facteurs externes, mais également de facteurs internes, et notamment d'une forte répression des transporteurs racinaires de nitrate (Beuve *et al.*, 2004). Dans ces conditions, l'azote nécessaire au remplissage des siliques est essentiellement issu de la remobilisation de l'azote endogène associée au processus de sénescence monocarpique (**Figure 7B**). Ainsi, plusieurs études ont montré que l'azote alloué aux siliques provient principalement des feuilles (41%), de la tige (31%) et du pivot (11%) (**Figure 7B** ; Schjoerring *et al.*, 1995 ; Hocking *et al.*,

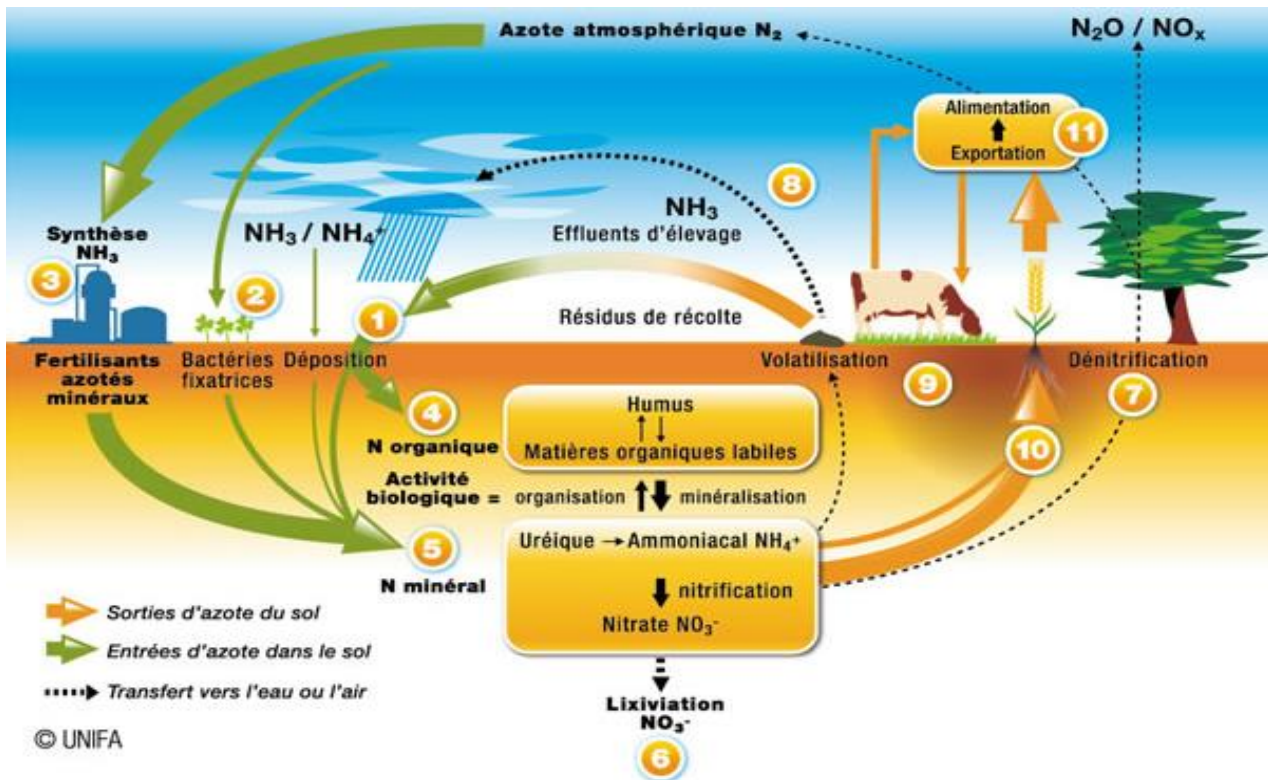


Figure 8: Fertilisation azotée et cycle de l'azote (Source: UNIFA, 2015).

1. **Fertilisation organique** : La décomposition des matières organiques des déchets d'origine végétale ou industrielle.
2. **Fixation de l'azote atmosphérique (N_2)** par les plantes fixatrices.
3. **Fertilisation minérale** : Les engrais azotés sont pour la plupart produits à partir de NH_3 , synthétisé à partir de méthane (CH_4) et de N_2 .
4. **La communauté microbienne** transforme le N organique en matière minérale. La **minéralisation** de la matière organique du sol (et des effluents) produit de l'ammonium.
5. **La nitrification** par les bactéries du sol transforme le NH_4^+ en NO_3^- . Des pertes sous formes de protoxyde d'azote (N_2O) ou d'oxyde d'azote (NO_x) peuvent survenir durant ce processus.
6. **Lixiviation du NO_3^-** : Le NO_3^- peut être lixivié en profondeur par l'eau dans le sol, principalement en hiver lorsque l'excès d'eau fait migrer le NO_3^- hors de portée des racines.
7. **Dénitrification** : Les bactéries du sol transforment le NO_3^- (et les nitrites) en N_2 et en N_2O et NO_x .
8. **Volatilisation** sous forme de NH_3 au moment de l'épandage des engrais azotés ou au cours de l'hydrolyse de l'urée. L'**hydrolyse de l'urée** catalysée par les uréases présentes dans le sol convertit l'urée en NH_4^+ et en CO_2 .
9. **Absorption du NH_4^+** via des transporteurs spécifiques. Le NH_4^+ est adsorbé sur les colloïdes électro-négatifs des particules du sol.
10. **Absorption du NO_3^-** via des transporteurs spécifiques. La majorité des cultures annuelles utilisent préférentiellement le NO_3^- au NH_4^+ .
11. **Les produits récoltés** sont utilisés pour la nutrition humaine et animale.

1997 ; Rossato *et al.*, 2001). D'autres études, utilisant une application foliaire d'urée marquée au ^{15}N au début de la floraison, confirment que les feuilles constituent l'organe source d'azote majoritaire puisque 80% de l'azote marqué sont exportés vers les siliques (Zhang *et al.*, 1991). Enfin, lors du stade de remplissage des graines, les parois des siliques se comportent également comme des organes sources d'azote puisque l'application d'urée marquée au ^{15}N sur les siliques montre que l'azote est majoritairement transféré vers les graines de ces siliques (Zhang *et al.*, 1993 ; Dreccer *et al.*, 2000).

I.2.2. Fertilisation azotée et bilan agro-environnemental du colza

Comparativement à d'autres espèces, le colza présente une faible **efficience d'utilisation de l'azote** (EUA : biomasse de graines produites. kg^{-1} N absorbé). Cette faible EUA impacte directement l'indice de récolte azoté du colza (IRN : rapport entre la quantité d'N contenu dans les graines et les quantités d'N dans les parties aériennes (graine + pailles) en fin de cycle), considéré comme faible notamment à cause de la forte teneur en N des pailles. Généralement inférieur à 50% chez le colza, cet IRN peut dépasser 80% chez les céréales (Schjoerring *et al.*, 1995). Chez le colza, cet IRN est d'autant plus faible que le niveau des intrants azotés est important (Dreccer *et al.*, 2000). Cette faible EUA et ce faible IRN sont essentiellement dus à une faible efficience de remobilisation de l'azote foliaire notamment au cours de la sénescence foliaire séquentielle et monocarpique (Malagoli *et al.*, 2005a et b ; Tilsner *et al.*, 2005 ; Avice et Etienne, 2014). A titre d'exemple, au cours des stades végétatifs, les quantités d'N restituées au sol, *via* la chute des feuilles sénescentes avec de fortes teneurs en N (de l'ordre de 3,5 %), peut représenter de 60 à 100 $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ selon le niveau de fertilisation pratiqué (Dejoux *et al.*, 2000 ; Malagoli *et al.*, 2005b) et ne sont pas valorisables pour le remplissage des graines de colza. En conséquence, compte-tenu de cette faible EUA, la culture de colza requiert, pour satisfaire ses besoins azotés, une fertilisation azotée particulièrement importante comparativement à d'autres cultures. En conséquence, une fertilisation azotée de 150 à 210 kg N ha^{-1} est préconisée au printemps, dès la reprise de végétation (Rathke *et al.*, 2005), afin d'obtenir une production de biomasse permettant d'atteindre un objectif de rendement, généralement compris entre 30 et 40 $\text{q}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Outre la perte financière non négligeable pour l'exploitant agricole due au coût énergétique de la production des engrais azotés (indexée sur le marché pétrolier) ainsi qu'à la mauvaise valorisation de leur apport. Un excès d'azote peut modifier fortement le cycle de l'azote (**Figure 8**) et plus globalement engendrer des conséquences négatives sur le climat et l'écosystème. En effet, une fertilisation azotée excessive ou mal maîtrisée peut entraîner des pertes d'azote au niveau du sol par lessivage du nitrate lors des précipitations entraînant la pollution des eaux superficielles et

Tableau 1: Stratégies d'améliorations de la fertilisation azotée et objectifs visés. D'après Wiesler *et al.*, 2001.

	Stratégies d'amélioration	Objectifs visés
Amélioration variétale et géotypique	Sélection variétale, obtention de plantes génétiquement modifiées	Augmentation de l'absorption et de l'utilisation du N du sol et des fertilisants
Amélioration des fertilisants et/ou de leur utilisation	Forme d'azote apportée (<i>i.e.</i> fertilisation minérale vs fumure organique, urée vs nitrate, utilisation d'inhibiteurs d'uréases et de nitrification)	Eviter la perte de N causée par les formes de N ou une transformation du N dans le sol. Augmentation de l'efficacité d'usage du N en considérant la préférence des plantes pour certaines formes de N (NH_4^+ vs NO_3^-)
	Dates et nombres des apports	Réduction des pertes de N (NO_3^- , N_2 , NH_3^+), augmentation de l'efficacité d'usage du N
	Techniques d'application (<i>i.e.</i> surface vs incorporation vs diffusion)	Réduction des pertes de N (NO_3^- , N_2 , NH_3^+), amélioration de la disponibilité spatiale du N, réduction de l'immobilisation du N
Amélioration des pratiques culturales	Cultures intermédiaires piège à nitrate (CIPAN) et cultures associées à base de plantes fixatrices (légumineuses)	Absorption du N du sol et minéralisation du N résiduel des plantes à l'automne menant à une réduction de la perte de N par lessivage et à une augmentation de la disponibilité en N pour les cultures suivantes
	Gestion des résidus de culture Incorporation des chaumes Date, intensité et profondeur d'enfouissement de la culture	Contrôle de la minéralisation du N pendant l'automne et l'hiver Immobilisation du N minéral du sol Contrôle de la minéralisation du N du sol
	Cultures et rotation de cultures	Augmentation de l'absorption et de l'utilisation de l'azote par l'utilisation de culture efficiente pour le N, réduction de la fréquence des jachères et rotation des cultures à enracinement superficiel/ profond
	Prédiction de la fertilisation azotée adaptée à la demande en N (<i>i.e.</i> test sur sol et plante, indicateurs et modélisation de la fertilisation)	Augmentation de l'absorption et de l'utilisation du N du sol et des fertilisants en considérant le N disponible au début de la croissance et la minéralisation durant le cycle de développement

souterraines, participant à l'acidification et à l'eutrophisation des cours d'eau, et la prolifération des algues vertes dans les milieux estuariens. La perte d'azote se fait également par voie gazeuse *via* les processus de volatilisation et de dénitrification qui participent au dégagement de gaz à effet de serre dans l'atmosphère tels que l'ammoniac, le monoxyde d'azote ou encore le protoxyde d'azote.

Ainsi, compte-tenu du bilan agro-environnemental de la culture de colza particulièrement médiocre, plusieurs stratégies alternatives sont actuellement envisagées afin de réduire les doses d'intrants azotés tout en maintenant (voire améliorant) le rendement du colza. Parmi ces stratégies, on peut distinguer celles qui reposent sur l'amélioration des pratiques culturales (agriculture de précision, utilisation de molécules d'origine biologiques ou cultures associées), de celles qui reposent sur l'obtention de nouveaux génotypes de colza issus de la sélection/amélioration de variétés particulièrement adaptés à une réduction des intrants azotés (**Tableau 1** ; Wiesler *et al.*, 2001 ; Rathke *et al.*, 2006).

1.2.3. Obtention de nouveaux génotypes plus efficaces

De nouveaux génotypes de colza à forte EUA, c'est-à-dire capables d'absorber, d'assimiler efficacement l'azote et de recycler/remobiliser efficacement l'azote de ses vieilles feuilles vers les feuilles en croissance et/ou les graines, permettraient de réduire considérablement les pertes d'azote et, par voie de conséquence, de limiter l'apport d'intrants azotés (Chardon *et al.*, 2012). **L'obtention de plantes génétiquement modifiées**, essentiellement *via* la surexpression ou l'arrêt de l'expression de gènes impliqués dans certaines composantes de l'EUA est une des solutions envisagées. Ainsi, la surexpression racinaire d'une Alanine aminoTransférase (AlaT) d'orge (enzyme catalysant la synthèse d'alanine et de 2-oxoglutarate à partir de glutamate et de pyruvate) chez le colza a permis une augmentation de l'influx de nitrate (+76% par rapport aux plantes témoins non modifiées) et d'atteindre le même rendement que les plantes non modifiées avec 40% de fertilisants azotés en moins (Good *et al.*, 2007). Cependant, en France, la culture de plantes transgéniques à des fins commerciales est interdite.

Dans ce contexte, **la sélection variétale** s'impose comme le meilleur moyen d'obtenir de futures variétés plus adaptées aux conditions de faibles intrants azotés. Actuellement, une des stratégies d'amélioration de l'EUA passe par une optimisation de la remobilisation de l'azote associée aux mécanismes de senescence, qui permettrait une optimisation du recyclage du N et donc d'obtenir un rendement similaire avec moins d'intrants azotés. En effet, *via* une approche de modélisation, Malagoli *et al.*, (2005a) estiment qu'une meilleure mobilisation de l'azote endogène, entraînant une diminution des teneurs en azote dans les feuilles chutées de 2 à 1%, permettrait d'augmenter le rendement de la culture de 15%. Ces travaux suggèrent notamment qu'une

amélioration de l'efficacité de remobilisation de l'azote (ERA) permettrait un meilleur remplissage des graines en fin de cycle. Chez le colza, de nombreux travaux de recherche soulignent que la faible ERA serait essentiellement due à un défaut de dégradation des protéines du chloroplaste au cours de la sénescence foliaire (Avicé et Etienne, 2014). Par ailleurs, une étude récente visant à explorer la variabilité génotypique naturelle de l'efficacité d'utilisation de l'azote a montré qu'il était possible d'identifier 4 groupes de génotypes de colza présentant des EUA contrastées (Girondé *et al.*, 2015). Cette étude a aussi montré que les génotypes ayant les plus fortes EUA présentaient également les plus fortes ERA. En utilisant des méthodes de marquage ^{15}N couplée à des approches moléculaires, ces auteurs ont également montré que les génotypes à forte ERA exprimaient des protéases à cystéine spécifiques, confirmant ainsi le rôle majeur des protéases dans l'efficacité d'utilisation de l'azote par le colza. L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe une variabilité génotypique naturelle de l'ERA exploitable pour identifier des génotypes de colza présentant une forte EUA en particulier en condition de faible nutrition azotée (Girondé *et al.*, 2015, Poret *et al.*, 2016). En outre, de telles approches devraient permettre d'identifier des déterminants moléculaires (protéases par exemple) utilisables par les généticiens améliorateurs pour la création de nouvelles variétés présentant une forte EUA en conditions de faibles intrants.

I.2.4. Amélioration des pratiques culturales

Une autre stratégie d'amélioration réside dans une meilleure gestion des pratiques culturales. Ces dernières années, plusieurs réglementations ont permis d'améliorer la gestion de la fertilisation des cultures de colza d'hiver. Par exemple, la directive « nitrate » 91/676/CEE de 1991, a interdit les apports d'intrants azotés du 1er septembre au 31 janvier afin de limiter les risques de pollution des eaux superficielles et profondes par lessivage et ruissellement du nitrate. Concernant la culture de colza, ce type de directive ne présente pas d'effet néfaste puisqu'il a été montré que l'apport d'engrais pendant la période automnale, n'a aucun effet sur le rendement de la culture (Colenne *et al.*, 1998). Par ailleurs, au printemps, lorsque la dose d'engrais à apporter est supérieure à $100 \text{ kg N. ha}^{-1}$, il est préconisé de fractionner les apports en deux (voire trois si la dose dépasse $170 \text{ kg N. ha}^{-1}$), sachant que le premier apport a toujours lieu dès la reprise de végétation (Terre Inovia 2007).

Outre la mise en place de mesures réglementaires, différentes méthodes de diagnostic du statut azoté et des **outils d'aide à la décision** ont été développés afin de raisonner la fertilisation azotée (Réglette Azote, Image IT-Yara, par exemple) en permettant aux exploitants agricoles d'ajuster la fertilisation azotée à leur objectif de rendement, tout en limitant les pertes d'azote dans l'environnement. Développée par Terres Inovia, la Réglette Azote est un outil simple basé sur l'Indice de Nutrition Azotée (INN) qui permet d'estimer la dose de fertilisants azotés à apporter au

printemps en prenant en compte différents facteurs tels que le type de sol (superficiel ou profond), l'apport de matières organiques effectué, l'objectif de rendement et le poids frais du colza en entrée et en sortie d'hiver. Un autre outil de diagnostic, Image IT-Yara, développé par la société Yara et Terres Inovia, propose aux agriculteurs une application smartphone. Des photographies de leurs plantes aux stades végétatifs (entrée et sortie d'hiver) sont envoyées sur un serveur qui effectuent des calculs de biomasses et de quantités d'azote absorbé et estime les besoins azotés de la culture.

Si les stratégies présentées ci-dessus sont essentiellement basées sur les capacités des plantes à mieux utiliser l'azote ou consistent à mieux raisonner la fertilisation azotée, d'autres alternatives s'intéressent à la mise au point de nouveaux engrais azotés. Ainsi, l'utilisation d'**engrais à libération lente et contrôlée** constitue également une perspective d'amélioration des pratiques culturales et de la gestion des apports azotés. D'un point de vue technique, ces engrais contiennent un élément nutritif associé à une molécule qui retarde sa libération dans le temps afin de permettre une meilleure utilisation par les végétaux après son application. Ainsi, des travaux récents réalisés chez le colza montrent qu'en présence d'inhibiteurs d'uréases et d'inhibiteurs de la nitrification la disponibilité de l'azote uréique pour la plante est augmentée et que les pertes d'azote par lessivage et/ou volatilisation (émissions d'oxyde nitreux et/ou d'ammoniac) sont fortement réduites (Arkoun *et al.*, 2013).

Une autre piste prometteuse s'oriente vers la mise au point de **biostimulants**, c'est à dire de molécules biologiques qui, apportées à faible dose, sont capables de stimuler la nutrition minérale et le rendement des plantes. Ainsi, chez le colza d'hiver, des études ont montré que l'application d'un extrait à base d'algues (AZAL5) ou d'acide humique (E7) au stade végétatif permet une meilleure nutrition minérale de la plante notamment grâce à une meilleure absorption du nitrate et du sulfate *via* une induction de leurs transporteurs racinaires respectifs (Jannin *et al.*, 2012 ; Billard *et al.*, 2014). A titre d'exemple, dans le cas d'AZAL5, cette meilleure absorption permet d'augmenter l'allocation de l'azote aux parties aériennes et aux parties racinaires, conduisant à une augmentation de la biomasse des parties aériennes (+23%) et racinaires (+102%), de la teneur en chlorophylles et de l'EUA (+84%) (Jannin *et al.*, 2013). Par ailleurs, ces auteurs ont également montré que l'apport d'extraits se traduisait par l'expression différentielle (par rapport aux plantes non traitées) de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans les mécanismes de défense des plantes suggérant un rôle bénéfique de ces biostimulants en situation de stress biotiques ou abiotiques (Jannin *et al.*, 2012 ; 2013).

Si toutes les stratégies présentées ci-dessus constituent autant d'alternatives intéressantes pour améliorer le bilan agro-environnemental du colza, une autre stratégie consistant à associer le

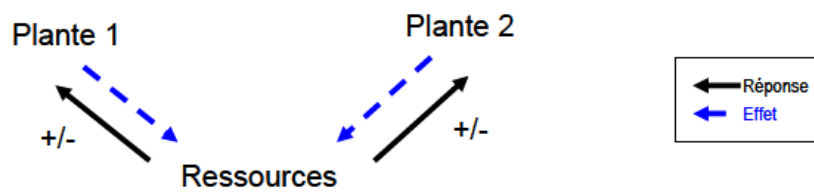


Figure 9: Schéma d'interactions entre espèces végétales au travers de leurs effets (flèches bleues) et de leurs réponses (flèches noires) sur les ressources du milieu, lorsque celles-ci sont limitées. La compétition correspond à une situation où les effets des espèces sur les ressources induisent une réponse négative (-) chez au moins l'une des deux espèces présentes. A l'inverse, la facilitation correspond à l'induction d'une réponse positive (+). Les principales ressources pour les plantes sont le rayonnement lumineux, l'eau et les éléments minéraux (Louarn *et al.*, 2010).

colza à des Fabacées n'est à ce jour, que très peu considérée alors qu'elle est très utilisée chez d'autres espèces, comme par exemple, les céréales. Le principe général et les principaux avantages des cultures associées seront détaillés ci-après en s'appuyant sur des études portant sur le colza lorsque celles-ci sont disponibles.

II. Principe général, fonctionnement et intérêts agroécologiques des associations à base de Fabacées

II.1. Définition et contexte actuel

Utilisées au début de l'agriculture, les cultures associées ont progressivement disparu avec l'intensification de l'agriculture et l'utilisation des intrants chimiques de synthèse au profit des systèmes monospécifiques actuellement remis en cause suite à l'émergence des préoccupations d'économie d'intrants, d'amélioration de l'efficacité des facteurs de production et de préservation de l'environnement et de la biodiversité. L'**association de cultures** (ou cultures associées) est définie comme la culture simultanée d'au moins deux espèces, sur la même surface, pendant une période significative de leurs cycles de croissance (Willey, 1979a).

Les espèces cultivées en association peuvent interagir directement ou indirectement l'une sur l'autre en modifiant les caractéristiques de l'environnement dans lequel elles sont implantées, dans l'espace ou dans le temps (Vandermeer, 1989) (**Figure 9**). Ces modifications concernent par exemple le partage des ressources (lumière, eau, azote ; Ofori et Stern, 1987 ; Jensen, 1996a ; Tsubo *et al.*, 2001), les caractéristiques biologiques, physiques ou chimiques du sol (Swift *et al.*, 2004), la pression des maladies et des ravageurs (Trenbath, 1993 ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001a). Selon Vandermeer (1989), l'interaction entre plantes associées se fait au travers de leur environnement selon deux processus: la compétition et la facilitation.

La **compétition** s'observe lorsqu'une espèce modifie l'environnement de façon négative pour la seconde espèce, comme par exemple lorsque la consommation d'une ressource par la première espèce rend celle-ci limitante pour la seconde. Cependant, la compétition interspécifique peut être réduite lorsque les deux plantes exploitent des ressources différentes de sorte que lorsqu'elles sont cultivées ensemble, elles se complètent et utilisent les ressources plus efficacement qu'en cultures pures (Willey, 1979). Ce phénomène de partition des ressources abiotiques, appelé **complémentarité de niche**, intervient si les espèces ont des demandes à des périodes différentes, utilisent des ressources dans des zones de sol différentes, ou utilisent différentes formes d'une même ressource. Cette complémentarité de niche s'applique

typiquement au cas de l'azote dans les cas d'associations culturales entre une Fabacée et une espèce non fixatrice d'azote. Par ailleurs, une complémentarité de niche peut également être observée lorsque les deux plantes associées présentent des architectures racinaires et/ou aériennes différentes permettant une exploitation des ressources (nutritionnelles et/ou lumineuses, respectivement) dans des horizons spatiaux différents. Ces différentes compétitions dépendent et varient en fonction des caractéristiques morphologiques (type de système racinaire, port aérien), physiologiques (capacité à fixer l'azote atmosphérique, besoins nutritionnels) des plantes associées mais également de la disponibilité des autres ressources (eau, éléments minéraux, rayonnement lumineux), ainsi que du contexte pédoclimatique (Connolly *et al.*, 1990 ; Anil *et al.*, 1998 ; Hartwig and Ammon, 2002 ; Scholberg *et al.*, 2010 ; Lithourgidis *et al.*, 2011).

La **facilitation** est un processus qui contribue de façon majeure à améliorer les performances des associations (comparativement aux systèmes monospécifiques) dans l'utilisation des ressources. La facilitation intervient lorsqu'une espèce augmente la croissance ou la survie de l'espèce compagne qui lui est associée (Callaway, 1995) à travers l'accroissement des ressources telles que la lumière, l'eau ou les nutriments que ce soit de façon directe (interactions plante-plante) ou indirecte *via* les communautés microbiennes du sol. A titre d'exemple, plusieurs études (Li *et al.*, 2007 ; Betencourt *et al.*, 2012) se sont intéressées au phénomène de facilitation pour l'acquisition du phosphore, un élément présent dans le sol mais dont la part disponible pour les végétaux ne représente qu'une proportion infime du phosphore total (organique et minérale). Par exemple, la présence de certaines Fabacées comme le lupin blanc et le pois chiche peut augmenter la part de phosphore disponible *via* l'exsudation racinaire de composés tels que des acides organiques (citrates et malates) qui vont modifier le pH du sol (Jones *et al.*, 2009 ; Hinsinger *et al.*, 2011) et ainsi favoriser la désorption du phosphate inorganique (Devau *et al.*, 2010) et/ou la dissolution du phosphate précipité sous forme de phosphate de calcium (Hinsinger et Gilkes, 1996). Ainsi, le processus de facilitation est observé lorsqu'une plante très efficace (Fabacée) pour mobiliser le phosphore du sol (*via* de forte capacité d'exsudation racinaire de composés organiques) sera associée à une espèce peu efficace (céréale, par exemple) pour la mobilisation du phosphore.

Les associations de cultures, et notamment celles comprenant au moins une Fabacée, se rencontrent aujourd'hui fréquemment dans les régions tropicales et dans les prairies pluriannuelles en zone tempérée (Malézieux *et al.*, 2009). Actuellement, la surface occupée par les associations céréales-Fabacées en France, ne s'élève qu'à 50 000 hectares, mais présentent un regain d'intérêt, notamment dans les systèmes à faibles niveaux d'intrants en particulier en agriculture biologique (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001a ; Bellostas et Jensen, 2004).



Figure 10: Photographies de différentes associations végétales rencontrées en agriculture : **(A)** association annuelle de blé et de pois présente en Europe; **(B)** association de bananier et *Neonotonia Wightii* (Fabacée pérenne) en Guadeloupe; **(C)** association de type prairial de raygrass anglais et de trèfle blanc rencontrée en Europe; **(D)** association de maïs, haricot et courge (appelée « Milpa ») au Mexique; **(E)** association de blé et haricot rencontrée en Europe.

II.2. Les différents types de cultures associées à base de Fabacées

Il existe différents types d'associations qui diffèrent selon les espèces (espèces annuelles ou pérennes, ligneuses ou herbacées), les objectifs de production (grains, fourrage, alimentation humaine ou animale), les arrangements spatiaux des semis, ou selon la densité des espèces au sein de l'association (**Figure 10**).

Les cultures de rente associées de type méteil associant des céréales et des protéagineux (association blé-pois, triticales-pois) sont utilisées pour la production de graines destinées à l'alimentation animale (la paille pouvant servir de fourrage d'appoint) ou la production de fourrage (ensilage et enrubannage et plus rarement foin). Les **associations prairiales** (temporaires ou permanentes) comme les associations luzerne-dactyle, trèfle blanc-raygrass anglais où les Fabacées sont exploitées par fauche et/ou en pâturage. Les Fabacées ligneuses, telle que *Leucaena mimosas* pouvant fixer de grandes quantités de N₂ (jusqu'à 600 kg.hectare⁻¹.an⁻¹) sont utilisées en **agroforesterie** (Sprent et Parsons, 2000). Les **associations annuelles céréale-Fabacée** où les Fabacées peuvent être récoltées pour leurs graines riches en protéines et en amidon (pois, féverole, soja, lentille, haricot) ou exploitées uniquement en couverts associés à une culture principale dite « de rente » (vesce, lupin, trèfle, gesse). Il existe également des associations où une culture de rente est associée, pendant l'intégralité ou une partie de son cycle, à une plante compagne (également appelée « plante de service»). Les associations avec des plantes compagnes se distinguent selon plusieurs catégories (**Tableau 2**):

- Semis simultané avec la culture de rente ; la plante compagne meurt ou est détruite avant la récolte de la culture principale (association colza-Fabacées).
- Association relais où une espèce (ou un mélange) est semée en cours de cycle de la culture de rente, le bénéfice attendu étant principalement pour la culture suivante (blé associé en relais à des Fabacées).
- Associations (semi) permanentes : semis direct de la culture de rente dans un couvert (semi) permanent non récolté (maïs dans un couvert vivant permanent de trèfle).

Quatre types d'arrangements spatiaux des semis dans les cultures associées peuvent être distingués (**Figure 11** ; d'après Vandermeer 1989) :

- **Les associations en mélange aléatoire** (« *mixed intercropping* ») : Les espèces sont mélangées au hasard dans l'espace disponible.
- **Les associations en rangs alternés** (« *row intercropping* ») : L'association en rangs alternés consiste à semer les différentes espèces de l'association sur des rangs séparés qui s'alternent dans l'espace ou à semer les différentes espèces associées en alternance au sein d'un même rang.

Tableau 2: Différents types d'associations à base de Fabacées rencontrés en Europe en fonction de leurs objectifs de production. D'après *Fayaud et al.*, (2012).

Associations	Objectifs de production	Types d'associations
Blé-Pois Orge-Pois Triticale-Féverole Blé-Lupin Pois-Cameline	Gains de rendements / culture pures Production de grains riches en protéines sans les facteurs limitants rencontrés en culture pure. Récolte en fourrage : production de grains de céréale avec moins d'intrants Récolte en fourrage : production d'une biomasse élevée riche en fibre et en azote, avec peu d'intrants	Association de 2 espèces semées et récoltées ensemble en grain ou en fourrage
Colza-Lentille Carotte porte graine - Trèfle Carotte porte graine - Pois Carotte porte graine - Lentille	Réduire les intrants azotés sur la culture principale	Association de 2 espèces semées en même temps, mais la légumineuse n'est pas récoltée (plante de service) (destruction par le gel ou mécanique)
Blé-trèfle blanc	Couverture du sol après la récolte de la culture principale, réduction de la lixiviation.	Association en « relais » (Fabacée pérenne semée dans un couvert annuel)

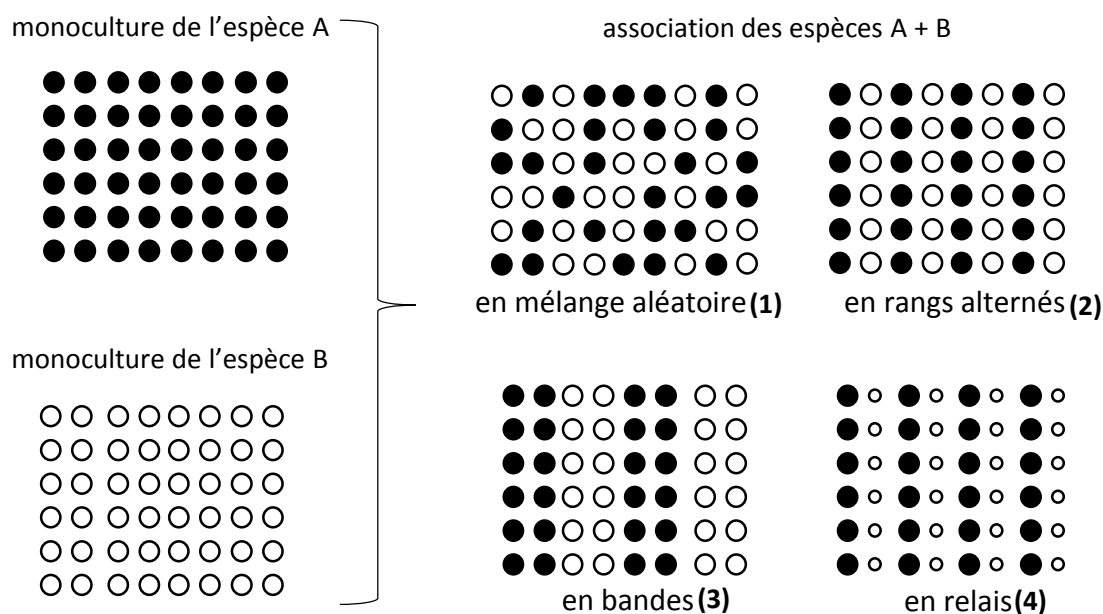


Figure 11: Représentation schématique de différents arrangements spatiaux utilisés en cultures associées. Quatre types d'arrangements spatiaux peuvent être distingués : **(1)** l'association **en mélange aléatoire**, où les espèces A et B sont totalement mélangées dans l'espace disponible sans aucun rang distinct ; **(2)** l'association **en rangs alternés** qui consiste à semer les différentes espèces A et B sur des rangs séparés qui s'alternent dans l'espace, l'association peut se faire aussi sur le même rang et consiste à semer les différentes espèces associées en alternance sur chaque rang ; **(3)** l'association **en bandes** où plusieurs rangs de l'espèce A s'alternent dans l'espace avec plusieurs rangs de l'espèce B ; **(4)** l'association **en relais** où l'espèce B est semée dans une culture de l'espèce A déjà implantée. D'après *Vandermeer*, 1989.

- **Les associations en bandes** (« *strip intercropping* ») : Plusieurs rangs de chaque espèce de l'association s'alternent dans l'espace.
- **Les associations en relais** (« *relay intercropping* ») : Une espèce est semée dans une culture qui est déjà présente.

Selon la densité de semis de l'espèce choisie dans l'association, deux types de **systèmes peuvent être distingués** : le système **additif** ou le système **substitutif**. Dans un **système additif**, une des espèces est semée à la même densité qu'en culture pure ; à celle-ci se rajoute la seconde espèce semée à une certaine densité (De Wit et Van den Bergh, 1965). En l'absence de complémentarité de niche entre les deux espèces, les systèmes additifs augmentent la compétition entre plantes pour un même niveau de ressources. Le système est dit **substitutif**, lorsque la densité de semis d'une espèce est inférieure à la densité de cette espèce en culture pure, la deuxième espèce venant remplacer la première. La densité totale de l'association peut donc être supérieure, égale ou inférieure à celle des cultures pures en fonction des différences de densité entre les cultures pures des espèces. Le dispositif substitutif est plus souvent utilisé lorsque les deux espèces sont récoltées, alors que le dispositif additif est privilégié dans les associations ayant une culture principale et une culture compagne.

II.3. Fixation de l'azote atmosphérique : intérêt majeur dans les performances des cultures associées à base de Fabacées

II.3.1. Fixation symbiotique de l'azote atmosphérique

Les Fabacées présentent des propriétés biologiques spécifiques leur conférant des atouts majeurs dans la conception d'une agriculture durable capable de répondre aux enjeux économiques et environnementaux actuels. En effet, la nutrition azotée des Fabacées est assurée par deux voies complémentaires : l'absorption de l'azote minéral du sol par les racines et la fixation de l'azote atmosphérique (N_2) grâce à une symbiose avec des bactéries présentes dans le sol (des genres *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*) au sein d'excroissances racinaires spécifiques appelées nodosités (ou nodules) (Figures 12 et 13). L'azote atmosphérique (N_2) est réduit en ammoniac (NH_3) par un complexe enzymatique appelé **nitrogénase** (Figure 14), constitué de deux métalloprotéines : la protéine molybdo-ferrique qui est le site de réduction de N_2 ; et la ferro-protéine qui fournit les électrons à la molybdo-ferro protéine. La formation de l'ammoniac s'accompagne toujours de celle d'hydrogène (Figure 14). L'azote ammoniacal est ensuite assimilé, *via* des systèmes enzymatiques présents chez tous les végétaux (principalement le cycle Glutamine synthase (GS)/Glutamine Oxoglutarate AminoTransferease (GOGAT), puis utilisé pour la synthèse des molécules azotées

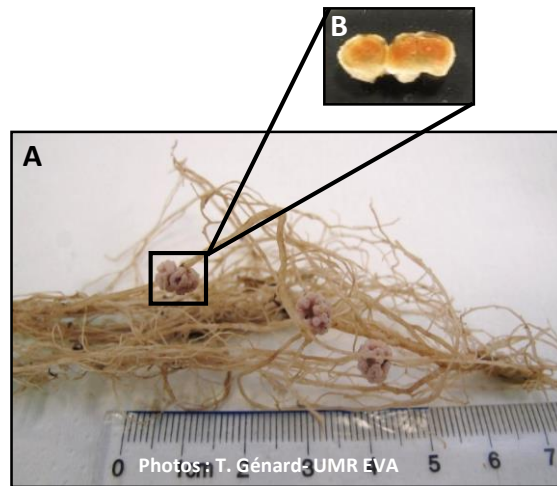


Figure 12 : Photographies des nodosités (A) et d'une coupe transversale de nodule de lupin blanc (B). La couleur rouge est due à la léghémoglobine, hémoprotéine qui présente une structure proche de l'hémoglobine, dont le rôle est de fixer le dioxygène pour protéger la nitrogénase.

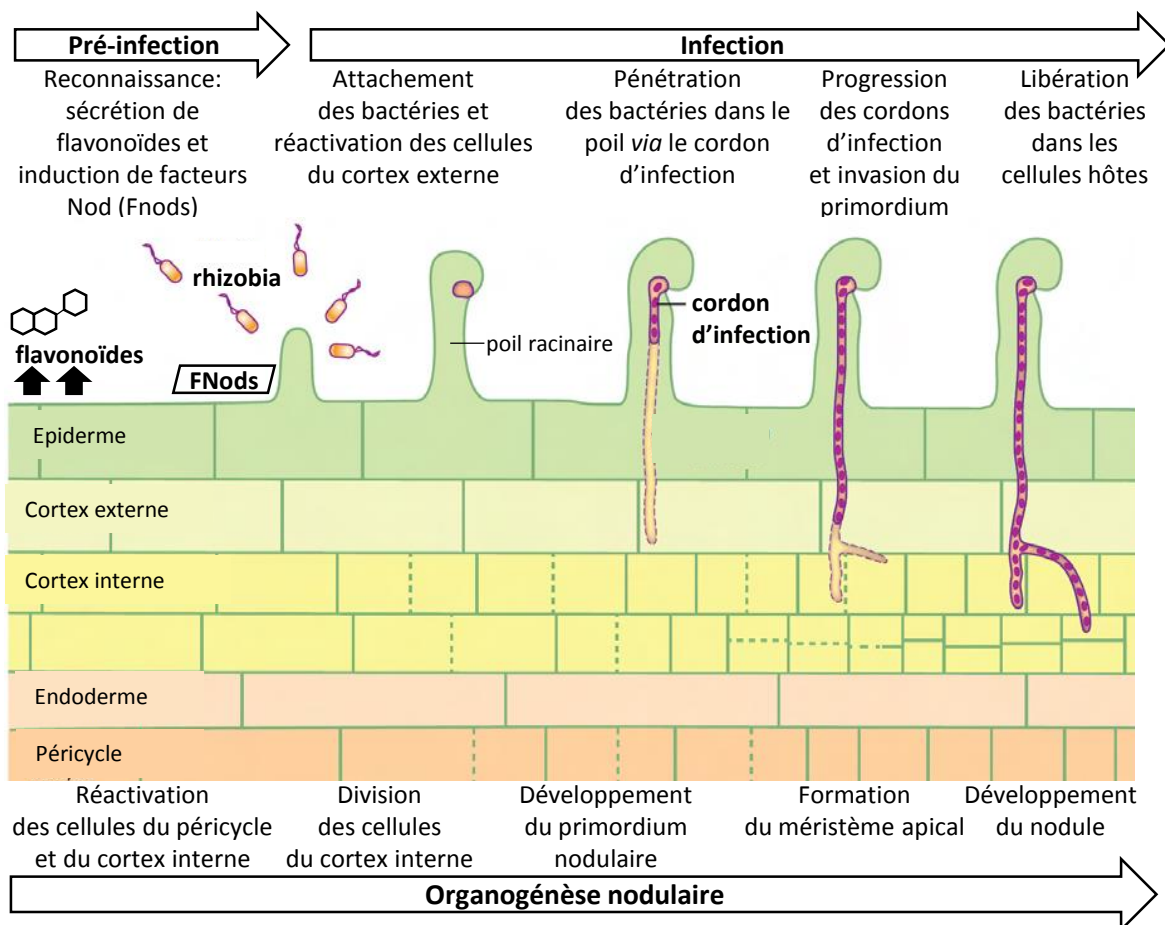


Figure 13 : Schéma des différentes étapes de l'infection racinaire par des bactéries de type *rhizobium* et de l'organogénèse nodulaire. D'après Oldroyd *et al.*, 2011.

nécessaires au métabolisme de la plante (acides aminés, protéines et autres macromolécules comme les acides nucléiques). Une particularité métabolique des Fabacées est la présence d'une hémoprotéine fixatrice de dioxygène, **la leghémoglobine (LegHb)**, très proche de l'hémoglobine qui confère aux nodosités actives une couleur rosée (**Figure 12B**). Dans cette molécule, la partie « globine » est synthétisée par la plante et la partie « hème » par le rhizobium. Cette protéine se trouve dans les nodules racinaires où elle peut représenter jusqu'à 40% des protéines et permet de piéger l'oxygène pour former un milieu anaérobie favorable à la fixation du N₂ par la nitrogénase.

Si les capacités de fixation du N₂ sont fortement dépendantes de la souche bactérienne et de la plante hôte, elles dépendent également de la teneur en azote minéral du sol. Ainsi, une forte disponibilité du sol en azote minéral inhibe l'activité de la nitrogénase et les capacités de fixation du N₂ de la Fabacée. En effet, dans ces conditions, les Fabacées vont d'abord prélever et assimiler l'azote minéral du sol disponible et la fixation symbiotique de N₂ deviendra prépondérante lorsque l'azote minéral deviendra limitant (Corre-hellou *et al.*, 2006a ; Naudin *et al.*, 2010). Cette spécificité qui confère aux Fabacées une autonomie vis-à-vis de la disponibilité en azote du sol et de l'apport d'engrais azotés, joue un rôle clé au sein des cultures associées puisqu'elle constitue une partition de niche pour l'azote lorsqu'une Fabacée est associée à une plante compagne non fixatrice.

Il a été montré que la disponibilité en soufre peut également moduler les capacités de fixation du N₂ (Varin *et al.*, 2010). Ainsi, chez le trèfle, Varin *et al.* (2010), ont mis en évidence qu'une faible disponibilité en soufre diminue l'activité de fixation de N₂ en réduisant le développement des nodules mais également leurs teneurs en nitrogénase et en leghémoglobine. D'autres études ont également montré qu'une faible disponibilité en soufre affectait négativement le développement et le fonctionnement des nodules en réduisant notamment leur contenu en leghémoglobine et en ATP (Singh and Raj, 1988 ; Pacyna, 2005 ; Pacyna *et al.*, 2006). Scherer *et al.* (2006) ont montré que, chez le pois, une fertilisation soufrée optimale sur des sols pauvres en soufre permet une augmentation du nombre et du poids des nodules et stimule l'activité nitrogénase. D'autres auteurs suggèrent, qu'en situation de carence en soufre, la diminution de la fixation de N₂ serait la conséquence de la diminution de l'activité d'autres enzymes, telles que la PhosphoEnolPyruvate Carboxylase (PEP Case), la malate déshydrogénase et la glutamate synthase (Lange, 1998).

Dans les cas des associations graminée-Fabacée, la graminée peut bénéficier directement ou indirectement de l'azote fixé par les Fabacées (Høgh-Jensen, 2006 ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2009). En effet, la graminée ne bénéficie pas directement du N₂ fixé, mais en prélevant l'azote du sol, elle oblige la Fabacée à fixer d'avantage le N₂ atmosphérique pour satisfaire ses besoins laissant ainsi une part plus importante d'azote minéral du sol disponible pour la graminée. On parle de

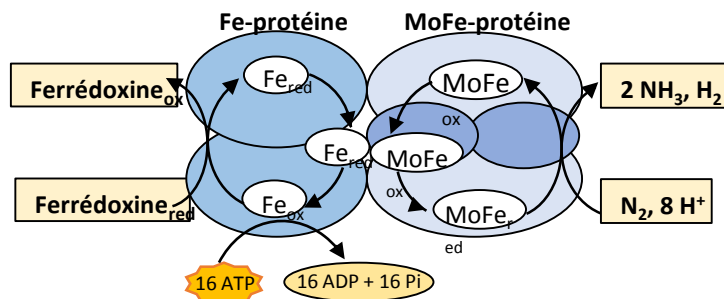


Figure 14 : Réaction catalysée par la nitrogénase.

Ce complexe enzymatique est constitué de deux hétéroprotéines de tailles différentes : La Fe-protéine (64 KDa) est réduite par la ferrédoxine puis la Fe-protéine réduit la Mo-Fe-protéine (245 Kda) qui catalyse la réduction du diazote gazeux (N₂). L'ATP qui provient de la respiration aérobie des bactéroïdes, réagit avec la Fe-protéine réduite et intervient dans le transfert des électrons entre la Fe-protéine et la Mo-Fe-protéine. D'après Hopkins, 2003.

complémentarité de niches pour l'azote. La graminée peut également bénéficier de l'azote fixé par **transfert d'azote** de la Fabacée vers la graminée. Le transfert de la Fabacée en direction de la graminée fait intervenir le processus de rhizodéposition, processus comprenant deux composantes principales: **l'exsudation** par les racines de composés solubles riches en N (acides aminés, protéines) et **la sénescence racinaire** associée à décomposition des tissus morts de la Fabacée (racines, nodosités, feuilles) (Fustec *et al.*, 2010). Ces deux composantes seront détaillées dans la partie III de la synthèse bibliographique.

II.3.2. Complémentarité de niche pour l'azote

Chez les Fabacées, la mise en place des nodules se fait progressivement au cours du cycle de développement (Voisin *et al.*, 2002). Ainsi, au sein de l'association, les céréales et les Fabacées sont en compétition directe au début du cycle de culture pour le prélèvement de l'azote du sol. Pendant cette phase, la céréale est plus compétitive que la Fabacée pour prélever l'azote du sol en raison d'un enracinement plus dense et d'un développement racinaire plus rapide dans les horizons du sol (Hamblin et Tennant, 1987 ; Corre-Hellou *et al.*, 2005). Ce phénomène est accentué par une demande en azote plus élevée et plus précoce de la céréale liée à une vitesse de croissance aérienne plus importante en début de cycle (Corre-Hellou *et al.*, 2007). La céréale absorbe rapidement l'azote minéral au fur et à mesure de sa minéralisation obligeant la Fabacée à augmenter son activité fixatrice de N₂ afin de satisfaire ses besoins en azote. Les espèces associées deviennent alors complémentaires pour l'utilisation de l'azote provenant des deux sources disponibles (azote minéral du sol et azote atmosphérique), permettant ainsi une meilleure valorisation de l'azote que si elles étaient cultivées séparément. Par exemple, des études ont montré chez le pois (*Pisum sativum* L.) associé au blé (*Triticum aestivum* L.) ou à l'orge (*Hordeum vulgare* L.) une augmentation du pourcentage d'azote issu de la fixation de N₂ atmosphérique (%Ndfa) par rapport au pois en monoculture, passant en moyenne de 60 à 80% (Naudin *et al.*, 2010 ; Bedoussac et Justes, 2010b ; Corre-Hellou *et al.*, 2006a). Par ailleurs, les Fabacées prairiales, qui doivent partager constamment les ressources du sol avec une ou plusieurs espèces non fixatrices, ont des capacités de fixation très élevées, généralement compris entre 80 et 100 % afin d'assurer leur nutrition azotée même en cas de forte fertilisation azotée (Liu *et al.*, 2011 ; Rasmussen *et al.*, 2012). Cette complémentarité dans l'utilisation des ressources azotées liée aux deux pools d'azote exploités (azote du sol et azote atmosphérique) est largement documenté pour les associations graminées-trèfle (Gylfadottir *et al.* 2007 ; Nyfeler *et al.*, 2011 ; Pirhofer-Walzl *et al.*, 2012) et pour les cultures associées céréales-Fabacées (Bedoussac *et al.*, 2010a ; Corre-Hellou *et al.*, 2006a ; Naudin *et al.*, 2010 ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2009).

II.3.3. Transferts d'azote au sein des cultures associées

Des transferts d'azote de la Fabacée vers la plante compagne peuvent compléter l'effet de complémentarité de niche pour améliorer la nutrition azotée et la croissance de la plante compagne (Louarn *et al.*, 2015). Ces transferts proviennent de la rhizodéposition azotée de la Fabacée (Fustec *et al.*, 2010) qui sera détaillée dans la partie III de cette synthèse bibliographique.

Dans le cas des associations prairiales Graminées-Fabacées, les graminées peuvent bénéficier de l'azote des Fabacées associées (Pirhofer-Walzl *et al.*, 2012). La proportion d'azote de la graminée prairiale provenant du transfert des Fabacées pérennes peut atteindre jusqu'à 50 % (Høgh-Jensen et Schjoerring, 2000 ; Oberson *et al.* 2013). Des études montrent qu'environ 20 % de l'azote fixé par le trèfle blanc est mis à disposition du ray-grass anglais, représentant une quantité d'azote de 60 kg par ha et par an, correspondant à 8 à 39 % de l'azote de la graminée (Ledgard, 1991 ; Ledgard et Steele, 1992). Des transferts d'azote ont également été mesurés de la graminée vers le trèfle mais ils représentent une quantité moindre (Gylfadottir *et al.*, 2007). Par ailleurs, d'autres études ont montré qu'au sein des associations pérennes à base de luzerne, ce n'est qu'à partir de la deuxième année de culture que ces transferts participent à la nutrition azotée de la graminée (Tomm *et al.*, 1994 ; Tomm *et al.*, 1995).

Au sein des cultures associées annuelles, le bénéfice des transferts d'azote de la Fabacée vers la Graminée est moins important, du fait que la durée de leur cycle soit plus court pour que les rhizodépôts puissent être décomposés. Cependant, des études de marquage réalisées en conditions contrôlées ont permis de mettre en évidence des transferts d'azote significatifs du pois à l'orge (Jensen, 1996b) ou de la féverole au blé (Xiao *et al.*, 2004). D'autre part, ces transferts augmentent lorsque les racines des deux espèces annuelles sont entremêlées (Jensen, 1996b ; Xiao *et al.*, 2004 ; Brauman *et al.*, 2011). Toutefois, d'autres essais portant sur les associations colza-féverole (Jamont *et al.*, 2013a), ainsi que pour des associations pois-blé dur dans lesquelles les deux espèces annuelles ont été marquées, ont montré que les quantités d'azote transférées de la plante non fixatrice à la Fabacée, et de la Fabacée à la plante non fixatrice sont comparable. Ainsi, dans ce cas, les transferts d'N ne contribuent donc pas significativement à l'amélioration du statut azoté de la plante non fixatrice (Jamont *et al.*, 2013a). Il a également été montré au moyen d'analyses microbiologiques que les transferts ont eu lieu préférentiellement sous forme de NH_4^+ (Brauman *et al.*, 2011).

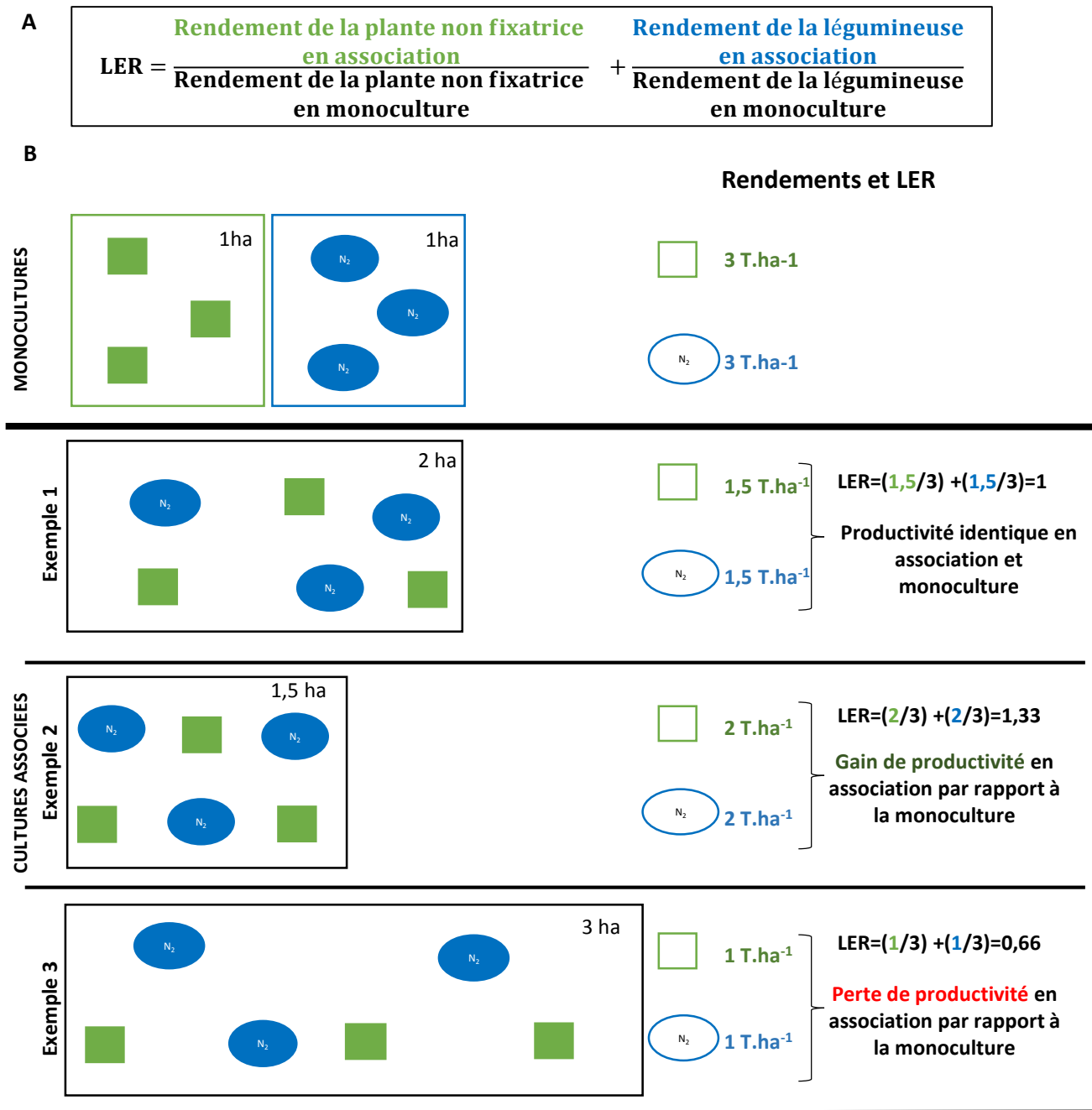


Figure 15: Le « Land Equivalent Ratio » (LER) est utilisé pour évaluer l'efficacité d'une association végétale au cours de son cycle de développement (Dariush *et al.*, 2006). Il est défini comme la surface nécessaire en association pour obtenir la même productivité qu'en monoculture.

A. Calcul du LER permettant d'évaluer la productivité des cultures associées à celle des monocultures.

B. Exemple de calculs de LER pour une culture associant une plante non fixatrice (carré vert) et une plante fixatrice (ovale bleu). Les carrés en vert plein et les ovales en bleu plein représentent 1 tonne de graines produite respectivement par la plante non fixatrice et la plante fixatrice. Pour un nombre de tonnes donné en monoculture (ici $3 + 3 = 6$ tonnes pour 2 ha), le LER rend compte de la surface nécessaire pour obtenir la même productivité en association.

Exemple 1, le LER = 1 indique une surface totale pour produire 6 tonnes de graines en association (2 ha) identique à la surface en monoculture (1 ha + 1 ha = 2 ha). L'association et les monocultures ont donc une productivité identique.

Exemple 2, le LER > 1 indique une surface pour produire les 6 tonnes de graines plus faible en association (1,5 ha) qu'en monoculture (2 ha). L'association permet donc un gain de productivité par rapport aux monocultures.

Exemple 3, le LER < 1 indique une surface pour obtenir une productivité de 6 tonnes de graines plus importante en association (3 ha) qu'en monoculture (2 ha). Il y a donc une perte de productivité de l'association par rapport à la monoculture.

II.4. Intérêts agro-environnementaux des associations à base de Fabacées

II.4.1. Impact sur la production et la qualité

Dans les systèmes de production à bas niveaux d'intrants, les cultures associées permettent de maintenir voire d'augmenter les rendements (Halam *et al.*, 2001 ; Malézieux *et al.*, 2009). Les Fabacées permettent également d'améliorer la qualité protéique des produits récoltés et notamment la teneur en protéines des grains de la céréale (Jensen, 1996a ; Corre-Hellou, 2005 ; Li *et al.*, 2009 ; Malézieux *et al.*, 2009). A titre d'exemple, en conditions de faible intrants azotés, Bedoussac *et al.*, (2010a) ont observé comparativement aux grains de blé cultivé en monoculture, une augmentation de 1,6% de la teneur en protéines des grains de blé associé au pois. Ces avantages en termes de rendement et de qualité des produits récoltés sont attribués principalement à la complémentarité de niche des deux espèces dans l'utilisation de ressources azotées (De Wit, 1960 ; Trenbath, 1976). En association, la disponibilité en azote minéral pour la céréale est plus importante et mieux ajustée aux besoins de celle-ci, du fait d'une part, d'une densité moindre de la céréale en association par rapport à sa culture pure (dans le cas des systèmes substitutifs), et d'autre part, de la faible quantité d'azote minéral prélevée dans le sol par la Fabacée compensée par une capacité de fixation symbiotique élevée. Ainsi, l'accumulation d'azote par une association céréale-pois est en moyenne 30% supérieure à celle obtenue en culture pure (Corre-Hellou *et al.*, 2006a). Cette plus grande disponibilité d'azote permet d'accumuler une quantité d'azote remobilisable plus importante dans les tissus végétatifs (feuilles notamment) disponible au moment du remplissage des grains et se traduira par une augmentation de la teneur en protéines de la céréale en association (Ofori et Stern, 1987 ; Jensen, 1996a).

Le Land Equivalent Ratio (LER) est un indicateur largement utilisé pour évaluer la performance relative des cultures associées par rapport aux cultures pures (Figure 15). Il peut être calculé à partir du rendement ou de la quantité de N accumulé dans les parties aériennes. Un LER supérieur à 1 indique une meilleure utilisation des ressources dans l'association par rapport aux cultures pures. Lorsque le LER est calculé à partir de la quantité d'azote accumulé dans les parties aériennes, des valeurs pouvant atteindre 1,5 sont observées pour des situations de faible disponibilité en N minéral dans le cas d'associations orge-pois de printemps et blé tendre-pois d'hiver (Corre-Hellou *et al.*, 2006a). Ceci signifie que l'acquisition d'azote par l'association est augmentée de l'ordre de 50% en comparaison avec les cultures pures. Hauggaard-Nielsen et Jensen (2001a) ont montré sur une association orge-pois de printemps, un LER (calculé à partir de la biomasse totale produite ou de la quantité d'azote accumulé dans les parties aériennes) de 1,25 en moyenne, ce qui signifie qu'un hectare d'association a le même rendement que 1,25 hectare de culture pure. Enfin, par comparaison aux systèmes monospécifiques, les associations auraient une

Tableau 3: Mécanismes mis en jeu dans les associations végétales et leurs interactions avec les ravageurs et les maladies. R fait référence aux mécanismes concernant les ravageurs et M ceux concernant les maladies (Corre-Hellou *et al.*, 2014).

Facteurs	Mécanismes
Confusion visuelle (R)	<p>Protection de la plante hôte par des plantes compagnes qui la recouvrent.</p> <p>Certains phytophages sont plus attirés par une couleur particulière ou une texture de végétation uniforme.</p>
Dilution des stimuli (R)	<p>La présence de plantes non-hôtes peut masquer ou diluer les stimuli attractifs émis par la plante hôte.</p> <p>Cela peut provoquer chez le phytophage des perturbations altérant l'orientation de l'insecte et nuisant aux processus de recherche de nourriture et de reproduction.</p> <p>Les insectes se trouvant sur une plante non-hôte pourront quitter la parcelle plus rapidement.</p>
Confusion (R)	<p>Des composés aromatiques de certaines plantes compagnes peuvent altérer les capacités des phytophages à trouver leur plante hôte.</p>
Barrière mécanique (R)(M)	<p>Des plantes compagnes peuvent bloquer ou ralentir la dispersion des phytophages et la propagation des champignons parasites; cela peut aussi être dû au fait que les plantes compagnes sont non hôtes.</p> <p>La nouvelle architecture de l'association peut modifier les modalités de dispersion entre organes d'une plante hôte (par exemple la projection des spores de champignon d'une feuille à l'autre).</p>
Microclimat (R)(M)	<p>Dans les associations végétales, les microhabitats sont plus diversifiés et les insectes peuvent avoir des difficultés pour localiser les endroits où les conditions leurs sont favorables.</p> <p>Les couverts associés peuvent modifier les conditions de température et d'humidité impactant le processus d'infection et le développement de champignons pathogènes.</p>
Facteurs biotiques (R)	<p>Les associations peuvent favoriser la présence de prédateurs et parasitoïdes.</p>
Etat physiologique des tissus (M)	<p>L'architecture des couverts associés et la nouvelle allocation des ressources peuvent modifier l'état physiologique des tissus et leur réceptivité à la maladie (résistance ontogénique).</p>
Effets allélopathiques (M)	<p>Les exsudats racinaires d'une espèce peuvent inhiber la germination des spores et la sporulation de champignons pathogènes du sol.</p>

variabilité interannuelle des rendements inférieure (Willey, 1979a) du fait de leur plus grande résilience face aux stress biotiques et abiotiques (Willey, 1979a ; Jensen, 1996a ; Corre-Hellou *et al.*, 2006a ; Malézieux *et al.*, 2009). Cela peut, en partie expliquer la forte présence des cultures associées dans les pays où des aléas climatiques, tels que la sécheresse, sont fortement présents.

II.4.2. Sensibilité des plantes associées aux ravageurs et aux maladies

Les cultures associées permettent également aux plantes d'être moins sensibles aux **ravageurs** et aux **maladies** comparées à leurs cultures pures (Vandermeer, 1989 ; Trenbath, 1993, Hauggaard-Nielsen et Jensen, 2005 ; Malézieux *et al.*, 2009). Les mécanismes mis en jeu sont nombreux et dépendent des interactions complexes et dynamiques entre les facteurs biologiques, physiques et climatiques rencontrés dans les associations végétales (**Tableau 3**). Par exemple, la luzerne est utilisée comme plante de service dans l'association carotte-luzerne pour lutter contre la mouche de la carotte (Ramërt et Ekbom, 1996). L'association avec des Fabacées sont également bénéfiques pour diminuer le niveau d'infestations fongiques (oïdium, septoriose, rouilles par exemple) des céréales par rapport au niveau observé sur une culture pure de céréales (Corre-Hellou *et al.*, 2006b ; Baccar, 2007 ; Biarnès *et al.*, 2008).

II.4.3. Association et régulation des adventices

Un autre avantage des associations (incluant les Fabacées) réside dans la régulation des **adventices** (Mohler et Liebman, 1987 ; Corre-Hellou *et al.*, 2011 ; Lorin *et al.*, 2015). Une meilleure maîtrise des adventices est observée chez les associations Graminées-Fabacées par rapport à une culture de Fabacée pure, notamment en agriculture biologique (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001b ; Corre-Hellou *et al.*, 2011). L'infestation, réduite d'un facteur 2 à 5 par rapport à la culture pure de Fabacée, n'est en revanche pas différente de celle observée chez la céréale pure (Corre-Hellou *et al.*, 2011). Plusieurs travaux ont en effet montré que les associations céréale-Fabacée sont largement plus compétitives vis-à-vis des adventices que la Fabacée cultivée seule (Bulson *et al.*, 1997 ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001b ; Liebman et Dick, 1993). Ce bénéfice peut s'expliquer par l'utilisation complémentaire dans le temps et dans l'espace des ressources empêchant (ou freinant) le développement des adventices (azote minéral du sol et N₂ atmosphérique, eau, lumière) (Bedoussac et Justes 2010b). Cela est important dans les associations où la Fabacée est utilisée comme plante de couverture (Anil *et al.*, 1998) mais également dans les associations où les deux espèces sont récoltées. De manière générale, la diminution des adventices au sein d'une association est supérieure à celle d'au moins une des deux espèces en culture pure (Liebman et Dick 1993).

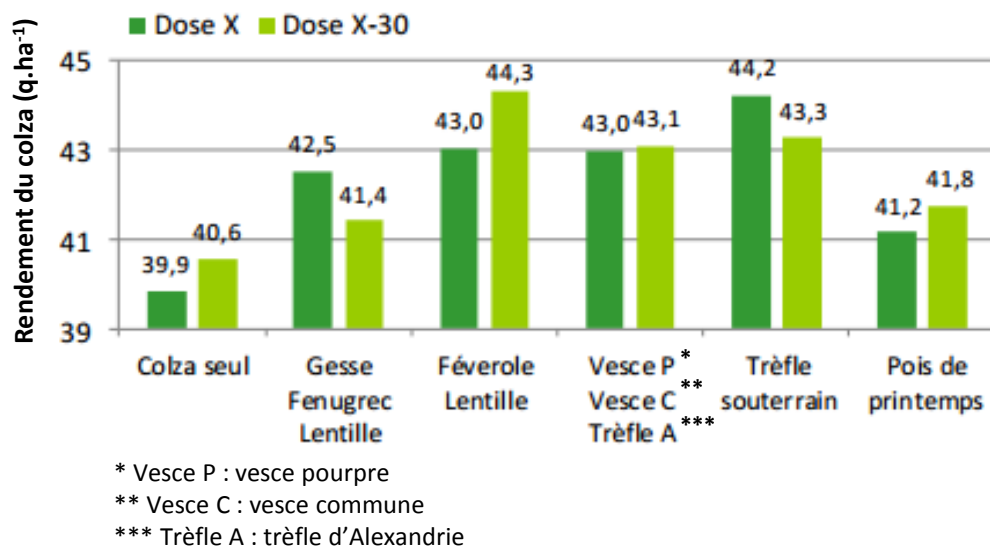


Figure 16: Rendements (q.ha⁻¹) du colza cultivé seul ou en association avec une ou plusieurs Fabacée(s) et fertilisé avec une dose X ou X-30 kg N .ha⁻¹. (Synthèse des résultats de la campagne 2011-2012 réalisée dans le Jura et la Haute-Saône). (Source: Terres Inovia, 2012).

II.5. Etat des connaissances actuelles sur les associations Brassicacée-Fabacée

Récemment, des travaux ont montré l'intérêt des associations Brassicacée-Fabacée jusqu'alors très peu étudiées contrairement aux associations céréale-Fabacée.

II.5.1. Effets de l'association sur la croissance et le rendement des Brassicacées

Depuis 2007, Terres Inovia et l'INRA ont engagé des expérimentations montrant l'intérêt d'associer des Fabacées à caractère gélif (lentille, vesce pourpre, vesce commune, féverole, gesse, fénugrec et trèfle d'Alexandrie) à la culture de colza d'hiver. L'association de plusieurs espèces de Fabacées au colza d'hiver a permis une augmentation de la quantité moyenne d'azote disponible au printemps pour le colza estimée entre 10 et 15 kg N.ha⁻¹ (par rapport à la culture pure de colza) (Cadoux *et al.*, 2015). Ces essais ont également permis d'atteindre un rendement moyen égal à un colza seul tout en réduisant les apports d'azote de 30 kg.ha⁻¹ (**Figure 16**). Cependant, à ce jour, si les bénéfices de l'association d'une Brassicacée et d'une Fabacée semblent bien réels, les processus et les mécanismes sous-jacents (rhizodéposition, amélioration de l'exploration racinaire, minéralisation des résidus aériens et souterrains) restent encore à élucider.

Des travaux de recherche réalisés en conditions de plein champ, portant sur l'association moutarde-Fabacées, n'ont montré aucun effet bénéfique de la présence du pois (*Pisum sativum* L.), de la lentille (*Lens culinaris* L.) ou du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) sur le rendement de la moutarde (*Brassica compestris* Var. Toria) (Banik *et al.*, 2000) mais au contraire, a entraîné une forte diminution du rendement de la moutarde associée comparé à la moutarde seule. Waterer *et al.* (1994) ont également montré une diminution du rendement de la moutarde (*Sinapis alba* L. cv. Gisilba) associé au pois (*Pisum sativum* L. cv. Century) et n'ont détecté aucun transfert d'azote entre la Fabacée et la moutarde.

En revanche, des travaux récents réalisés en rhizotrons en système substitutif ont montré des effets bénéfiques de la féverole sur la croissance du colza en condition de faibles intrants azotés (Jamont *et al.*, 2013a). La féverole a permis une augmentation de la biomasse (+30%) et de la quantité d'azote (+20%) du colza comparé sa monoculture. Ce bénéfice s'explique par la complémentarité de niches racinaires des deux espèces permettant la prospection d'horizons de sol différents et un partage des ressources azotées du sol. En effet, en fin de culture, 64% des racines de la féverole se situaient dans la partie supérieure du rhizotrons alors que 70% des racines de colza se situaient dans la partie inférieure. De plus, la faible disponibilité d'azote présent dans le sol, a entraîné une augmentation de la fixation de l'azote de la féverole et a permis d'améliorer le partage des ressources d'azote dans le sol entre le colza et la Fabacée. Par ailleurs, un transfert d'azote a été observé de la féverole vers le colza (0,6 mg.plant⁻¹) *via* la méthode de « cotton-wick » et d'un marquage au ¹⁵N (Jamont *et al.*, 2013a). Cortés-Mora *et al.*, (2012) ont également observé

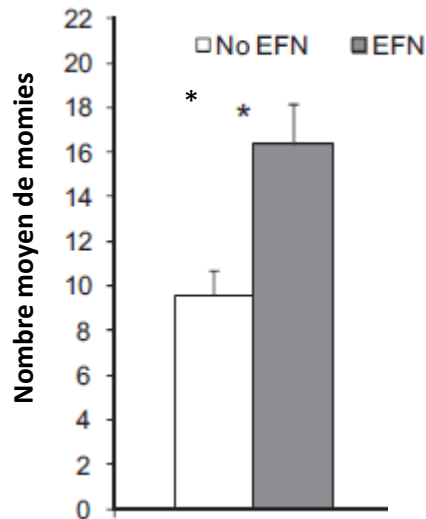


Figure 17: Nombre moyen (\pm erreur standard) de momies de pucerons cendrés dans l'expérimentation d'attraction avec ou sans nectar extrafloral (EFN). Un astérisque indique une différence significative entre les traitements ($p < 0,05$). D'après Jamont *et al.*, (2014).

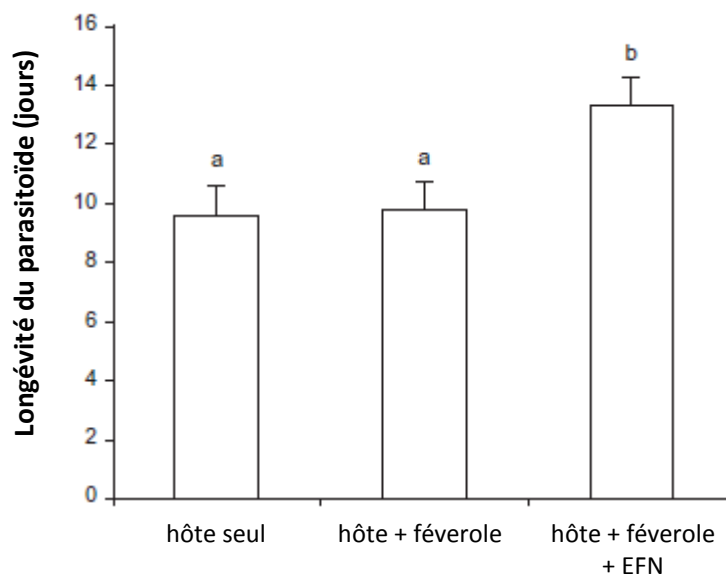


Figure 18: Longévité en jours (\pm erreur standard) du parasitoïde *Diaeretiella Rapae* ayant infesté : *Brassica napus* (hôte seul), *Brassica napus* associé à la féverole sans nectar extrafloral (hôte + féverole), et *Brassica napus* associé à la féverole avec du nectar extrafloral (EFN) (hôte + féverole + EFN). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements ($p < 0,05$; test Glm). D'après Jamont *et al.*, (2013b).

une complémentarité de niches racinaires dans le partage des ressources azotées du sol, entre le colza (*Brassica napus* L. cv. « Licapo ») et la féverole (*Vicia Faba* L. ssp. *Minor* cv. « Gloria ») et le chou (*Brassica oleracea* L. cv. « Proteor ») et la vesce (*Vicia sativa* L. cv. « Pepite »), avec pour conséquence une augmentation du rendement et du contenu en azote des Brassicacées associées aux Fabacées en système substitutif.

II.5.2. Effets de l'association sur les insectes ravageurs du colza

Jamont *et al.* (2014) ont montré que l'association de la féverole (*Vicia Faba* L. ssp. *Minor* cv Divine) avec un colza (*Brassica napus* L.) augmente significativement le nombre de momies de pucerons cendrés (pucerons colonisant le colza) comparé au colza pur ou au colza associé à une féverole ne produisant pas de nectar extrafloral (Figure 17). Ce nectar, produit par les stipules d'une variété de féverole, produit des ressources sucrées qui permettent d'augmenter la longévité et la période d'oviposition des femelles d'un parasitoïde (*Diaeretiella rapae*) du puceron cendré (Figure 18) (Jamont *et al.*, 2013b). Par ailleurs, des réductions significatives des dommages engendrés par deux insectes d'automne, le charançon du bourgeon terminal (*Ceutorhynchus picitarsis*) et l'altise, ont été observées sur des plants de colza associés à des Fabacées (dont la féverole) (Cadoux *et al.*, 2014). Les hypothèses d'explication font appel à un effet direct de perturbation des insectes par les couverts associés (dilution ou barrière du colza, perturbation visuelle ou olfactive).

II.5.3. Effets de l'association Fabacée-Brassicacée sur les adventices

Des essais menés par Terres Inovia ont permis de dégager des résultats intéressants sur la gestion des adventices. Une couverture homogène et rapide du sol par le colza et les Fabacées permet une bonne maîtrise des adventices dicotylédones mais pas des graminées en entrée d'hiver en cas de pression modérée des adventices (Landé *et al.*, 2013 ; Cadoux *et al.*, 2014 ; Valantin-Morison *et al.*, 2014). Cet effet est surtout observé à partir d'une biomasse totale du couvert (colza + Fabacées) de 1,5 kg.m⁻² de biomasse qui assure une compétition pour la lumière et l'eau vis-à-vis des adventices limitant ainsi leur développement. La présence des Fabacées a ainsi permis de limiter l'usage des herbicides. Lorin *et al.*, (2015) a montré que la présence de Fabacées gélives (*Vicia faba*, cv. Espresso, *Pisum sativum*, cv. Rif, *Trifolium alexandrium*, cv. Tigri, *Vicia sativa*, cv. Marianna) diminue significativement les adventices de 20 à 30%.

Tableau 4: Description des principales techniques d'implantation de colza associé et de leurs avantages et inconvénients. Le surcoût de ces techniques d'implantation est calculé par rapport à une culture pure de colza (Source: Terres Inovia, 2012).

	Description	Avantages	Inconvénients	Surcoût	Taille des graines
Semis en mélange	Mélange du colza et des couverts dans la trémie du semoir à céréales.	- Pas de passage supplémentaire. - Diminution des risques d'assèchement du sol.	- Incompatible avec un semis au semoir monograine. - Problèmes de répartition si mélange de graines de tailles différentes. - Risque de concurrence entre le colza et le couvert (positionnées sur la même ligne de semis). - Moins bonne concurrence vis-à-vis des adventices.	0 €/ha	Petites
	Semis en 1 passage, colza et couverts dans 2 compartiments différents.	- Pas de passage supplémentaire. - Diminution des risques d'assèchement du sol. - Diminution des risques de tri entre colza et couvert. - Possibilité de positionner les semences à des profondeurs différentes.	- Incompatible avec un semis au semoir monograine. - Nécessite d'avoir l'équipement adapté : semoir à céréales avec 2 compartiments.	0 €/ha	Indifférent
Semis séparé (3 techniques)	Semis en 2 passages, couvert au semoir à céréales, colza au semoir monograine.	- Diminution des risques de tri entre colza et couvert. - Possibilité de positionner les semences à des profondeurs différentes. - Diminution du risque de concurrence entre colza et couvert sur la ligne de semis.	- 1 passage supplémentaire (surcoût et augmentation du temps de travail). - Risque accru de mise en germination d'adventices.	50 €/ha	Indifférent
	Semis en 2 passages, couvert au semoir type 'delimbe', colza au semoir monograine.	- Possibilité de semer le couvert en même temps que le dernier travail du sol. - Diminution des risques de tri entre colza et couvert. - Possibilité de positionner les semences à des profondeurs différentes. - Diminution du risque de concurrence entre colza et couvert sur la ligne de semis.	- Répartition aléatoire des semences. - Incompatible avec des couverts à grosse graine type féverole ou pois.	10 €/ha	Petites



Figure 19: Arbre de décision pour l'association colza-Fabacées permettant de choisir les caractéristiques des légumineuses en fonction des bénéfiques recherchés. Le numéro en bout de ligne renvoie à un tableau (Tableau 6) donnant pour chaque objectif des exemples de couvert pouvant être implantés. La liste n'est pas exhaustive et ne reprend que les couverts testés lors de 3 années d'essais (2009 à 2012) réalisés par Terres Inovia (Source : Terres Inovia, 2012).

II.5.4. Les associations Fabacées-Brassicacées : méthodes d'implantation

Actuellement, Terres Inovia teste différentes méthodes d'implantation (sol profond ou superficiel et de semis (semi classique, semi-direct, simultané ou non) pouvant influencer l'enracinement du pivot du colza. Ces méthodes dépendent du type de semoir utilisé (semoir à céréales ou semoir monograine) et de la taille des graines des Fabacées. Afin d'éviter une stratification des graines dans les semoirs, il est nécessaire de sélectionner des Fabacées avec une taille et/ou une forme de graines unique ou au minimum avec trois tailles et/ou formes de graines différentes (**Tableau 4**). Terres Inovia a également mis en place un arbre décisionnel permettant de choisir les caractéristiques des Fabacées à planter en fonction des bénéfices attendus (**Figure 19 ; Tableau 5**). Des mélanges de Fabacées à associer avec du colza sont déjà commercialisés par différents semenciers et sont utilisés notamment en agriculture biologique (**Tableau 6**).

L'association de Fabacées compagnes au colza d'hiver laisse donc entrevoir de belles perspectives d'avenir pour réduire les intrants azotés, sans impacter le rendement. Par ailleurs, compte-tenu des éléments présentés ci-avant, il peut également être suggéré que l'association avec les Fabacées puisse apporter d'autres bénéfices au système de culture tel que la diminution des adventices, des maladies ou des ravageurs. Cependant les études réalisées étant récentes et peu nombreuses, il est nécessaire de confirmer et mettre en place d'autres expérimentations afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces associations et mieux appréhender les mécanismes physiologiques sous-jacents.

III. Les différentes voies et méthodes d'estimation du transfert d'azote au sein des associations

L'azote fixé par les Fabacées peut être utilisé par les plantes voisines à travers plusieurs voies de transfert (**Tableau 7 ; Peoples *et al.*, 2015**). Le transfert d'azote peut se faire après décomposition, dégradation, puis minéralisation de la litière par les microorganismes du sol. L'essentiel du transfert de l'azote à partir des Fabacées se situe au niveau souterrain par **transfert direct** et/ou **indirect**. Le transfert d'azote peut s'effectuer directement d'un système racinaire à l'autre par l'intermédiaire des filaments de champignons mycorhiziens (Francis and Read, 1984 ; Bethlenfalway *et al.*, 1991 ; Johansen and Jensen, 1996). L'azote peut également être transféré indirectement de la plante « donneuse » vers le sol, puis du sol vers la plante « receveuse » (Høgh-jensen and Shjoerring, 2001).

Tableau 5: Liste non exhaustive des mélanges de Fabacées testées qui peuvent être faits en fonction de l'objectifs recherché (azote, couverture) (Source : Terres Inovia, 2012).

Code Clé	Objectif	Couverts possibles	Semis (kg.ha ⁻¹)
I	azote	féverole	115
		lentille	25-30
		lentille/féverole	15/70
		luzerne annuelle	3 à 5
		trèfle d'Alexandrie	15
		mélanges commerciaux	35 à 30
II	couverture	lentille	25
		luzerne annuelle	3 à 5
		trèfle d'Alexandrie	15
		fenugrec	25
		lentille/fénugrec	15/12
		mélanges commerciaux	25 à 30
III	azote et couverture	lentille/féverole	15/70
		trèfle d'Alexandrie/luzerne annuelle	10/3
		luzerne annuelle	3 à 5
		trèfle d'Alexandrie	15
		lentille/fénugrec	15/12
		mélanges commerciaux	25 à 30
IV	hauteur et couverture	lentille	25
		trèfle d'Alexandrie/luzerne annuelle	10/3
		lentille/féverole	15/70
		luzerne annuelle	3 à 5
		lentille/cameline	20/1
		lentille/féverole/sarrasin	15/60/20
		lentille/cameline	20/1
		mélanges commerciaux	25 à 30
V	azote, hauteur et couverture	lentille/féverole	15/70
		lentille/féverole/sarrasin	15/60/20
		lentille/cameline	20/1
		lentille/fénugrec	15/12
		mélanges commerciaux	25 à 30

III.1. Transfert direct de l'azote

Une partie de l'azote libéré dans la rhizosphère peut être transportée directement de la plante donneuse vers la plante receveuse par l'intermédiaire des **filaments de champignons ectomycorhiziens** (pour les ligneux) ou **endomycorhiziens** (pour les herbacées) colonisant la plupart des plantes et qui les relient entre elles (Francis and Read, 1984 ; Bethlenfalway *et al.*, 1991 ; Frey and Schüepp 1992 ; Stern 1993 ; Johansen and Jensen, 1996). Cependant, ce type de transfert ne peut pas avoir lieu chez les plantes appartenant à la famille des Brassicacées, puisque celles-ci ne sont pas mycorrhizées.

III.2. Transfert indirect de l'azote

L'azote peut être également transféré indirectement de la plante « donneuse » fixatrice de N₂ vers la plante « receveuse » non fixatrice en passant par le compartiment sol (Høgh-jensen and Shjoerring, 2001). D'après Hamel (1991a), ce transfert apparaît être le mécanisme principal de transfert d'azote entre les plantes, même quand celles-ci sont mycorrhizées. Dans ce cas, ce transfert implique la libération dans le sol de composés azotés par les racines des Fabacées, appelé **rhizodéposition**, puis l'absorption de cet azote par la plante compagne (Elgersma *et al.*, 2000 ; Paynel *et al.*, 2001 ; Høgh-jensen, 2006).

III.2.1. La rhizodéposition

La rhizodéposition au sens large désigne la libération par les racines de composés carbonés et/ou azotés dans le sol (Fustec *et al.*, 2010). Les différents mécanismes par lesquels les rhizodépôts majeurs sont libérés sont multiples : sécrétion de mucilage, desquamation des cellules de la coiffe racinaire, sénescence et décomposition des racines et des nodosités, et exsudation de composés solubles par les racines. Cependant, chez la plupart de végétaux, l'azote rhizodéposé provient majoritairement de la sénescence des racines et des nodules, et de l'exsudation racinaire. Les principaux composés azotés exsudés par les racines de Fabacées sont l'ammonium, les acides aminés et les uréides, mais il existe également une grande diversité d'autres composés azotés. La part d'azote rhizodéposé *via* l'exsudation racinaire est variable selon les espèces puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20 % de l'azote rhizodéposé pour le trèfle blanc et moins de 5 % pour la luzerne (Tableau 8).

III.2.1.1. Sénescence des racines et des nodules

Une partie des transferts d'azote est liée à la minéralisation de rhizodépôts et plus largement des tissus racinaires sénescents depuis l'installation du couvert végétal. La sénescence est un processus génétiquement contrôlé, résultant de la succession d'évènements biochimiques

Tableau 6: Mélanges de Fabacées à associer au colza commercialisés et doses à utiliser (Source : Terres Inovia, 2012).

Semenciers	Noms commerciaux	Fabacées	Semis (Kg.ha ⁻¹)	peuplement souhaitable (plante/m ²)
 <small>La nouvelle dynamique des semences</small>	COLZA-FIX Duo FL	fénugrec + lentille fourragère noire	18	15-20 50-70
	COLZA-FIX Trio GFL	gesse + fénugrec + lentille fourragère noire	22	15-20 50-70 50-70
	COLZA-FIX Quatro GFLV	gesse + fénugrec + lentille fourragère noire + vesce commune de printemps(KWARTA)	25	
	JD	vesce commune (Nacre) + vesce pourpre (Bingo) + trèfle d'Alexandrie (Tabor)	15 à 25	20-30 60-100
		féverole + vesce commune + vesce pourpre + trèfle d'alexandrie	50 + 10 à 12	10-15 10-15 30-50
	SYMBIO. LFA COUV	lentille + fénugrec + trèfle d'Alexandrie	15	
	SYMBIO. GLA COUV	gesse + lentille + trèfle d'Alexandrie	15	5 15-25 40-50
	SYMBIO. LTV COUV	lentille + trèfle violet	15	
	Geovert oleo	fénugrec + trèfle d'Alexandrie + vesce commune	18 à 20	
	Geovert oleo AC	fénugrec + trèfle d'Alexandrie + vesce commune + lentille	20 à 22	
	MICA COLZA	lentille + vesce commune + vesce pourpre	15 à 20	20-25 15-20
	Naturextra colza SV	lentille + trèfle d'Alexandrie	15 à 20	30 100
	Naturextra colza	vesce commune (caravelle) + lentille + trèfle d'alexandrie	25	20-25 20 60

et physiologiques coordonnés aux niveaux cellulaire et tissulaire qui se traduisent par la mort des cellules d'un organe de la plante. Plusieurs études ont montré que la sénescence des nodules et des racines chez les Fabacées est un processus continu et constitue l'une des principales sources d'azote libéré dans le sol (Lory *et al.* 1992 ; Dubach et Russelle, 1994; Russelle *et al.*, 1994 ; Jensen 1996a, Johansen et Jensen, 1996 ; Høgh-Jensen et Schjoerring, 2001). Cependant, peu de données quantitatives existent en raison des difficultés méthodologiques pour distinguer la rhizodéposition provenant de la sénescence des tissus souterrains ou provenant de l'exsudation racinaire. Des différences significatives entre espèces interviennent du fait qu'elles dépendent de la dynamique de croissance des racines et de la composition des litières et des rhizodépôts produits (Louarn *et al.*, 2015). Par exemple, la sénescence des racines et des nodosités se fait en quelques mois pour le trèfle blanc contre une année pour la luzerne. Dubach et Russelle (1994) ont évalué en comparant l'accumulation du $^{15}\text{N}_2$ fixé dans les racines, les nodules de la luzerne (*Medicago sativa* L.) et du lotier (*Lotus corniculatus* L.) ainsi que dans le sol, que la quantité d'azote libérée dans le sol provient majoritairement de la sénescence des racines pour la luzerne et de la sénescence des nodules pour le lotier. Certaines études ont montré que la sénescence des tissus racinaires peut être accélérée par la destruction des parties aériennes. A titre d'exemple, Johansen et Jensen (1996) ont constaté que l'orge peut absorber jusqu'à 4% d'azote issu des racines de pois en décomposition, dont les parties aériennes ont été préalablement coupées. Hamel *et al.*, (1991a) a également montré que la sénescence du soja augmentait le transfert d'azote vers le maïs associé.

III.2.1.2. Exsudation des acides aminés et autres composés azotés solubles chez les Fabacées

L'exsudation a d'abord été définie comme la libération (supposée passive) de composés solubles de faible masse moléculaire comme les sucres, les acides organiques et les acides aminés (Rovira *et al.*, 1979 ; Lynch et Whipps, 1990 ; Nguyen, 2003). Cette libération passive est souvent opposée dans la littérature à la sécrétion (ou excrétion), processus actif libérant des composés de haute masse moléculaire (Lynch et Whipps, 1990 ; Walker *et al.*, 2003 ; Bais *et al.*, 2006). Toutefois, l'exsudation racinaire est souvent définie au sens large comme la libération par les racines de composés solubles minéraux ou organiques de faible ou haute masse moléculaire, indépendamment des mécanismes impliqués (Nguyen, 2003).

La composition biochimique et la concentration des exsudats racinaires varient selon l'espèce et le stade de développement. Elles sont influencées par des facteurs biotiques tels que les insectes rhizophages, les bactéries de la rhizosphère, et des champignons mycorhiziens, ainsi que par des facteurs abiotiques tels que la température ou le statut hydrique. L'exsudation de composés azotés apparaît comme un processus essentiel dans l'adaptation des plantes à leur environnement.

Tableau 7 : Mécanismes potentiels de transfert de l'azote provenant des Fabacées aux plantes associées dans les systèmes agricoles. D'après Peoples *et al.*, (2015).

	mécanismes/processus	Vitesse du transfert	Importance du transfert
aériens	Décomposition et minéralisation de résidus sénescents	lent	mineure à court terme majeure à long-terme
	minéralisation des résidus provenant des engrais verts (fumier)	rapide	majeure
	Consommation des parties aériennes par les animaux et rejets par les excréments	rapide (urine)	majeure
	Lixiviat foliaire	rapide	mineure
	Dégagement d'ammoniac des feuilles	rapide	mineure
souterrains	Décomposition et minéralisation de résidus sénescents	rapide (nodules) lent (racines)	majeure
	Exsudation de composés azotés par les nodosités	rapide	majeure (?)
	Transfert par les racines interconnectées <i>via</i> les hyphes mycorrhiziens	rapide	majeure (?)

(?) : indique que l'importance du processus est encore inconnue, ou qu'il n'y a actuellement aucun consensus scientifique.

En effet, la plante exsude des composés qui modifient les caractéristiques physico-chimiques ou biologiques du sol et des signaux en réponse aux modifications de l'environnement, qui vont lui permettre d'interagir avec les micro-organismes du sol et les plantes associées (Seigler, 1996).

Des composés organiques exsudés comme des sucres simples et complexes, des acides aminés, des acides organiques et phénoliques, alcools, polypeptides et protéines, hormones et enzymes, ou des formes minérales telles que NH_4^+ et NO_3^- sont reportés dans la littérature (Grayston *et al.*, 1996 ; Paynel *et al.*, 2001). Chez la plupart des Fabacées, les composés azotés exsudés sont principalement l'ammonium et des acides aminés (Ta *et al.*, 1986 ; Brophy and Heichel, 1989 ; Ofosu-Budu *et al.*, 1990 ; Paynel *et al.*, 2001). Parmi les acides aminés les plus exsudés, on trouve la sérine et la glycine chez le trèfle blanc (26 % des acides aminés exsudés) et la luzerne (Svenningsson *et al.*, 1990 ; Paynel *et al.*, 2001 ; Hertenberger et Wanek, 2004 ; Lesuffleur *et al.*, 2007). La détermination des composantes de l'exsudation de la glycine et de la sérine révèle que les vitesses d'efflux de ces composés par le trèfle sont 25 fois supérieures à celles du ray-grass et que les atomes d'azote de la glycine et de la sérine exsudées par le trèfle provient préférentiellement de la fixation symbiotique. Par ailleurs d'autres études montrent que la nature des principaux acides aminés exsudés diffère tout au long du développement de la plante. En effet, chez le pois, la proportion de certains acides aminés exsudés, tels que l'alanine (mais également l'asparagine et la glutamine dans une moindre mesure) augmente, avec l'âge de la plante (Ta *et al.*, 1986 ; Paynel *et al.*, 2001). D'autres composés azotés tels que les **protéines**, les peptides ou encore les uréides sont également exsudés par les racines. A titre d'exemple, chez le soja, 75% des composés azotés exsudés sont des protéines (Ofosu-Budu *et al.*, 1990). Les lectines, telles que la trifoliine A chez le trèfle blanc et l'hémagglutinine chez le soja, sont des protéines exsudées par les racines impliquées dans les processus de reconnaissance entre la racine de la plante-hôte et la bactérie (*Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sp.) lors de l'établissement de symbioses fixatrices d'azote (Dazzo et Hubbel, 1975 ; Dazzo et Hrabak, 1981). La libération d'enzymes telles que la nitrate réductase a également été observée chez plusieurs espèces (Praveenkumar, 1996). Des uréides sont également libérés de façon non négligeable dans la rhizosphère et représentent entre 5 et 20% des composés azotés exsudés chez le soja ; les quantités exsudées peuvent atteindre jusqu'à 26,5 μg d'azote par plante de soja et par heure. D'autres composés tels que des hormones et des vitamines seraient également libérés passivement (Lynch et Whipps, 1990).

Tableau 8: Rhizodéposition azotée (exprimée en fonction du contenu en azote total de la plante) de différentes Fabacées déterminée par différentes méthodes de marquage. D'après Fustec *et al.*, (2010).

Méthodes de marquage	Marquage	Espèces utilisées	¹⁵ N (%)	N rhizodéposé / N plante (%)	Références bibliographiques
« Cotton-wick »	¹⁵ N-urée	<i>Lupinus angustifolius</i>	81–102	18,5	Russel et Fillery (1996)
		<i>Vicia faba</i>	84,8	13	Mayer <i>et al.</i> (2003)
		<i>Pisum sativum</i>	83,2	12	
		<i>Lupinus albus</i>	84,5	16	Mahieu <i>et al.</i> (2007)
		<i>Pisum sativum</i>	65–85	9,7–11,7	
		<i>Pisum sativum</i>	59–77	32–36	
		<i>Lupinus angustifolius</i>	69–76	35–65	McNeill et Fillery (2008)
« Leaf feeding »	¹⁵ N-urée	<i>Trifolium subterraneum</i>	42–85	10–40	McNeill <i>et al.</i> (1997,1998)
		<i>Ornithopus compressus</i>	64–76	20–57	
		<i>Sesbania rostrata</i>	35	–	Chalk <i>et al.</i> (2002)
		<i>Trifolium repens</i>	–	47	Gylfadóttir <i>et al.</i> (2007)
		<i>Poa pratensis</i>	–	10	
« Split-root »	(¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄	<i>Pisum sativum</i>	–	8–12	Sawatsky et Sopper (1991)
	KNO ₃ - ¹⁵ N	<i>Pisum sativum</i>	–	7	Jensen (1996b,c)
	KNO ₃ - ¹⁵ N	<i>Pisum sativum</i>	10,5	–	Schmidtke (2005a,b)
		<i>Lathyrus sativus</i>	9,2	–	
¹⁵ NO ₃ - ¹⁵ NH ₄	<i>Pisum sativum</i>	14,3 - 27,5	–	Mahieu <i>et al.</i> (2007)	
« Shoot feeding »	¹⁵ N-urée	<i>Vicia faba</i>	90	23,5	Khan <i>et al.</i> (2002a,b)
		<i>Cicer arietinum</i>	76	43,9	
		<i>Vigna radiata</i>	100	16,5	
		<i>Cajanus cajan</i>	102	35,5	
« Stem injection »	¹⁵ N-urée	<i>Sesbania rostrata</i>	–	45	Chalk <i>et al.</i> (2002)
« Adventitious root feeding »	¹⁵ N-urée	<i>Medicago sativa</i>	–	101	Chalk <i>et al.</i> (2002)

III.2.1.3. Localisation et voies de libération de l'exsudation racinaire

L'exsudation se produit majoritairement au niveau des apex et des zones d'élongation racinaire (Whipps et Lynch, 1985 ; Curl et Truelove, 1986). La libération de composés par la racine n'est ni qualitativement, ni quantitativement homogène le long de la racine et varie d'une espèce à l'autre (Lynch et Whipps, 1990 ; Grayston *et al.*, 1996). Par exemple, l'exsudation de glucides a lieu tout au long de la racine (Jones et Darrah, 1994), alors que la libération d'acides aminés et d'acides organiques a lieu préférentiellement dans les zones apicales (Hoffland, 1992 ; Jones et Darrah, 1994). Les exsudats racinaires sont libérés dans la rhizosphère selon trois voies de transport différentes : diffusion plasmalemmique, transport *via* des protéines transmembranaires, ou transport par des vésicules de sécrétion.

III.3. Les différentes méthodes d'estimation du transfert d'azote au sein des associations

Les transferts d'azote et notamment la contribution de la rhizodéposition au pool d'azote du sol au sein des cultures associées sont des processus complexes, difficiles à mesurer, notamment en condition de plein champ (difficulté pour isoler les racines et le sol rhizosphérique). La majorité des expérimentations est donc réalisée en conditions contrôlées. L'utilisation de plusieurs techniques de marquage de l'azote du sol ou de l'azote des Fabacées au ^{15}N (split-root, cotton-wick) a facilité l'étude du transfert d'azote entre les Fabacées et les plantes non fixatrices (pour revue : Chalk, 1996 ; Chalk *et al.*, 2014 ; Peoples *et al.*, 2015). La grande variation des résultats selon la méthode employée, montre la complexité d'étudier et de quantifier ces transferts. Deux approches distinctes peuvent être considérées : (i) l'analyse des variations de l'abondance naturelle du ^{15}N au sein des plantes fixatrices de N_2 et non fixatrices et (ii) le marquage de la plante ou du substrat avec un isotope stable ^{15}N .

III.3.1. Abondance isotopique naturelle de ^{15}N

Le transfert d'azote au sein des associations est estimé en comparant les différences d'abondance naturelle de ^{15}N entre une plante non fixatrice cultivée ou non en présence d'une Fabacée (Rerkasem *et al.*, 1988 ; Ladha *et al.*, 1993 ; Unkovich *et al.*, 1998 ; Maskey *et al.*, 2001) (Tableau 9 ; Peoples *et al.*, 2015). Le principe de cette méthode repose sur le fait qu'une plante fixatrice utilise pour sa nutrition deux sources d'azote différentes: l'azote du sol et l'azote atmosphérique. L'abondance isotopique de l'azote atmosphérique et de l'azote du sol diffère, il est alors possible de calculer la quantité d'azote dérivé de l'atmosphère (**Ndfa**) et la quantité d'azote dérivé du sol (**Ndfs**), en déterminant les abondances isotopiques dans des échantillons de plantes

Tableau 9: Estimation du transfert d'azote provenant de la fixation biologique de N₂ ou de l'azote des légumineuses vers les plantes associées par la méthode d'abondance naturelle isotopique en ¹⁵N. D'après Peoples *et al.*, (2015).

Systèmes cultureaux	Plantes associées	Fabacées	Temps de transfert	Estimation de la quantité de N transféré* x 100 (%)	Références bibliographiques
Grandes cultures	<i>Glycine max</i> (non nodulé)	<i>Glycine max</i>	maturité	17-48 (19-60) ^a	Moyer-Henry <i>et al.</i> (2006)
	<i>Sida spinosa</i>	<i>Arachis hypogaea</i>		0-60 (0-60) ^a	
	<i>Senna obtusifolia</i>		49 jours	0-83 (0-141) ^a	
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Vigna unguiculata</i> / <i>Lupinus albus</i>		17-18	Sakai <i>et al.</i> (2011)
	<i>Avena sativa</i>	<i>Pisum sativum</i>	63 jours	0 (0) ^a	Schipanski et Drinkwater (2012)
	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Trifolium repens</i>	234 jours	28-65	Sun <i>et al.</i> (2012)
Fourrages	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium pratense</i> / <i>Trifolium repens</i>	165 jours	0-9 (0-13) ^a	Høgh-Jensen et Schjoerring (1994)
	<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Trifolium pratense</i>	163 jours	0-91	Schipanski et Drinkwater (2012)
	<i>Poa pratensis</i>	<i>Trifolium pratense</i>	1-2 ans	7-26	Thilakarathna <i>et al.</i> (2012)
	<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium pratense</i> / <i>Trifolium repens</i>	2 ans	(46-60) ^a	Oberson <i>et al.</i> (2013)
	<i>Lolium perenne</i> <i>Phleum pratense</i>	<i>Trifolium pratense</i>	1-2 ans	0-29	Frankow-Lindberg et Dahlin (2013)
	<i>Cichorium intybus</i>			0-11	
Agroforesterie	<i>Coffea arabica</i>	<i>Flemingia macrophylla</i> <i>Leucaena diversifolia</i> <i>Desmodium intortum</i> <i>Calliandra calothyrsus</i> <i>Erythrina abyssinica</i>	1-2 jours	6 5-15 16 négative négative	Snoeck <i>et al.</i> (2000)
	<i>Dichanthium aristatum</i>	<i>Gliricidia sepium</i>	nd 91 jours 182 jours 203 jours	26-35 10-15 31 (57) ^a 33 (62) ^a	Sierra et Nygren (2006) Sierra <i>et al.</i> (2007) Daudin et Sierra (2008) Sierra et Daudin (2010)
	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Inga edulis</i> (feuilles) <i>Inga edulis</i> (tiges) <i>Inga edulis</i> (feuilles) <i>Inga edulis</i> (racines) <i>Inga edulis</i>	Maturité 1 jours	8-25 négative Négative (0) ^a 38 (79) ^a 7 (24) ^a	Nygren et Leblanc (2009) Nygren et Leblanc (2015)

• Exprimée en pourcentage de N dans la plante associée provenant de la fixation de N₂.

^a Les chiffres entre parenthèses correspondent à l'estimation de la quantité d'azote dans les plantes associées issue des Fabacées.

non fixatrices et fixatrices de N₂ cultivées sur le même sol. Cette méthode est principalement utilisée en agroforesterie lorsque les méthodes de marquage au ¹⁵N sont difficilement applicables.

III.3.2. Méthodes de marquage indirect ou direct

Différentes méthodes de marquage au ¹⁵N existent afin d'estimer le transfert d'azote d'une plante fixatrice vers une plante compagne : un marquage indirect *via* le marquage du substrat et un marquage direct de la plante.

III.3.2.1. Marquage du substrat (ou « dilution isotopique »)

Cette méthode, basée sur le marquage du substrat de composés azotés enrichis en isotope ¹⁵N (engrais minéral marqué ou solution nutritive marquée) a été la première méthode de marquage au ¹⁵N développée pour évaluer le transfert de l'azote atmosphérique au sein des cultures associées à base de Fabacées (Vallis *et al.*, 1967). Cette méthode implique deux types de culture, une culture avec la plante compagne non fixatrice seule (témoin ou « plante de référence ») et une culture avec la plante compagne associée à la Fabacée. La plante compagne cultivée seule (témoin) est parfois remplacée par l'association d'une plante compagne et d'une Fabacée non nodulée (donc non fixatrice), permettant de garder la même densité entre le témoin et l'association.

Cette méthode est basée sur plusieurs hypothèses. La première stipule que l'abondance isotopique de la plante de référence et celle du sol sont identiques. La deuxième hypothèse suggère que la Fabacée et la plante compagne non fixatrice explorent le même pool d'azote du sol. Cette méthode suppose également que la plante non fixatrice absorbe la même quantité d'azote provenant du sol, qu'elle soit cultivée seule ou associée à une Fabacée. L'enrichissement en ¹⁵N dans les tissus de la Fabacée est alors dilué par l'azote non marqué provenant de la fixation de N₂. Il en résulte alors que l'enrichissement en ¹⁵N de la plante compagne est plus élevé que l'enrichissement en ¹⁵N de la Fabacée.

Le principal inconvénient de cette méthode est l'hétérogénéité du marquage dans l'espace et dans le temps (Hétier *et al.*, 1986 ; Unkovich and Pate, 2000 ; Khan *et al.*, 2002a). Par ailleurs, lorsque la plante de référence (plante témoin) absorbe plus rapidement l'azote marqué que la plante associée à la Fabacée, son abondance isotopique ¹⁵N sera plus élevée et entraînera une surestimation de la fixation de N₂. Inversement, si la plante fixatrice absorbe plus rapidement l'azote marqué que la plante compagne, la fixation de N₂ sera alors sous-estimée. Néanmoins, cette méthode, utilisable au champ, fait partie des techniques les plus utilisées pour estimer le transfert d'azote entre les Fabacées et les plantes compagnes. De nombreuses études ont utilisé cette

Tableau 10: Estimation du transfert d'azote des Fabacées vers les plantes associées par marquage isotopique au ^{15}N . D'après Chalk *et al.*, (2014).

Plantes associées	Fabacées	Durée du transfert	Estimation de la quantité de N transféré* x 100 (%)	Références Bibliographiques
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	5,5 mois	39	McNeill et Wood (1990a)
<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	5 mois	5-44	Farnham et George (1994)
<i>Brachiaria brizantha</i>	<i>Centrosema hybrid</i> <i>Galactia striata</i> <i>Desmodium ovalifolium</i>	97 jours	9,1-43,8 6,7-30,5 10,6-41,2	Viera-Vargas <i>et al.</i> (1995)
<i>Setaria sphacelata</i>	<i>Gliricidia sepium</i> <i>Leucaena leucocephala</i>	7 mois	2,5-23	Jayasundara <i>et al.</i> (1997)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	1, 2, 3 ans	3, 17, 22	Høgh-Jensen et Schjoerring (1997)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	1, 2, 3 ans	3-8, 19-29, 34-42	Jørgensen <i>et al.</i> (1999)
<i>Brachiaria decumbens</i>	<i>Stylosanthes guianensis</i>	438 jours	39	Trannin <i>et al.</i> (2000)
<i>Rubus sp.</i>	<i>Trifolium repens</i>	7 mois	7,4-15,9 (feuille) 2,5 (fruit)	Ovalle <i>et al.</i> (2008)
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Trifolium subterraneum</i> , <i>Medicago polymorpha</i> <i>Trifolium subterraneum</i> , <i>Trifolium michelianum</i>	5 mois	14-19 (feuille) (7 fruit) 15-20 (feuille) (12 fruit)	Ovalle <i>et al.</i> (2010)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium pratense</i>	3 ans	57 18-32	Dahlin et Stenberg (2010)
<i>Theobroma cacao</i>	<i>Gliricidia sepium</i> , <i>Inga edulis</i>	18 mois	0-81 2-14, 8	Kurppa <i>et al.</i> (2010)
<i>Lolium rigidum</i>	<i>Trifolium alexandrinum</i>	2 ans	0	Giambalvo <i>et al.</i> (2011)

*Estimation de la quantité d'azote dans les plantes associées issue de la fixation de N_2 des Fabacées.

technique afin d'étudier le transfert d'azote, estimé entre 0 et 30 kg N ha⁻¹, au sein des associations céréale-Fabacée (**Tableau 10** ; Chalk, 1996 ; Chalk *et al.*, 2014).

III.3.2.2. Marquage des parties aériennes

Des méthodes de marquage consistent à marquer les parties aériennes (comme les feuilles, la tige ou le pétiole) des plantes fixatrices en continu ou par plusieurs applications par une solution d'urée, de nitrate ou d'ammonium marqué au ¹⁵N (Ledgard *et al.*, 1985). Ces méthodes ont été utilisées en conditions contrôlées (*e.g.* Ledgard *et al.*, 1985 ; Giller *et al.*, 1991 ; McNeill *et al.*, 1998 ; Khan *et al.* 2002a,b) ou en conditions de plein champ (*e.g.* Ledgard *et al.*, 1985 ; McNeill *et al.*, 1997 ; Khan *et al.*, 2003 ; McNeill et Fillery, 2008).

Ils existent différentes techniques pour apporter la solution marquée dans les parties aériennes, comme la **pulvérisation foliaire** ou l'**immersion des feuilles** dans une solution d'urée marquée au ¹⁵N (Jensen, 1996b ; McNeill *et al.*, 1997 ; Khan *et al.*, 2002b). Ces techniques de marquage foliaire doivent être réalisées en conditions contrôlées et confinées afin de faciliter l'absorption du ¹⁵N et d'en limiter les pertes. Cependant, la durée du marquage doit être très courte et l'enrichissement faible (autour de 0,5%), car un contact prolongé peut entraîner la sénescence des feuilles ou l'altération des tissus et ainsi diminuer la pénétration du ¹⁵N. De plus, la répartition du marquage est souvent hétérogène au sein des différents organes entre les parties aériennes et les parties racinaires (Zebarth *et al.*, 1991 ; Khan *et al.*, 2002a,b). De même, une répartition non-uniforme dans le temps est souvent observée avec ces techniques de marquage. Silva *et al.*, (2010) ont notamment montré une diminution exponentielle de l'enrichissement isotopique dans les parties aériennes du soja marquées après un apport foliaire ou caulinaire d'urée (5 mg N ml⁻¹, 99,5 atom % ¹⁵N).

Rochester *et al.*, (1998) ont développé une méthode de marquage au ¹⁵N **du pétiole** de soja avec de l'urée marquée. Le pétiole, qui a été préalablement excisé, est placé pendant 48h dans une fiole en plastique de 4ml contenant de l'urée marquée. Contrairement à l'alimentation foliaire, les plantes tolèrent un plus haut niveau d'enrichissement, et multiplier les applications de marquage permet une répartition uniforme du ¹⁵N dans les plantes (Russell et Fillery, 1996).

De nombreuses études ont utilisé une méthode appelée « **cotton-wick** » dans laquelle une solution d'urée enrichie en ¹⁵N contenue dans une fiole, est absorbée par la plante à travers un fil de coton. Le fil de coton est enfilé par un trou de 0,5 mm situé dans l'entre-nœud juste au-dessous la première feuille (Russell et Fillery, 1996 ; Mayer *et al.*, 2003 ; Wichern *et al.*, 2007 ; Mahieu *et al.*, 2007 ; McNeill et Fillery, 2008). La solution de marquage est injectée par le sommet de la fiole à l'aide d'une seringue, le fil de coton est alors imbibé de solution marquée par capillarité. L'urée

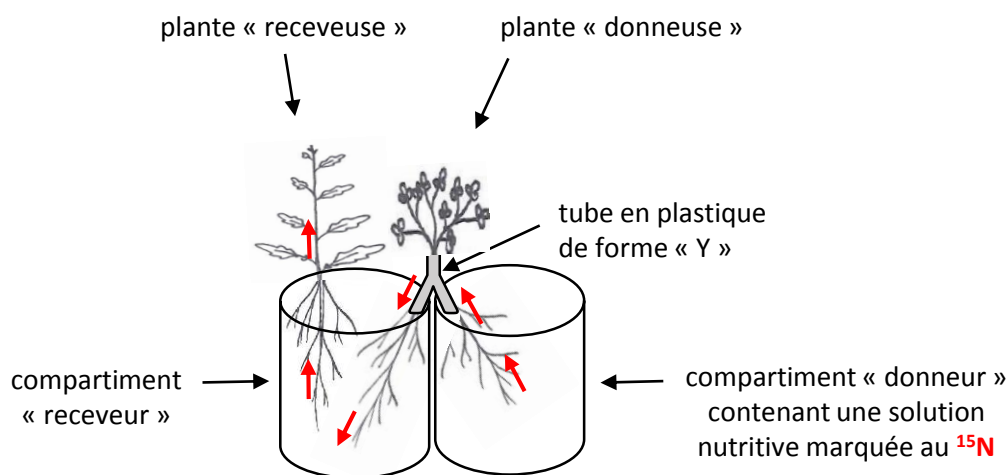


Figure 20 : Dispositif expérimental (appelé « Split-root system») utilisé pour mettre en évidence le transfert d'azote minéral d'une plante « donneuse » vers une plante « receveuse ». Ce dispositif comprend deux compartiments: un compartiment « donneur » contenant une solution marquée au ^{15}N et un compartiment « receveur », où se trouve respectivement le système racinaire des plantes « donneuse » et « receveuse ». Le système racinaire de la légumineuse est séparé en deux avec un tube plastique en forme de « Y »: une moitié des racines est placée dans le compartiment « donneur » (marqué au ^{15}N) et l'autre moitié dans le compartiment « receveur ». Les flèches rouges représentent le transfert du ^{15}N à travers les plantes et les compartiments.

Tableau 11 : Estimation du transfert d'azote des Fabacées vers les plantes associées (non fixatrices) par marquage isotopique au $^{15}\text{N}_2$. D'après Chalk *et al.*, (2014).

Plantes associées	Fabacées	Temps d'exposition au $^{15}\text{N}_2$ en jours (nb de pulses)	Quantité de N transféré x 100 (%)	Références Bibliographiques
<i>Chloris gayana</i>	<i>Macroptilium atropurpureus</i>	13-26 (1)	<0,1-2,3	Ross <i>et al.</i> (1964)
<i>Phleum pratense</i>	<i>Medicago sativa</i>	0,25 (1)	3,0	Ta <i>et al.</i> (1989)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	5 (1)	0	McNeill et Wood (1990b)
<i>Zea mays</i>	<i>Trifolium alexandrinum</i>	5 (10)	4,0-7,6	Frey et Schüepp (1992)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	19 (1)	0,3	McNeill <i>et al.</i> (1994)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	14 (2-4)	$1,7 \pm 0,3$	Carter et Ambus (2006)
<i>Lolium perenne</i>	<i>Trifolium repens</i>	3 (1)	4,0	Lesuffleur <i>et al.</i> (2013)

marquée est alors transportée par les tissus vasculaires de la plante ce qui favorise une distribution uniforme du marquage dans les différents organes aériens et racinaires. Cette méthode permet notamment d'utiliser des concentrations en urée plus fortes (jusqu'à 4 %) par rapport au marquage foliaire (pour lequel les plantes ne tolèrent pas plus de 0,5 % d'urée) et permet un marquage continu (Russell and Fillery, 1996).

III.3.2.3. Marquage des parties racinaires

Le marquage peut se faire également par absorption d'une solution marquée au ^{15}N par le système racinaire, tel que la transplantation ou la méthode de « split-root ».

Les plantes fixatrices sont d'abord cultivées en pot contenant un substrat enrichi en ^{15}N avant d'être **transplantées** dans un autre pot contenant la plante compagne (Hamel *et al.*, 1991a ; Tomm *et al.* 1994). Cependant, la technique la plus utilisée pour marquer le système racinaire est la méthode de « **split-root** » (Wichern *et al.*, 2008). Cette méthode consiste à séparer en deux le système racinaire de la plante dans un tube en plastique de forme « Y » (Lainé *et al.* 1995, Jensen, 1996a,b ; Mahieu *et al.*, 2007). Une moitié des racines est placée dans un compartiment « donneur » où se trouve une solution marquée au ^{15}N et l'autre moitié des racines dans le compartiment « receveur » non marqué contenant également la plante compagne (**Figure 20**). L'avantage de cette méthode est de permettre un marquage continu tout au long du cycle de développement de la plante, du stade jeune au stade mature. Cette méthode présente l'inconvénient de modifier la morphologie du système racinaire, particulièrement pour les plantes à racine pivotante. De plus, elle n'est pas applicable au champ.

III.3.2.4. Marquage de l'azote atmosphérique au $^{15}\text{N}_2$

La méthode consiste à exposer les plantes (plantes de référence et Fabacées) au N_2 atmosphérique marqué au ^{15}N (Ross *et al.*, 1964 ; Rushel *et al.*, 1979 ; McNeill *et al.*, 1994). Elle permet une mesure directe de l' N_2 atmosphérique transféré par les plantes fixatrices. Cette technique consiste à cultiver les plantes dans une chambre hermétique dont l'atmosphère est enrichie en $^{15}\text{N}_2$ dans laquelle l'humidité, la température, la lumière ainsi que les concentrations en N_2 , CO_2 et O_2 peuvent être contrôlés. Les racines sont installées dans un conteneur hermétique pour que le compartiment racinaire soit entièrement isolé (Frey and Schüepp, 1992 ; Voisin *et al.*, 2003 ; Lesuffleur *et al.*, 2013). La plante non fixatrice ne pouvant incorporer le $^{15}\text{N}_2$, le ^{15}N retrouvé dans celle-ci provient du transfert du N_2 atmosphérique de la Fabacée. Cette technique est plus rarement employée en raison de son coût (prix du $^{15}\text{N}_2$ élevé) et de sa difficulté de mise en œuvre (**Tableau 11**). Elle est difficilement applicable au champ en raison des contraintes expérimentales (manipulation du gaz et obligation de travailler en milieu clos).

Objectifs et stratégies de recherche

La synthèse bibliographique met en exergue le bilan agro-environnemental médiocre de la culture de colza principalement dû à l'utilisation intensive d'engrais azotés nécessaires pour obtenir des rendements satisfaisants. Dans ce contexte, il apparaît urgent de développer de nouvelles alternatives permettant de limiter l'utilisation d'intrants (notamment N) tout en maintenant le rendement et la qualité des produits récoltés. Face à ce constat, les associations de cultures à base de Fabacées font aujourd'hui l'objet d'un regain d'intérêt en Europe (Anil *et al.*, 1998 ; Hauggaard-Nielsen et Andersen, 2000 ; Jensen *et al.*, 2003). L'association d'une Fabacée à une culture d'intérêt (comme le colza) pourrait permettre de réduire le niveau d'intrants azotés, une partie de l'azote fixé par les Fabacées pouvant être restitué au sol (minéralisation de la nécromasse et/ou exsudation de composés azotés) et pourvoir à la nutrition azotée du colza. Le recours à ce nouveau type d'associations contribue à une agriculture plus écologique et durable tout en assurant une production suffisante et de qualité (Malézieux *et al.*, 2009 ; Lithourgidis *et al.*, 2011). Si les avantages des associations céréale-Fabacées ont été largement explicités dans la littérature (voir analyse bibliographique) dans les systèmes à bas niveau d'intrants azotés (Willey, 1979b ; Horwith, 1985 ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001b ; Malézieux *et al.*, 2009 ; Bedoussac, 2009 ; Louarn *et al.*, 2010 ; Lithourgidis *et al.*, 2011), il n'en est pas de même pour les associations Brassicacée-Fabacée qui à ce jour n'ont été que peu considérées. Ce type d'association est notamment plus complexe à mettre en œuvre notamment du fait que les deux partenaires présentent une forte exigence en soufre et sont susceptibles d'entrer en compétition pour cette ressource. A titre d'exemple, la disponibilité en soufre conditionne la capacité de fixation de l'azote atmosphérique des Fabacées (Singh et Raj, 1988 ; Pacyna, 2005 ; Pacyna *et al.*, 2006 ; Scherer *et al.*, 2006 ; Tallec *et al.*, 2009 ; Varin *et al.*, 2010), mais également le rendement et la qualité des graines du colza (D'Hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015). Ainsi, la maîtrise de la fertilisation soufrée est un paramètre important à prendre en considération dans les recherches portant sur les associations colza-Fabacées.

Au cours de ce travail doctoral, la stratégie de recherche a consisté à évaluer **l'impact des Fabacées comme plantes compagnes du colza (culture principale) à différents stades de son développement (végétatif et reproducteur) avec pour objectif final de limiter les apports d'intrants azotés tout en maintenant un haut rendement grainier.**

Dans ce cadre, le **premier objectif** de ma thèse (**Chapitre 1**) a été de **cribler en conditions contrôlées, différentes espèces de Fabacées (caractérisées par des architectures racinaires et de l'appareil végétatif aérien contrastées) associées au colza**. Les aspects principaux considérés sont : la capacité de la Fabacée à se développer au sein de l'association, les performances du colza au stade rosette (hauteur, surface foliaire et biomasse) et la nutrition azotée et soufrée des deux plantes associées.

Le **deuxième objectif** (**Chapitre 2**) est **d'évaluer les performances agronomiques des associations colza-vesce, colza-trèfle et colza-lupin en conditions contrôlées et sans fertilisation azotée et soufrée dans deux types de systèmes de cultures (additif et substitutif)** en nous focalisant sur les entrées d'azote dans le système (%Ndfa), la nutrition azotée des espèces et les ressources en azote du sol. En parallèle, la nutrition soufrée des deux plantes a été suivie afin de mieux comprendre les interactions se développant au sein de l'association, les deux partenaires étant exigeants en cet élément.

Le **troisième objectif** (**Chapitre 3**) a consisté à **quantifier le transfert d'azote des Fabacées vers le colza au stade rosette grâce à l'utilisation conjointe d'un dispositif appelé « split-root system»** (permettant de séparer en deux parties le système racinaire et d'alimenter chacune d'elles de manière différentielle) **et d'un marquage continu au ^{15}N** pendant toute la durée de la culture des associations colza-vesce, colza-trèfle et colza-lupin.

Enfin, **le quatrième objectif** (**Chapitre 4**) a pour but d'évaluer, en conditions de plein champ, **les performances agronomiques et environnementales des associations colza-vesce, colza-trèfle et colza-lupin sur un cycle entier de culture**.

Matériel et Méthodes



Tableau 1 : Différentes espèces et variétés des Fabacées utilisées pour le criblage et nom du fournisseur ou du semencier chez lequel les semences ont été obtenues.











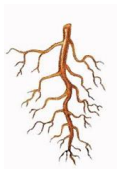

Espèces de Fabacées	variétés ou nom commercial	Fournisseurs ou semenciers
 trèfle incarnat <i>Trifolium incarnatum</i> L.	variété CEGALO	
 vesce commune <i>Vicia sativa</i> L.	variété NACRE	
 lupin blanc <i>Lupinus albus</i> L.	Variété ORUS	
 fenugrec <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	FUNUSOL	
 lentille fourragère <i>Lens culinaris</i> Medik.	FENTILLE	
 gesse fourragère <i>Lathyrus sativus</i> L.	FERTIGESS	
 féverole <i>Vicia faba</i> L.	variété DIVINE	

Tableau 2: Caractéristiques morphologiques des différentes espèces de Fabacées utilisées pour le criblage.

Fabacées	port aérien	recouvrement du sol	système racinaire
féverole <i>Vicia faba</i> L.	dressé	faible	pivotant
fenugrec <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	dressé	faible	
lupin blanc <i>Lupinus albus</i> L.	dressé	faible	
gesse fourragère <i>Lathyrus sativus</i> L.	semi-rampant	moyenne	
vesce commune <i>Vicia sativa</i> L.	semi-rampant	moyenne	fasciculé
lentille fourragère <i>Lens culinaris</i> Medik.	rampant	forte	
trèfle incarnat <i>Trifolium incarnatum</i> L.	dressé	forte	

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

Le **colza d'hiver** (*Brassica napus* L.), variété Bohème, est utilisé pour effectuer les différentes expérimentations. Ce colza est une lignée connue comme étant demi-précoce à la reprise de végétation et précoce à la floraison. Elle est très peu sensible au phoma et à la verse (Source: Syngenta, 2016).

Les espèces de Fabacées utilisées sont : le **trèfle incarnat** (*Trifolium incarnatum* L.), la **féverole** (*Vicia faba* L.), le **lupin blanc** (*Lupinus albus* L.), la **gesse fourragère** (*Lathyrus sativus* L.), le **fénugrec** (*Trigonella foenum-graecum* L.), la **lentille fourragère** (*Lens culinaris* Medik.) et la **vesce commune** (*Vicia sativa* L.) (**Tableau 1**). Ces espèces, qui présentent des traits morphologiques différents, ont été retenues afin de tester leur performance sur la croissance du colza. Les différents traits pris en considération (port aérien, système racinaire et recouvrement du sol) pour sélectionner ces dernières sont présentés dans le **Tableau 2**.

II. Conditions de cultures

II.1. Culture et inoculation des Rhizobia

Dans les expérimentations réalisées en conditions contrôlées décrites chapitre 1, 2 et 3, le sol est inoculé avec les souches spécifiques de rhizobium de chaque Fabacée hôte afin d'induire la formation de nodules fonctionnels (**Tableau 3**). Les souches de rhizobia ont été fournies par Cécile Revellin (UMR 1347 Agroécologie, INRA, Dijon, France) dans des tubes en verre sur gélose inclinée.

Chaque souche bactérienne est cultivée dans des conditions stériles (sous hotte à flux laminaire), sur 100 ml de milieu Bergersen (Bergersen, 1961) modifié par le remplacement de D+ Biotine et de chlorhydrate de thiamine par 0,2 g.L⁻¹ d'extrait de levure et ajusté au pH 6,8 (Louvrier *et al.*, 1995 ; **Tableau 4**), excepté pour la souche de rhizobium du fénugrec (*Trigonella foenum graecum* L.) qui a été cultivé sur milieu de YEM modifié par le remplacement de 100ml d'eau de levure par 2,5 g d'extrait de levure et ajout de 100 mg de CaCO₃ (Vincent *et al.*, 1970 ; **Tableau 5**). En conditions stériles sous une hotte à flux laminaire, la souche est prélevée avec une anse à partir du tube de culture fournie par l'INRA de Dijon. L'anse est ensuite introduite dans un nouveau tube sur gélose inclinée contenant le milieu de culture (Bergersen ou YEM). La souche de rhizobium est ensemencée avec l'anse en effectuant des stries ascendantes régulières sur la surface de la gélose

Tableau 3: Origine des souches de Rhizobia utilisées pour inoculer les Fabacées en conditions contrôlées.

Souche*	Espèce	Plante d'origine	Plante hôte	Référence bibliographique
FH34 (MSDJ0822)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv viciae	<i>Vicia faba</i>	<i>Vicia Faba</i> L.	Amarger (1981)
T354 (MSDJ1056)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv trifolii	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Trifolium incarnatum</i> L.	Mazurier (1989)
P221 (MSDJ0469)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv viciae	<i>Pisum sativum</i>	<i>Lens culinaris</i> Medik., <i>Vicia sativa</i> L., <i>Lathyrus sativus</i> L.	Laguerre <i>et al.</i> (1992)
LL13 (MSDJ718)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lupinus luteus</i>	<i>Lupinus albus</i> L.	Laguerre <i>et al.</i> (1994)
MSDJ3538	<i>Sinorhizobium</i> sp.	<i>Medicago</i> sp.	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Amarger (1980)

* Les souches ont été fournies par Cécile Revellin (UMR 1347 Agroécologie, INRA Dijon).

Tableau 4 : Composition du milieu de culture de Bergersen modifié : D+ Biotine et Chlorhydrate de Thiamine ont été remplacés par 0,20g d'extrait de levure utilisé pour la culture des souches de rhizobia (Bergersen, 1961). Le pH est ajusté à 6,8.

Formule	masse* (g)
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	0,45
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,1
FeCl ₃	0,02
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,05
glutamate de sodium monosodique	1,1
mannitol	10
extrait de levure	0,2
gélose	15

*complétée par 1L d'eau ultrapure.

Tableau 5: Composition du milieu de culture de de YEM (Yeast Mannitol Broth) modifié : L'eau de levure est remplacée par 2,5g d'extrait de levure et l'ajout de 100mg de CaCO₃ utilisé pour la culture de la souche de rhizobium du fénugrec (Vincent, 1970). Le pH est ajusté à 6,8.

Formule	masse* (g)
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Mannitol	10
Extrait de levure	2,5
CaCO ₃	0,1

*complétée par 1L d'eau ultrapure.

inclinée. Le tube est ensuite incubé pendant 48h à 28°C jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance de la souche. Les tubes sont ensuite conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation pour préparer de l'inoculum.

Sous une hotte à flux laminaire, la souche de rhizobium prélevée à l'aide d'une anse en effleurant la surface de la gélose est mise en suspension dans 5 ml d'eau stérile déminéralisée. Cette suspension est ensuite transvasée dans un flacon stérile contenant 90 ml d'eau stérile déminéralisée. Afin de récupérer entièrement la culture, un volume de 5 ml d'eau est à nouveau ajouté dans le tube puis transvasé dans le flacon. Le flacon contenant alors 100 ml d'inoculum est ensuite agité pour homogénéiser la suspension. L'inoculation consiste à apporter 5 ml d'inoculum sur le sol après le repiquage des plantules des Fabacées.

II.2. Cultures en pot (Chapitres 1 et 2)

Les graines de colza et de Fabacées sont mises à germer à l'obscurité pendant une semaine dans un bac contenant de la perlite et de l'eau osmosée. Puis, les plantes sont placées à la lumière naturelle pendant deux semaines. Elles sont ensuite transférées dans des tubes cylindriques en PVC de 15 cm de diamètre et de 50 cm de hauteur reposant sur un réducteur en PVC muni d'un grillage afin de retenir le substrat (**Figure 1**). Chaque tube est rempli avec un mélange de sol et de sable (diamètre 0,8-1,4 mm SIBELCO, Paris, France ; volume/volume : 1/2 pour l'expérimentation décrite dans le chapitre 1 et 1/3 pour les expérimentations décrites chapitres 2 et 3). Les caractéristiques du sol sont présentées dans le **Tableau 6**. Le dispositif expérimental utilisé permet d'appréhender les éventuelles séparations de niches entre espèces et donc, la modulation des phénomènes de compétition et de facilitation au sein de l'association. Les pots contiennent soit deux plantes de la même espèce (monoculture : 2 plantes de colza ou de Fabacées) ou une plante de chaque espèce (association : 1 colza et 1 Fabacée). Pour l'expérimentation décrite dans le chapitre 2, des pots ne contenant qu'une seule plante de colza (monoculture : 1 colza) ont également été utilisés.

Les cultures sont conduites en serre avec une thermopériode est de 20/17°C jour/nuit et une photopériode de 16h jour - 8h nuit. La lumière naturelle est complétée par des lampes sodium haute pression (Philips, MASTER Green Power T400W) délivrant un PAR (Photosynthetically Active Radiation) d'environ 350 $\mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à la surface de la canopée des plantes.

A la fin de la culture (d'une durée de 2 mois pour l'expérimentation décrite dans le chapitre 1 et de 3 mois pour l'expérimentation décrite dans le chapitre 2), les parties aériennes et racinaires de chaque plante sont récoltées séparément puis pesées (biomasse fraîche). Pour l'expérimentation en pot présentée dans le chapitre 2, les feuilles de colza sont récoltées et

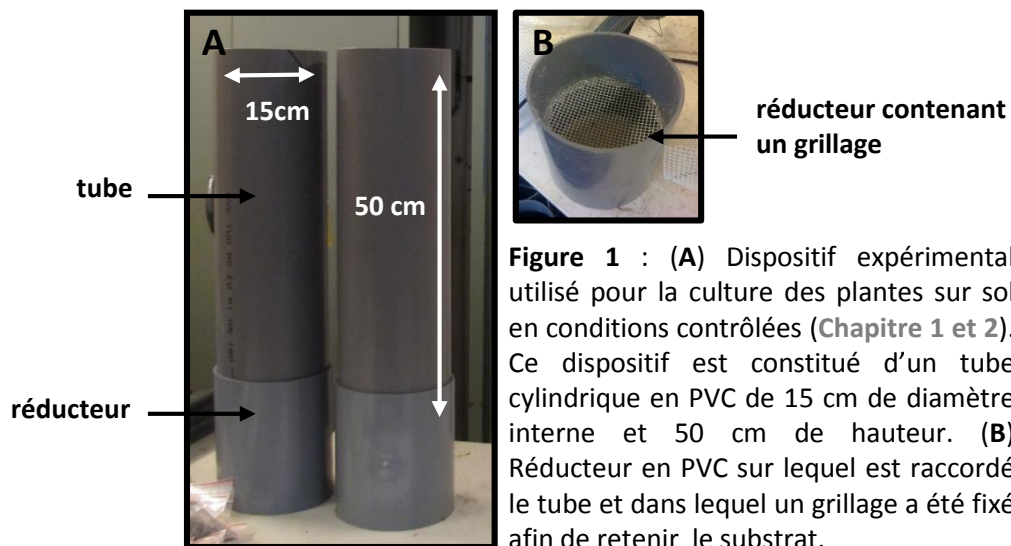


Tableau 6: Caractéristiques principales du sol utilisé pour les cultures réalisées en serre (chapitres 1, 2 et 3). Le sol est issu des parcelles expérimentales de l'INRA du Vieux Pin (commune du Haras du Pin, 61) et provient de l'horizon 20-40 cm. Les analyses du sol ont été réalisées par le laboratoire LANO (Laboratoire Agronomique Normand, Saint-Lô, France).

Caractéristiques du sol		
pH		6,1
texture	limon (%)	41,3
	argile (%)	36,7
matière organique (%)		4,2
azote total (%)		0,32
soufre total (%)		0,1

séparées selon leur rang foliaire. Un échantillon de sol dans le lequel les racines ont été retirées à la loupe binoculaire est prélevé dans chaque pot.

Les différents échantillons (organes et sols) sont ensuite placés à l'étuve à 60°C pendant 48 heures (minimum) puis à nouveau pesées (biomasse sèche). Une fraction des échantillons est ensuite réduite en poudre fine à l'aide d'un broyeur à bille (MM 301 moulin mélangeur RETSCH) avant d'être analysée par spectrométrie de masse afin de déterminer leurs teneurs en azote et soufre total ainsi que leur rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (cf paragraphe IV.2.3).

II.3. Culture en «split-root» (Chapitre 3)

La technique du «split-root», qui consiste à séparer le système racinaire des plantes en deux parties approximativement égales et d'alimenter chacune d'elles de manière différente (solution nutritive marquée au ^{15}N /non marquée, milieu liquide/milieu solide) est utilisée afin d'étudier le transfert d'azote des Fabacées (lupin, trèfle et vesce) (« donneur ») vers le colza (« receveur »).

Les graines de colza et de Fabacées sont mises à germer à l'obscurité pendant une semaine dans un bac contenant de la perlite et de l'eau osmosée. Puis, les plantes sont placées à la lumière naturelle. Lorsque la longueur des racines des Fabacées atteint environ 6 cm, une excision de 1 cm environ à partir de la base de la racine est effectuée afin de stimuler la croissance des racines latérales. Les plantules sont ensuite transférées de nouveau sur perlite et eau osmosée, pour permettre aux racines latérales de se développer. Après deux semaines, les racines des Fabacées sont séparées en deux parties égales (« split root system ») en les plaçant dans un tube en polyéthylène de forme « Y » (diamètre interne : 8mm, longueur de chaque branche : 30 mm) (**Figure 2C** ; Laîné *et al.*, 1994 ; Jensen, 1996b). Une partie des racines est ensuite placée dans le compartiment « donneur » (CD) contenant 4 litres de solution nutritive (**Tableau 7**) et l'autre partie dans le compartiment « receveur » (CR) (**Figures 2A et 2B**) contenant un mélange sol/sable (2,5 kg ; **Tableau 6**). Une plantule de colza est repiquée dans le compartiment CR, à une distance de 6 cm environ de la Fabacée. La solution nutritive du compartiment CD est aérée à l'aide d'un système de bullage alors que le compartiment CR est arrosé avec de la solution nutritive de même composition que celle utilisée dans le compartiment CD mais ne contenant pas d'azote. Des plantules de colza, utilisées comme témoin non marqué, sont repiquées (une par pot) dans un pot contenant les mêmes type et volume de sol que ceux utilisés dans le compartiment CR. Celui-ci est arrosé avec la même solution nutritive que celle utilisée pour arroser le sol contenu dans le compartiment CR.

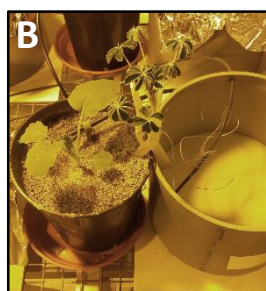
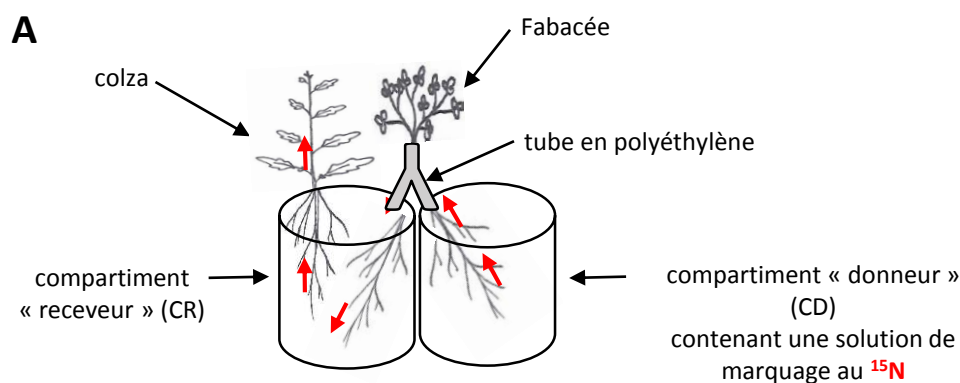


Figure 2 : (A) Dispositif expérimental « split-root » utilisé pour mettre en évidence le transfert d'azote minéral des Fabacée vers le colza. Ce dispositif comprend deux compartiments: un compartiment « donneur » (CD) contenant de la solution nutritive marqué au ^{15}N et un compartiment « receveur » (CR) contenant du sol, où se trouve respectivement

le système racinaire des plantes « donneuse » et « receveuse ». Le système racinaire de la Fabacée est séparé en deux avec un tube en polyéthylène en forme de « Y » : une moitié des racines est placée dans le compartiment CD (marqué au ^{15}N) et l'autre moitié dans le compartiment CR. Les flèches rouges représentent le transfert du ^{15}N à travers les plantes et les compartiments. (B) Photographie du dispositif expérimental « split-root ». (C) Photographie du tube en polyéthylène de forme « Y » permettant la séparation du système racinaire du lupin.

Tableau 7 : Composition de la solution nutritive utilisée dans le compartiment « donneur » de la culture en « split-root » mis en place pour l'étude du transfert d'azote des Fabacées au colza (chapitre 3).

sels	Concentrations (mM)	oligoéléments	Concentrations (μM)
NH_4NO_3	1	H_3BO_3	14
K_2SO_4	1	MnSO_4	5
KH_2PO_4	0,4	ZnSO_4	3
K_2HPO_4	0,15	CuSO_4	0,7
CaCl_2	3	Na_2MoO_4	0,7
MgSO_4	0,5	CoCl_2	0,1
EDTA 2NaFe	0,2		

Deux semaines après avoir transplanté les plantes dans le dispositif expérimental, la solution nutritive contenue dans le compartiment CD est remplacée par une solution nutritive de même composition que la précédente mais contenant 1 mM de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (excès isotopique = 99%). Cette solution nutritive est renouvelée deux fois par semaine.

Comme précédemment, les cultures sont conduites en serre avec une thermopériode de 20/17°C jour/nuit et une photopériode de 16h jour - 8h nuit. La lumière naturelle est complétée avec des lampes sodium haute pression (Philips, MASTER Green Power T400W) délivrant un PAR d'environ $350 \mu\text{moles photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à la surface de la canopée des plantes.

Trois mois après le transfert de plantes dans les compartiments CD et CR, leurs parties racinaires et aériennes sont séparées et récoltées. Les racines des Fabacées présentes dans les compartiments CD et CR sont récoltées séparément. Les racines du colza (compartiment CR) sont séparées minutieusement des racines de la Fabacée. Puis, les racines sont soigneusement rincées à l'eau osmosée. Les échantillons sont ensuite séchés et broyés puis analysés à l'IRMS afin de déterminer leur teneur en N total ainsi que leur rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (cf. paragraphe IV.2.3).

II.4. Cultures en cases lysimétriques (Chapitre 4)

II.4.1. Présentation du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est localisé à Lieury sur la commune de l'Oudon (00°00'34.3"W, 48°59'24.2"N) à 35 km de Caen (14, France). Il est composé de 30 cases lysimétriques (20 cases en résine polyester et 10 cases en acier inoxydable) de 2 m² et de 110 cm de profondeur, disposées de part et d'autre d'une fosse de mesure (**Figure 3**). Chaque case est reliée à son extrémité inférieure à un tuyau en PVC, permettant l'écoulement de l'eau qui a percolé à travers les différents horizons de sol, et débouchant dans la fosse de mesure. Dans cette fosse, des bacs de 100 L sont placés à la sortie de chaque tuyau afin de récupérer l'eau de drainage (**Figure 3C**). Des mesures des volumes drainés ainsi que des prises d'échantillons (100 ml) pour déterminer leurs concentrations en nitrate et en sulfate (cf paragraphe IV.2.2.) sont effectuées toutes les semaines.

II.4.2. Conditions pédoclimatiques

II.4.2.1. Conditions climatiques

Les données climatiques (précipitations et températures, **Figure 4**) sont enregistrées quotidiennement par une station météorologique du Lycée Agricole du Robillard (St Pierre-sur-Dives, 14) située à proximité du site expérimental. Les températures moyennes annuelles

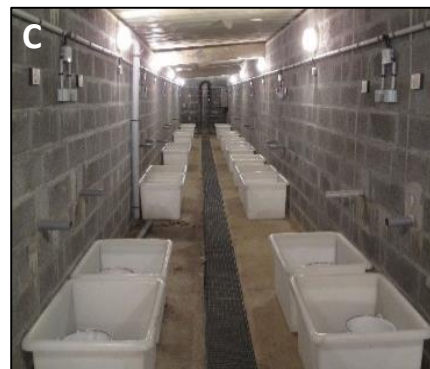
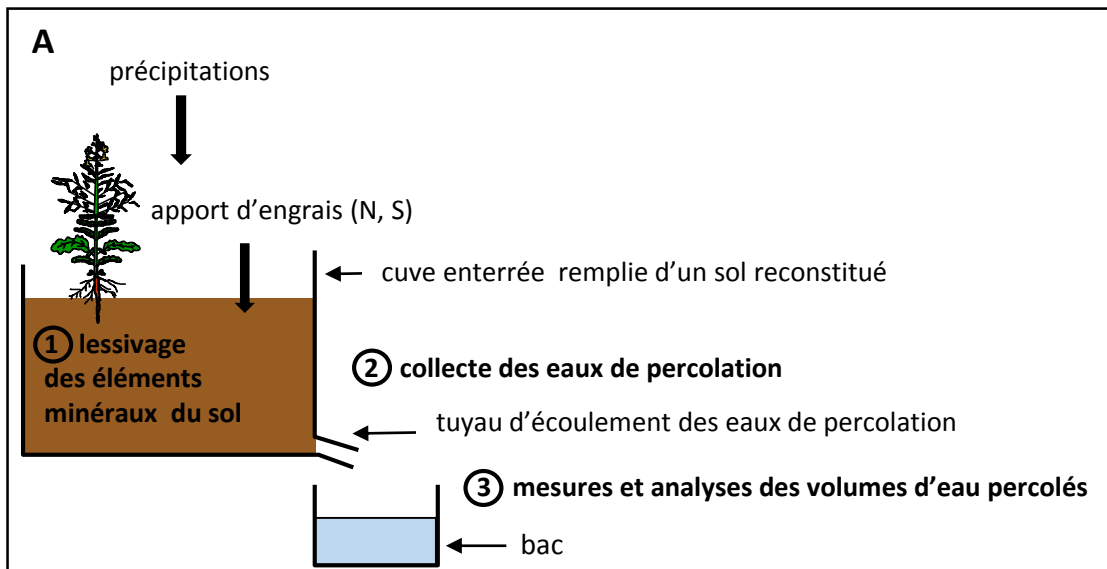


Figure 3 : (A) Description d'une case lysimétrique. (B) Photographie du site expérimental situé à Lieury l'Oudon (14). (C) Photographie de la fosse de mesure des cases lysimétriques.

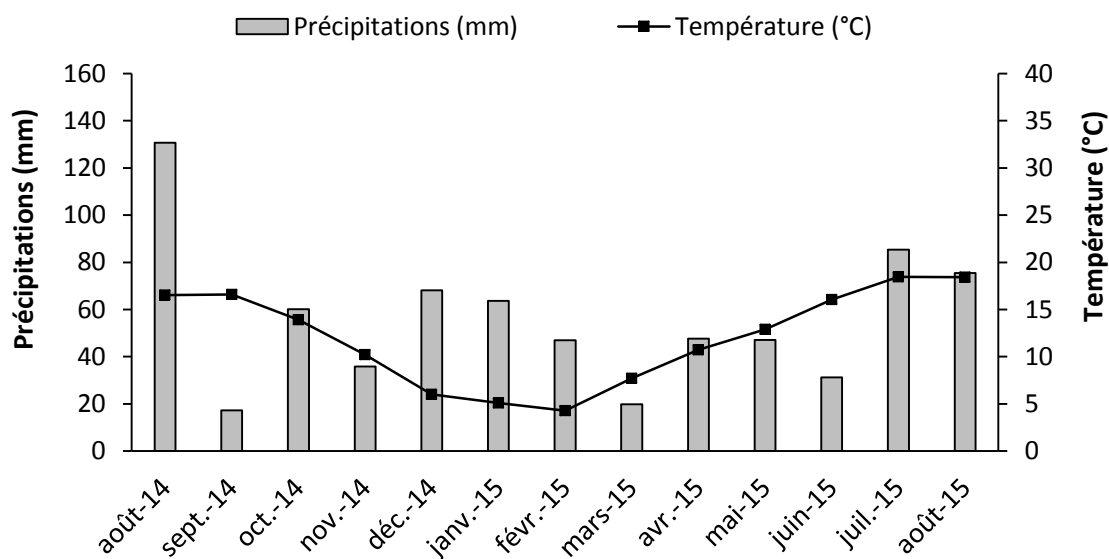


Figure 4 : Données mensuelles de la température moyenne (°C) et des précipitations (mm) enregistrées pendant la culture du colza (aout 2014-aout 2015), par la station météorologique du Lycée Agricole Le Robillard située à proximité des cases lysimétriques (Lieury, l'Oudon, 14).

minimales et maximales pendant l'expérimentation étaient respectivement de 5,6°C et de 15,3°C. Les précipitations pendant la durée de la culture s'élevaient à 447 mm.

II.4.2.2. Caractéristiques du sol

Les cases lysimétriques utilisées (14 cases en résine polyester) sont toutes constituées du même type de sol. Il s'agit d'un sol brun argilo-calcaire provenant de la parcelle dans laquelle a été mis en place le dispositif de cases lysimétriques, et qui a été reconstitué horizon par horizon. Ses caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **tableau 8**.

II.4.3. Itinéraire technique

Un système de culture additif a été retenu dans le cadre de cette expérimentation (De Wit et Van den Bergh, 1965) : le colza a donc été cultivé en monoculture ou en association avec le trèfle, avec la même densité (**Figure 5**). Ce choix a été fait dans le but de comparer le rendement grainier de monoculture de colza (qui s'élève à 35 q.ha⁻¹ en moyenne en France) à celui de colza cultivé en association avec du trèfle, l'ensemble des parcelles ayant été fertilisé avec seulement 100kgN.ha⁻¹.

Afin de faciliter l'implantation du colza et du trèfle, des semis sont effectués le 1^{er} septembre 2014 sur une parcelle située à 50 m du site expérimental constituée du même type de sol que celui des cases lysimétriques (**Tableau 8**). Quatre mois après le semis, les plantes sont prélevées et repiquées dans les cases lysimétriques avec une densité de 30 plantes par m² pour le colza, réparti sur 4 rangs en monoculture et en association, et à une densité de 62 plantes par m² pour le trèfle répartis sur 5 rangs pour l'association. Les monocultures et les associations colza-trèfle sont réparties de façon aléatoire sur les cases lysimétriques. Pour les cultures en association, les deux espèces sont disposées sur les cases en alternant un rang de colza et un rang de trèfle tous les 14 cm (**Figure 5**). Le rang alterné permet un semis régulier et facilite la récolte des deux espèces séparément.

Une fertilisation potassique (180 kg de K.ha⁻¹) et phosphatée (60 kg de P.ha⁻¹) est apportée en deux fois sous forme d'engrais combiné sur chaque case lysimétrique (respectivement de 30 et 90 kg .ha⁻¹ pour le P et le K, apporté en décembre et en mars ; **Figure 6**). Une fertilisation azotée de 100 kg N.ha⁻¹ est apportée 53 jours après la fertilisation P-K, sous forme de nitrate d'ammonium marqué au ¹⁵N (¹⁵NO₃¹⁵NH₄) à 5%. Au même moment, deux niveaux de fertilisation soufrée (30 et 60 kg S .ha⁻¹) sont appliqués sous forme de MgSO₄ au colza cultivé seul ou en association. Les adventices présentes sur les cases sont éliminées manuellement et un traitement phytosanitaire (granulés à base de métaldéhyde 5%, Fertiligène) est appliqué en automne afin d'éliminer les limaces.

Tableau 8 : Propriétés physico-chimiques du sol contenu dans les 14 cases lysimétriques utilisées pour l'expérimentation présentée **Chapitre 4**.

Horizons (cm)	Texture			pH	C organique (mg C.g ⁻¹)	N total (mg N.g ⁻¹)	Matière organique (%)	CEC (cmol.k g ⁻¹)	CaCO ₃ (%)
	sable (%)	limon (%)	argile (%)						
0-20	32	38	30	7,9	25,4	3,21	6,4	16,5	10
20-40	34	38	28	8,1	15	1,87	3,7	11,5	12
40-65	41	35	24	8,3	7,6	0,93	1,9	7,2	28
65-100	49	34	17	8,4	3,4	0,4	0,8	4,6	38

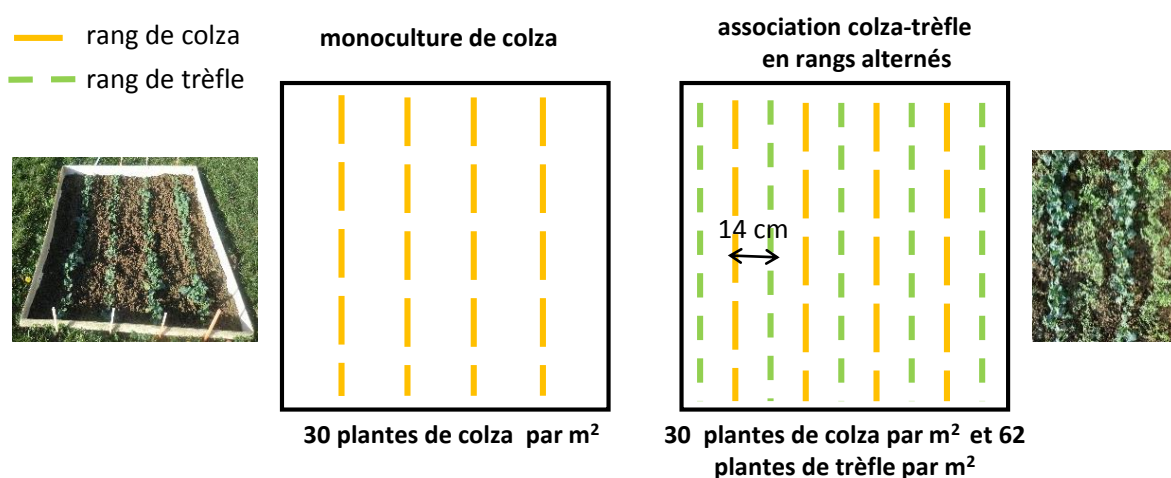


Figure 5 : Dispositif expérimental utilisé pour la culture du colza associé ou non au trèfle sur les cases lysimétriques de Lieury (commune de L'Oudon, 14) (**Chapitre 4**). La densité du colza est de 30 plantes .m⁻² réparties sur 4 rangs en monoculture et en association. Celle du trèfle semé sur 5 rangs s'élève à 62 plantes.m⁻². En association, un rang de colza est alterné avec un rang de trèfle, avec un espacement de 14 cm entre chaque rang.

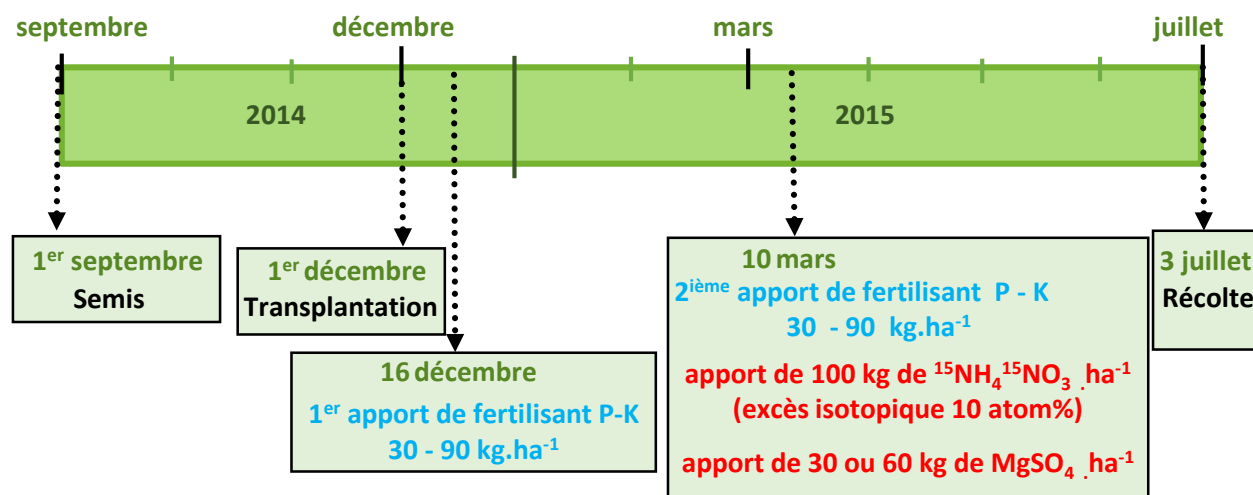


Figure 6 : Itinéraire technique mis en place pour la culture du colza associé ou non au trèfle sur les cases lysimétriques (**Chapitre 4**).

La récolte est effectuée à maturité des siliques, soit 7 mois après le repiquage. Les parties aériennes du colza et du trèfle sont récoltées en coupant les plantes à la base de la tige. Les pivots de colza sont récoltés et soigneusement rincés à l'eau osmosée. Les masses sèches des différents échantillons sont déterminées après leur passage à l'étuve pendant une semaine à 60°C.

III. Mesures et Méthodes d'analyses

III.1. Mesure des paramètres physiologiques des plantes

III.1.1. Détermination de la hauteur et de la surface foliaire (Chapitres 1 et 2)

Des mesures de hauteur et de surface foliaire du colza et des Fabacées sont respectivement effectuées à l'aide d'une règle graduée (en la positionnant entre la base et le sommet de la plante) et d'un planimètre LI-COR 300 (LICOR, Lincoln, NE, USA). Pour les plantes cultivées en monoculture (2 plantes par pot), la moyenne de la hauteur et des surfaces foliaires des plantes présentes dans le pot est calculée.

III.1.2. Mesure de la teneur relative en chlorophylles des feuilles de colza (Chapitre 2)

La teneur relative en chlorophylles des feuilles est estimée au moyen du système SPAD (Soil Plant Analysis Development, Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japon) (Monje et Bugbee, 1992 ; Rossato *et al.*, 2001 ; **Figure 7**). Ce système possède une fenêtre par laquelle est émise une lumière rouge et infrarouge. Celle-ci, après être passée au travers de la feuille, est captée par un récepteur qui la convertit en un signal électrique analogique. Après amplification et conversion analogique/numérique du signal, la valeur SPAD est calculée par le microprocesseur. Le rapport entre les intensités de lumière rouge (longueur d'onde : 650 nm, partiellement absorbée par les chlorophylles) et de lumière infrarouge (longueur d'onde : supérieur à 800 nm, non absorbée) permet de déterminer la teneur relative en chlorophylles exprimées en unité arbitraire (ou unité de SPAD). Les valeurs SPAD obtenues sont proportionnelles à la teneur en chlorophylles de la feuille.

III.1.3. Détermination du rendement grainier du colza (Chapitre 4)

Après récolte, les parties aériennes et racinaires du colza et des Fabacées présents sur les cases lysimétriques sont placées à l'étuve à 60°C pendant une semaine. Les siliques du colza sont séparées des tiges puis battues dans une batteuse à bottillon (modèle 350C, Marque SRC) sur le site de l'INRA du Rheu (35). Les graines sont ensuite séparées des impuretés dans une colonne densimétrique (Marque Tripette et Renaud). La masse totale des graines par case est déterminée et convertie en quintaux par hectare. Un aliquot de 5 g est conservé afin d'analyser la qualité grainière (cf paragraphe III.2.1).



Figure 7 : Appareil permettant de mesurer la teneur relative en chlorophylles (SPAD, Soil Plant Analysis Development, Minolta, SPAD-502 model, Tokyo, Japon). Deux faisceaux (rouge et infrarouge) sont émis au niveau de la pince qui enserre le limbe. Les faisceaux traversent le tissu chlorophyllien et sont captés par la cellule réceptrice de l'appareil. L'énergie photonique est convertie en signal numérique. Le rapport entre les intensités de lumières rouges (longueur d'onde : 650 nm, partiellement absorbée par les chlorophylles) et infrarouge (longueur d'onde : supérieur à 800 nm, non absorbée) permet de déterminer la teneur relative en chlorophylles exprimées en unité arbitraire (ou unité de SPAD).

III.2. Méthodes d'analyses

III.2.1. Détermination des teneurs en huile, en protéines et en glucosinolates des graines de colza (Chapitre 4)

Les analyses de la qualité des graines de colza cultivé sur les cases lysimétriques ont été réalisées au sein de l'UMR 1349 IGEPP (Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes) située à l'INRA du Rheu (35). Les échantillons sont analysés à l'aide d'un spectromètre proche infrarouge monochromator NIRSystem model 6500 (FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD) en mode réflectance. Environ 5 g de graines mures sèches et intactes sont placés dans une coupelle standard et scannés. Les résultats sont déterminés selon une courbe de calibration externe établie pour la teneur en huile et glucosinolates dans les graines de colza (équation commercialisée par CRAW, Gembloux, Belgique). Les résultats sont exprimés en % d'huile pour 1 g de matière sèche de graines et en μmol de glucosinolates totaux par g de matière sèche de graines.

III.2.2. Dosages du nitrate et du sulfate présents dans les eaux de percolation des cases lysimétriques (Chapitre 4)

Les concentrations en nitrate et en sulfate des eaux de percolation sont déterminées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC, ICS3000, Thermo Scientific Dionex corporation). 1 ml de solution est injecté grâce à un passeur automatique. Les échantillons sont élués par une solution constituée de Na_2CO_3 (4,05 mM) et de Na_2HCO_3 (1,26 mM) délivrée par un système de pompe isocratique. Les anions de l'échantillon sont séparés par une colonne échangeuse d'ions (AS22 4x250 mm, Thermo Scientific Dionex). Ils sont détectés par conductimétrie puis identifiés en fonction de leur temps de rétention. Le nitrate et le sulfate sont quantifiés grâce à une calibration du système avec des solutions standard dont la concentration varie entre 0 et 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrate et de sulfate.

III.2.3. Dosage de l'azote et du soufre total et du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ par Spectrométrie de masse isotopique (IRMS ; Chapitres 1, 2, 3 et 4)

Le système utilisé pour la détermination des teneurs en S et N total et le rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ comprend un spectromètre de masse isotopique en flux continu (Isoprime, GV Instrument, Manchester, Royaume Uni) couplé à un analyseur élémentaire C/N/S (EA3000, Euro Vector, Milan, Italie) assurant la production de N_2 ou de SO_2 . Les échantillons sous forme de poudre sèche, sont pesés avec précision ($\pm 1 \mu\text{g}$) dans de fines nacelles en étain.

Les échantillons sont ensuite disposés dans un injecteur placé en tête de la colonne d'oxydation de l'analyseur élémentaire en présence d'un flux d'hélium en légère surpression, afin

d'éviter toute contamination par l'air. Pour la détermination de la quantité d'azote total et de ^{15}N de l'échantillon, la combustion totale de l'échantillon a lieu en tête de la colonne d'oxydation (constituée d'oxyde de chromium et de cobalt à 1030°C) grâce à une élévation de température (1600°C) assurée par un apport d'oxygène. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve alors sous forme gazeuse, réduite au cours du passage sur une colonne de cuivre métallique à 650°C (colonne de réduction). Pour la détermination de la quantité de soufre (S), les échantillons sont injectés dans une colonne qui assure simultanément l'oxydation et la réduction (oxyde de tungstène et cuivre métallique pur à une température de 1030°C). Après piégeage des molécules d' H_2O et de CO_2 dans des colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du carbosorb® puis passage dans une colonne en chromatographie en phase gazeuse (à 60°C pour les analyses de N et 95°C pour les analyses de S), les molécules azotées et soufrées sont séparées du CO_2 avant d'être injectées dans le spectromètre de masse isotopique.

Le soufre, ou l'azote gazeux, injecté dans le spectromètre de masse est d'abord ionisé. Les ions moléculaires alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis déviés dans un champ magnétique. L'angle de déviation dépend du rapport de la masse (m) et de la charge (z). Toutes les molécules ionisées étant de même charge, seule leur masse change l'angle de déviation. Ainsi, par exemple, la déviation du N_2 de masse 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) est plus grande que celle du N_2 de masse 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$), elle-même plus grande que celle du N_2 de masse 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$).

Les ions sont ensuite collectés au niveau de trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont amplifiés puis transmis à un système informatique. La quantification du N et du S total est réalisée en effectuant la somme des signaux ainsi obtenus. Pour chaque échantillon, les données de $\delta^{15}\text{N}$ prenant en compte les différents signaux comparés à des gaz de référence (N_2 ou SO_2) injectés entre les échantillons (GV Instrument), sont collectées. L'analyse IRMS fournit le pourcentage d'azote (%N) et de soufre (%S) dans l'échantillon ainsi que le rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. Les valeurs de delta ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) et d'abondance isotopique (A%) pour un échantillon donné sont déterminées respectivement par IRMS selon les formules :

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \times 1000$$

Où, $R_{\text{échantillon}}$ et R_{standard} , sont le rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de l'échantillon et du standard. Le standard est l'azote atmosphérique ($R_{\text{standard}} : 0,3663$ atome %).

$$A\% = \frac{^{15}\text{N}}{(^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})} \times 100$$

Où, ^{15}N et ^{14}N représentent respectivement les quantités d'isotopes de masse 15 et 14.

Les quantités d'azote (ou de soufre) total QN_{tot} (ou QS_{tot}) et de ^{15}N ($Q^{15}N$) contenu dans un tissu sont calculées comme suit :

$$QN_{tot} \text{ (ou } QS_{total}) = \frac{\%N \text{ (ou } \%S) \times MS}{100}$$

Où, %N (ou %S) et MS représentent respectivement le pourcentage d'azote (ou de soufre) contenu dans le tissu et la biomasse sèche de l'échantillon.

$$Q^{15}N = \frac{(A\% - A\%_{standard \ naturel})}{100} \times QN_{tot}$$

Où, $A\%$ $A\%_{standard \ naturel}$ représente l'abondance naturelle d'un échantillon standard non marqué.

III.2.4. Calcul du pourcentage d'azote dérivé de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) (Chapitres 1 et 2)

Afin de déterminer le pourcentage d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa : « N derived from air ») par la méthode d'abondance isotopique naturelle ^{15}N , il est nécessaire de calculer le coefficient de discrimination (β) de chaque Fabacée. Ce coefficient correspond à la valeur du $\delta^{15}N$ des Fabacées dont la nutrition azotée repose uniquement sur la fixation symbiotique.

Afin de déterminer les valeurs du β de chaque Fabacée étudiée, une expérimentation en serre a été menée en cultivant les plantes sur un substrat dépourvu d'azote. Pour chacune des espèces de Fabacées étudiées, trois jeunes plantes sont transférées dans un pot de 2L contenant 2,5 kg de sable. Les jeunes plantes sont arrosées avec de la solution nutritive dont la composition est présentée dans le **tableau 7** mais dépourvu d'azote. Elles sont inoculées avec leur rhizobium spécifique comme décrit précédemment (paragraphe II). Après 40 jours de culture, elles sont récoltées et séchées à 60°C, puis analysées en IRMS comme décrit précédemment (paragraphe II).

Pour les expérimentations décrites chapitre 1 et 2, le pourcentage d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa : « N derived from air ») des Fabacées est calculé par la méthode de l'abondance isotopique naturelle. Cette méthode exploite les différences en enrichissement en ^{15}N qui existent naturellement entre le sol et l'atmosphère (Amarger *et al.*, 1979).

Le %Ndfa est calculé selon la formule suivante (Shearer et Khol, 1986):

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N_{pl. \ non \ fix.} - \delta^{15}N_{pl. \ fix.}}{\delta^{15}N_{pl. \ non \ fix.} - \beta} \times 100$$

Où, $\delta^{15}N_{pl. \ non \ fix.}$ et $\delta^{15}N_{pl. \ fix.}$ représente le delta ^{15}N de la plante non fixatrice de référence (le colza) cultivée en monoculture et le delta ^{15}N de la plante fixatrice (la Fabacée) cultivée en monoculture ou en association. β est le coefficient de discrimination de la Fabacée correspondant au $\delta^{15}N$ de la

Fabacée dont la nutrition azotée repose uniquement sur la fixation symbiotique, comme décrit précédemment (paragraphe IV.2.4.).

Pour l'expérimentation décrite chapitre 3, le pourcentage d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) du trèfle en association a été calculé par la méthode de dilution isotopique (marquage de l'engrais au ^{15}N), selon la formule décrite par Larue et Patterson, 1981 :

$$\%Ndfa = 1 - \frac{\%^{15}\text{N}_{\text{excès trèfle asso}}}{\%^{15}\text{N}_{\text{excès colza mono}}} \times 100$$

Où, $\%^{15}\text{N}_{\text{excès trèfle asso}}$ et $\%^{15}\text{N}_{\text{excès colza mono}}$ correspondent respectivement à l'excès isotopique du trèfle cultivé en association et du colza cultivé en monoculture.

III.2.5. Calcul du transfert d'azote des Fabacées vers le colza (Chapitre 3)

Le pourcentage d'azote transféré de la Fabacée au colza ($\%N_{\text{transféré}}$) est estimé selon la formule décrite par Ledgard *et al.*, (1985) :

$$\%N_{\text{transféré}} = \frac{Q^{15}\text{N}_{\text{colza}}}{Q^{15}\text{N}_{\text{colza}} + Q^{15}\text{N}_{\text{Fabacée}}} \times 100 \quad (1)$$

Où $Q^{15}\text{N}$ correspond à la quantité de ^{15}N (exprimée en mg.plante^{-1}) contenue dans la plante (colza ou Fabacée) est calculée de la façon suivante :

$$Q^{15}\text{N}_{\text{plante}} = \frac{\%^{15}\text{N}_{\text{excès plante}}}{\%^{15}\text{N}_{\text{excès solution de marquage}}} \times QN_{\text{total}} \quad (2)$$

Où $\%^{15}\text{N}_{\text{excès plante}}$ et $\%^{15}\text{N}_{\text{excès solution}}$ de marquage correspondent respectivement à l'excès isotopique en ^{15}N contenu dans la plante et dans la solution de marquage (ici 99%). QN_{total} représente la quantité d'azote totale contenue dans la plante.

A partir de l'équation (1), la quantité totale d'azote (exprimé en mg.plante^{-1}) transférée de la Fabacée au colza ($QN_{\text{transféré}}$) est déterminée de la manière suivante :

$$QN_{\text{transféré}} = \frac{\%N_{\text{transféré}} \times QN_{\text{Fabacée}}}{100} \quad (3)$$

Où $QN_{\text{Fabacée}}$ représente la quantité totale d'azote contenue dans la Fabacée.

A partir de l'équation (3), le pourcentage d'azote contenu dans le colza dérivé du transfert ($\%N_{\text{dft}}$) est obtenu comme suit :

$$\%N_{\text{dft}} = \frac{QN_{\text{transféré}} \times 100}{QN_{\text{colza}}} \quad (4)$$

Où QN_{colza} représente la quantité totale d'azote contenue dans le colza.

IV. Exploitation statistique des résultats

L'ensemble des résultats est exprimé par la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des répétitions biologiques (chapitre 1 : n=5 ; chapitre 2 : n=5 ou n=3 pour le %Ndfa ; chapitre 3 : n=5 pour la vesce et le lupin et n=3 pour le trèfle ; chapitre 4 : n=3) \pm l'erreur standard (\pm SE). Le seuil de signification est indiqué par des astérisques (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$) ou des lettres différentes (a, b et c) lorsque les données sont significativement différentes.

Pour les expérimentations conduites en pot (chapitres 1 et 2), les données sont analysées avec le test de Student après vérification de la normalité.

Pour les expérimentations conduites en split-root et en cases lysimétriques (chapitre 3 et chapitre 4), les données sont analysées avec une analyse de variance (ANOVA), après vérification de la normalité, et les différences significatives sont séparées par un test de Tukey ($P \leq 0,05$).

Chapitre 1

Criblage des Fabacées en conditions contrôlées



Chapitre 1

Criblage des Fabacées en conditions contrôlées

I. Introduction

Dans les associations d'espèces, l'accès aux ressources du milieu, en particulier à la lumière et à l'azote du sol, constitue l'un des facteurs primordiaux déterminant le degré d'intensité des interactions interspécifiques et par conséquent, le développement et la productivité de chaque espèce. Cet accès aux ressources dépend des caractéristiques morphologiques et physiologiques de chacune des espèces présentes au sein de l'association.

L'objectif de l'expérimentation présentée dans ce premier chapitre est donc de **sélectionner parmi les 7 Fabacées initialement retenues** (*Trifolium incarnatum* L., *Vicia sativa*, *Lupinus albus* L., *Lens culinaris* Medik., *Lathyrus sativus* L., *Trigonella foenum-graecum* L., *Vicia Faba* L.) **celles ayant un impact positif sur la performance agronomique du colza au stade végétatif et dont le développement est le moins affecté par la présence du colza**. Le choix des Fabacées a été effectué dans le but de disposer d'espèces ayant des traits morphologiques aérien et racinaire contrastés : confrontation de deux types de systèmes aériens (« couvre sol » et port érigé) et deux types de systèmes racinaires (racines pivotantes et racines fasciculées) (cf Matériel et Méthodes : Tableau 2).

Comme le souligne l'analyse bibliographique, les nutriments azotés et soufrés apparaissent essentiels et déterminants au sein de l'association colza-Fabacées. Une étude comparative de la croissance, des nutriments azotés et soufrés du colza et des différentes espèces de Fabacées cultivées en monoculture et en association a donc été réalisée en conditions contrôlées. La capacité de fixation symbiotique de l'azote atmosphérique des Fabacées, qui est une composante essentielle des systèmes intégrant des plantes fixatrices, a également été déterminée. A cette fin, une expérimentation en conditions contrôlées visant à déterminer le coefficient de discrimination du ^{15}N atmosphérique de chaque Fabacée a été préalablement effectuée. Ce coefficient, nécessaire pour déterminer le pourcentage d'azote dérivant de la fixation de l'azote atmosphérique chez les Fabacées (%Ndfa, « N derived from air ») par la méthode de l'abondance isotopique naturelle (Mariotti *et al.*, 1980), a ensuite été utilisé dans l'expérimentation décrite dans le chapitre 2.

Au cours de cette expérimentation, **l'impact des différentes Fabacées sur la croissance et les nutriments azotés et soufrés du colza cultivé en condition de faible intrant azoté** a été évalué ainsi que leur capacité à se développer en présence du colza.

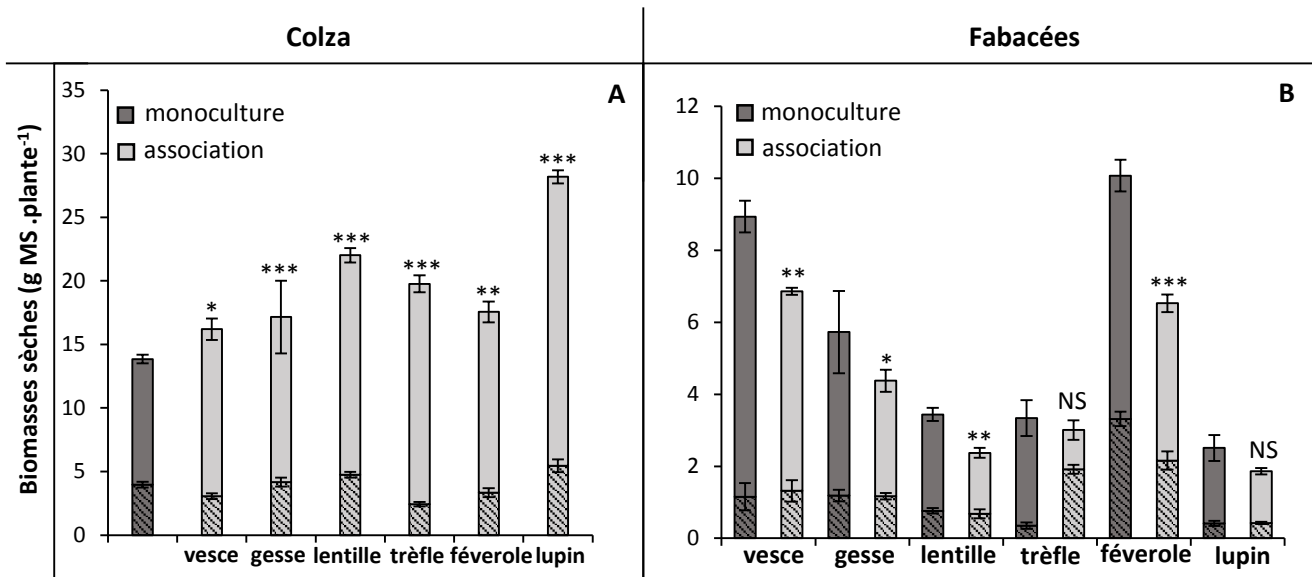


Figure 1: Biomasses sèches (g MS .plante⁻¹) des parties aériennes (□) et racinaires (▨) du colza (A) et des Fabacées (B) cultivés en monoculture ou en association. Les barres verticales, indiquent la moyenne ± l'erreur standard pour n=5. Les étoiles indiquent une différence significative entre monoculture et association pour une probabilité p < 0,05 (*), p < 0,01 (**) et p < 0,001 (***). Les lettres NS signifient qu'il n'y a pas de différence significative entre monoculture et association.

II. Résultats

L'ensemble des résultats présentés ci-dessous se rapportant au colza et aux Fabacées cultivés en monoculture ou en association a été obtenu deux mois après leur repiquage sur des pots contenant un mélange sol/sable (cf Matériel et Méthodes : Tableau 6, Figure 2).

Soulignons que l'absence de développement du fénugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.) en association avec le colza, nous a conduit à l'exclure d'emblée du criblage. En effet, la croissance des plantules de fénugrec suite à leur repiquage en pot contenant du colza était extrêmement réduite voire nulle. Cette absence de développement peut s'expliquer par l'absence de formation de nodosités lorsqu'il est cultivé en association malgré l'inoculation des jeunes plantules de fénugrec avec leur rhizobium spécifique (cf Matériel et Méthodes : Tableau 3). Par conséquent, aucun résultat se rapportant au fénugrec n'est décrit ci-après.

II.1. Biomasses sèches

- Colza : quelle que soit la Fabacée considérée, la quantité de biomasse totale produite par le colza en association est significativement supérieure (de 1,2 à 2 fois) à celle du colza en monoculture ($13,8 \pm 0,4$ g MS.plante⁻¹) (Figure 1A). La plus forte et la plus faible augmentation de biomasse totale sont respectivement obtenues lorsque le colza est associé au lupin ($28,2 \pm 0,9$ g MS .plante⁻¹) et à la vesce ($16,2 \pm 1,1$ g MS .plante⁻¹). Cette augmentation résulte d'une meilleure production de sa biomasse aérienne (augmentation d'un facteur de 2,3 et 1,3 lorsqu'il est respectivement cultivé en association avec le lupin et la vesce), la plus forte croissance aérienne étant observée lorsque celui-ci est associé avec le lupin ($22,7 \pm 0,5$ g MS .plante⁻¹ contre $9,9 \pm 0,3$ g MS .plante⁻¹ lorsqu'il est cultivé seul). L'augmentation de la biomasse totale peut également résulter d'une augmentation de sa croissance racinaire. En effet, lorsqu'il est cultivé avec la lentille ou le lupin, sa biomasse racinaire est significativement plus élevée (passant respectivement de $4 \pm 0,2$ g MS.plante⁻¹ à $4,7 \pm 0,2$ et $5,5 \pm 0,5$ g MS.plante⁻¹). En revanche, sa croissance racinaire est significativement réduite lorsqu'il est cultivé avec du trèfle ou de la vesce (de $4 \pm 0,2$ g MS.plante⁻¹ à respectivement $2,4 \pm 0,2$ et $3 \pm 0,2$ g MS.plante⁻¹). Par ailleurs, aucune différence significative de sa croissance racinaire n'est observée lorsque celui-ci est associé à la gesse ou à la féverole.

- Fabacées : la biomasse totale des plantes en association est nettement plus faible que celle des plantes en monoculture, avec une diminution de 30% en moyenne, à l'exception du lupin et du trèfle dont la biomasse totale ne varie pas quelles que soient les conditions de culture (respectivement égale à $2 \pm 0,4$ et $3 \pm 0,5$ g MS .plante⁻¹, Figure 1B). Cette diminution est due uniquement à une diminution de la croissance des parties aériennes de -29% pour la vesce (de 7,8

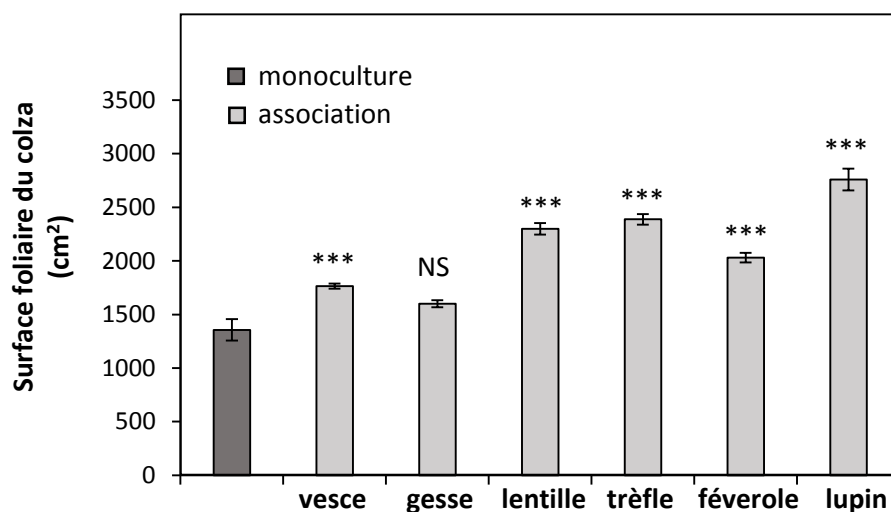


Figure 2 : Surface foliaire (cm²) du colza cultivé en monoculture et en association avec les différentes Fabacées. Les barres verticales indiquent la moyenne \pm l'erreur standard pour n=5. Les étoiles indiquent une différence significative entre le colza cultivé en monoculture et en association pour une probabilité $p < 0,001$ (***). Les lettres NS signifient qu'il n'y a pas de différence significative entre monoculture et association.

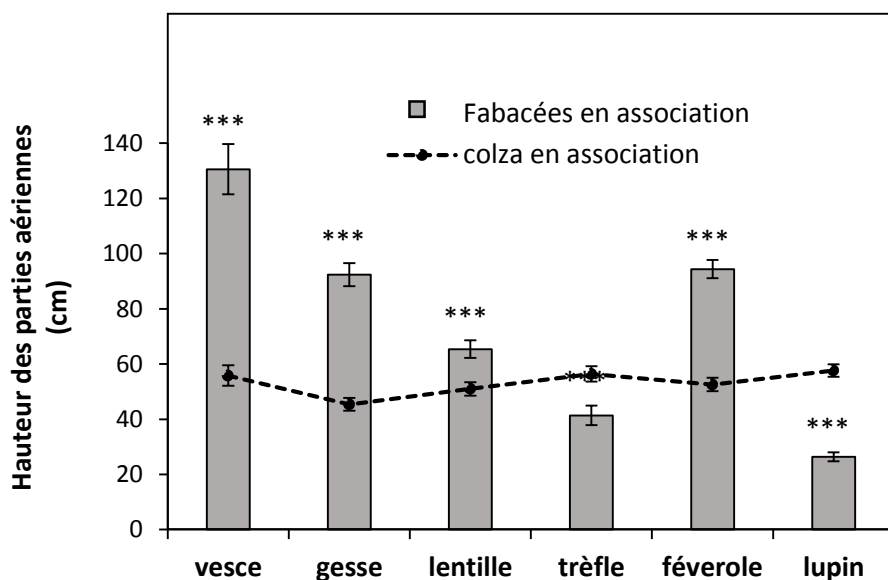


Figure 3 : Hauteurs (cm) des parties aériennes du colza (—•—) et des Fabacées (■) cultivés en association. Les barres verticales indiquent la moyenne \pm l'erreur standard pour n=5. Les étoiles indiquent une différence significative entre la hauteur du colza et les différentes espèces de Fabacées associées pour une probabilité $p < 0,001$ (***).

$\pm 0,4$ à $5,5 \pm 0,1$ g MS.plante⁻¹) et la gesse (de $4,5 \pm 1,1$ à $3,2 \pm 0,3$ g MS.plante⁻¹) et de -35% pour la lentille (de $2,7 \pm 0,2$ à $1,7 \pm 0,1$ g MS.plante⁻¹) alors que pour la féverole, celle-ci résulte à la fois d'une réduction de la croissance des parties aériennes (-35% : de $6,8 \pm 0,3$ à $4,1 \pm 0,4$ g MS .plante⁻¹) et des parties racinaires (-35% : de $10,1 \pm 0,1$ à $6,5 \pm 0,2$ g MS.plante⁻¹). En revanche, pour le trèfle en association, la diminution de la biomasse aérienne (-60% : de $3,0 \pm 0,49$ à $1,1 \pm 0,25$ g MS.plante⁻¹) est compensée par une très forte augmentation de la biomasse racinaire (+ 450% : de $0,35 \pm 0,09$ à $2 \pm 0,25$ g MS.plante⁻¹). Enfin, les biomasses racinaire et aérienne du lupin sont identiques quelles que soient les conditions de culture.

II.2. Surfaces foliaires et hauteurs des parties aériennes

A l'issue des deux mois de culture, la surface foliaire et la hauteur du colza ont été mesurées (Figures 2 et 3). Les résultats obtenus montrent que les surfaces foliaires du colza associé aux différentes Fabacées sont significativement supérieures (respectivement de 30, 50, 69, 76 et 103% pour la vesce, la féverole, la lentille, le trèfle et le lupin) à celles du colza cultivé seul (1357 ± 25 cm²), excepté pour la gesse où aucune différence significative n'est observée. Les colzas associés au trèfle et au lupin présentent les surfaces foliaires les plus élevées (respectivement égales à 2387 ± 44 et 2759 ± 134 cm²), alors que la plus faible surface foliaire est obtenue pour le colza associé à la vesce (1765 ± 33 cm²) (Figure 2).

La hauteur des parties aériennes du colza est similaire quelle que soit la Fabacée à laquelle il est associé et les conditions de culture (monoculture ou association : $50,7 \pm 1,5$ cm, Figure 3). Comparativement à la hauteur moyenne du colza, deux groupes de Fabacées peuvent être distingués: la vesce, la gesse, la lentille et la féverole qui présentent une hauteur plus importante (respectivement de $130,6 \pm 9$; $92,4 \pm 4$; $65,4 \pm 3$ et $94,4 \pm 3$ cm) et le trèfle et le lupin qui présentent une hauteur inférieure (respectivement de 41 ± 3 et $26 \pm 0,5$ cm) à celle du colza.

II.3. Quantités d'azote et de soufre total

- Azote total : Le colza cultivé en association présente un contenu en azote total plus élevé qu'en monoculture ($0,46 \pm 0,03$ g N .plante⁻¹), avec une augmentation allant de +50% avec la vesce ($0,67 \pm 0,03$ g N.plante⁻¹) à +100% avec le lupin ($1,01 \pm 0,006$ g N.plante⁻¹, Figure 4A). Contrairement au colza, le contenu en azote total des Fabacées en association est significativement plus faible qu'en monoculture, excepté pour le lupin où le contenu en azote est similaire ($0,08 \pm 0,01$ g N.plante⁻¹) (Figure 4B). Cette diminution va de 35% pour la vesce ($0,28 \pm 0,01$ contre $0,18 \pm 0,003$ g N plante⁻¹) à 55% pour la lentille ($0,13 \pm 0,01$ contre $0,06 \pm 0,005$ g N .plante⁻¹).

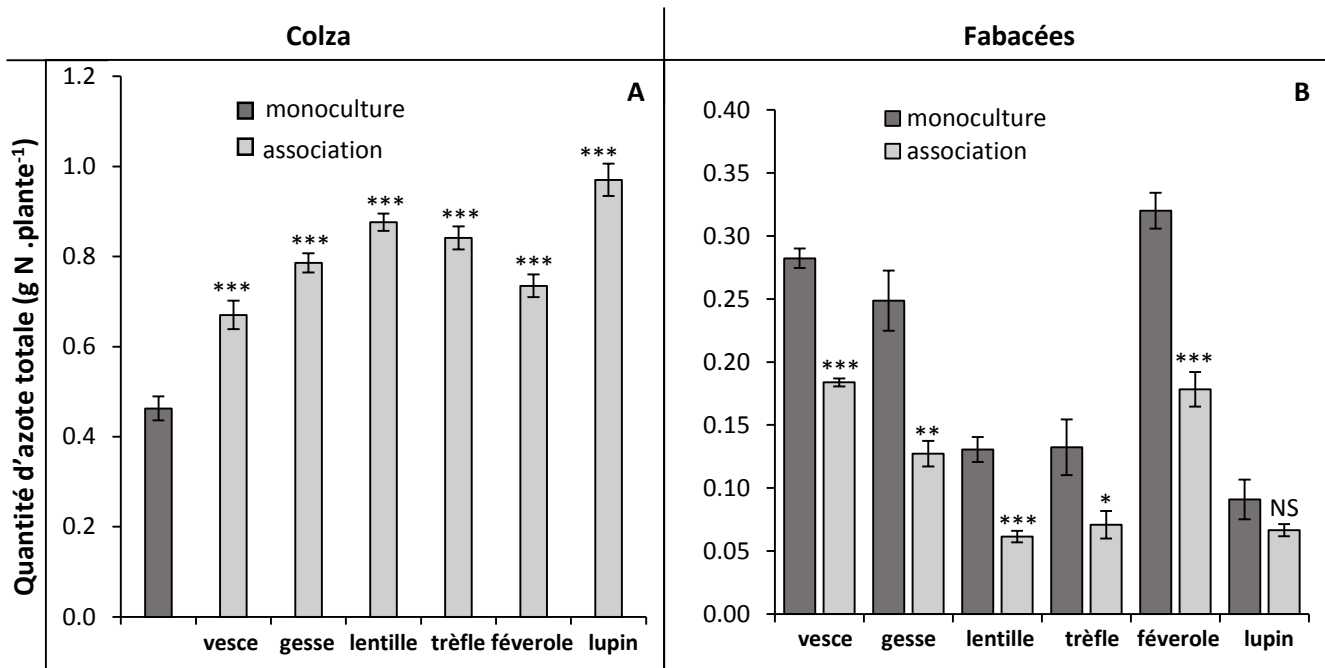


Figure 4 : Quantité d'azote totale (g N .plante⁻¹) du colza (A) et des Fabacées (B) cultivés en monoculture et en association. Les barres verticales, indiquent la moyenne \pm l'erreur standard pour n=5. Les étoiles indiquent une différence significative entre monoculture et association pour une probabilité $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . Les lettres NS signifient qu'il n'y a pas de différence significative entre monoculture et association.

- Soufre total : Après deux mois de culture, le contenu en soufre total du colza associé aux différentes fabacées augmente significativement (allant de +30% avec la vesce à +125% avec le lupin) comparativement à celui déterminé lorsqu'il est cultivé seul ($0,04 \pm 0,004 \text{ g S.plante}^{-1}$, **Figure 5A**), excepté pour le colza associé à la féverole où son contenu en soufre total est similaire à celui de la monoculture. A l'inverse, pour les Fabacées associées au colza, le contenu en soufre total est plus faible comparé à leur monoculture respective, avec une diminution pouvant aller de 45% pour la vesce ($0,016$ contre $0,009 \text{ g S.plante}^{-1}$) à 70% pour la lentille ($0,011$ contre $0,003 \text{ g S.plante}^{-1}$, **Figure 5B**) excepté pour le trèfle où aucune différence significative n'est observée.

II.4. Pourcentage d'azote des Fabacées issu de la fixation de l'azote atmosphérique

La méthode d'abondance isotopique naturelle en ^{15}N a été utilisée pour déterminer le pourcentage d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa : « N derived from air ») de chaque Fabacée (cf Matériel et Méthodes paragraphe VII.2.4 et VII.2.5). Selon l'équation décrite dans la partie « Matériel et Méthodes » (cf paragraphe VII.2.5) il a été nécessaire de déterminer, au préalable pour chaque Fabacée, le coefficient de discrimination β (cf Matériel et Méthodes paragraphe VII.2.4). Les valeurs du coefficient β obtenues varient selon les espèces étudiées, allant de 0,066 pour le lupin à 0,574 pour la féverole (**Tableau 1**).

Les résultats obtenus montrent que les capacités de fixation de la féverole, du lupin et de la vesce sont plus élevées (> 48%) que celles de la gesse, de la lentille et du trèfle (< 42%) (**Figure 6**). En association, aucune différence significative des valeurs de Ndfa n'est observée comparativement à celles déterminées chez les Fabacées cultivées seules.

III. Discussion et Conclusion

III.1. Discussion

L'expérimentation présentée dans ce premier chapitre avait pour objectif (i) de sélectionner, parmi 7 espèces de Fabacées, celles ayant un impact positif sur la performance agronomique du colza au stade végétatif (biomasse et nutriments azotés et soufrés) cultivé en conditions de faible disponibilité en N et (ii) d'étudier la capacité des Fabacées à se développer en présence du colza.

Pour rappel, le fénugrec (*Trigonella foenum-graecum* L.), qui ne s'est pas développé en présence du colza, a été exclu du criblage. Pour les 6 autres Fabacées, les résultats obtenus montrent que le colza se développe mieux lorsqu'il est associé aux Fabacées qu'en monoculture, suggérant que les compétitions intraspécifiques sont plus fortes que les compétitions

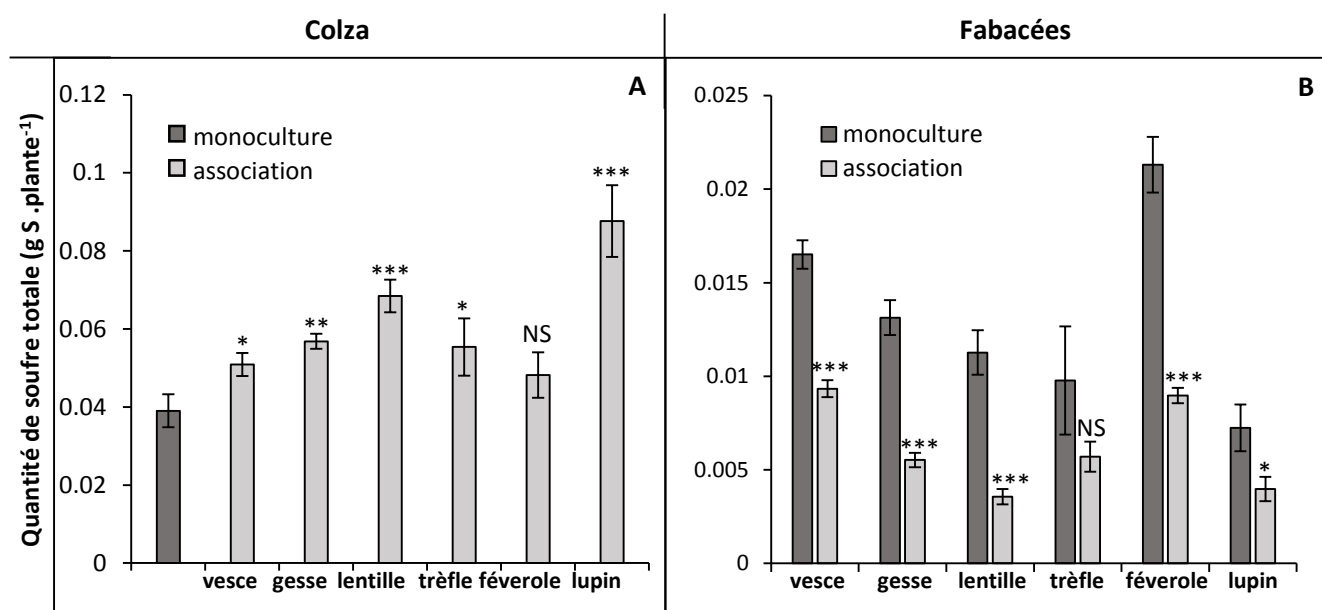


Figure 5 : Quantité de soufre totale (g S . plante⁻¹) du colza (A) et des Fabacées (B) cultivés en monoculture et en association. Les barres verticales, indiquent la moyenne \pm l'erreur standard pour n=5. Les étoiles indiquent une différence significative entre monoculture et association pour une probabilité p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***). Les lettres NS signifient qu'il n'y a pas de différence significative entre monoculture et association.

interspécifiques. En effet, quelle que soit la Fabacée considérée, la biomasse totale ainsi que les quantités d'azote et de soufre total du colza en association sont significativement plus élevées que celles observées en monoculture (**Figures 1A, 4A et 5A**). Parmi l'ensemble des associations testées, l'association colza-lupin est la plus performante sur la croissance du colza. En effet, la biomasse totale du colza associé au lupin est 2 fois plus élevée qu'en monoculture ($28,2 \pm 0,9$ contre $13,8 \pm 0,4$ g MS. plante⁻¹). Cette augmentation de biomasse s'accompagne d'une accumulation d'azote et de soufre total plus importante (respectivement 200 et 225% plus élevée qu'en monoculture ($0,97 \pm 0,03$ contre $0,46 \pm 0,03$ g N.plante⁻¹ et $0,09$ contre $0,04$ g S.plante⁻¹). Des augmentations moins importantes, allant de 30 à 60% sont obtenues lorsque le colza est cultivé en association avec la féverole, la gesse ou la lentille et la moins importante (+15%, soit $16,2 \pm 1,1$ g MS .plante⁻¹) lorsque celui-ci est associé à la vesce. D'autres études menées en conditions de plein champ sur les associations Brassica-Fabacées ont montré une diminution des rendements de la moutarde (*Brassica compestris* et *Sinapis alba* L.) en association avec des Fabacées (*Pisum sativum*, *Lens culinaris* ou *Cicer areitinum* L.) (Waterer *et al.*, 1994 ; Banik *et al.*, 2000) comparativement à la monoculture. En revanche, des études menées en conditions contrôlées ont montrées des effets bénéfiques des Fabacées sur la croissance des Brassicacées (*Brassica oleracea* L. /*Vicia sativa* et *Brassica napus* L. /*Vicia faba* L., Cortés-Mora *et al.*, 2010 ; *Brassica napus* L. /*Vicia faba* L., Jamont *et al.*, 2013a). A titre d'exemple, les travaux effectués par Jamont *et al.* (2013a) ont montré qu'après 52 jours de culture en rhizotrons, le colza associé à la féverole accumulait 20% de biomasse et 30% d'azote supplémentaire par rapport à la monoculture. Ce bénéfice s'explique notamment par une complémentarité dans la distribution verticale des racines secondaires des deux plantes favorisant ainsi le partage des ressources azotées du sol : 70 et 64% des racines secondaires du colza et de la féverole se répartissant respectivement dans la partie inférieure et supérieure du rhizotron.

Lors de ce criblage, nous avons également étudié la capacité des Fabacées à se développer en présence du colza. En effet, la performance d'une espèce en association est déterminée par son aptitude à résister à la compétition exercée par l'autre espèce (Keddy, 2001; Andersen *et al.*, 2007). Parmi les différentes espèces de Fabacées étudiées, le lupin et le trèfle sont celles qui ont le mieux résisté à la compétition interspécifique avec le colza. En effet, les biomasses totales du trèfle et du lupin sont identiques en association et en monoculture, alors que celle des autres Fabacées sont en moyenne diminuée de 30% (**Figure 2**). Il faut cependant souligner que l'absence de différence de biomasse totale observée entre le trèfle cultivé en association et le trèfle cultivé en monoculture s'explique par une diminution de la biomasse aérienne (-60%) qui est compensée par une très forte augmentation de sa biomasse racinaire (+450%) (**Figure 2**). Cette stimulation du développement du système racinaire pourrait être due à une forte compétition avec le colza pour le partage des

Tableau 1 : Coefficient de discrimination (β) des 7 espèces de Fabacées utilisés pour le calcul du pourcentage d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) chez les Fabacées.

Fabacées	Coefficient de discrimination (β)
vesce commune (<i>Vicia sativa</i> L.)	0,425
gesse fourragère (<i>Lathyrus sativus</i> L.)	0,323
lentille fourragère (<i>Lens culinaris</i> Medik.)	0,202
trèfle incarnat (<i>Trifolium incarnatum</i> L.)	0,527
lupin blanc (<i>Lupinus albus</i> L.)	0,066
féverole (<i>Vicia faba</i> L.)	0,574

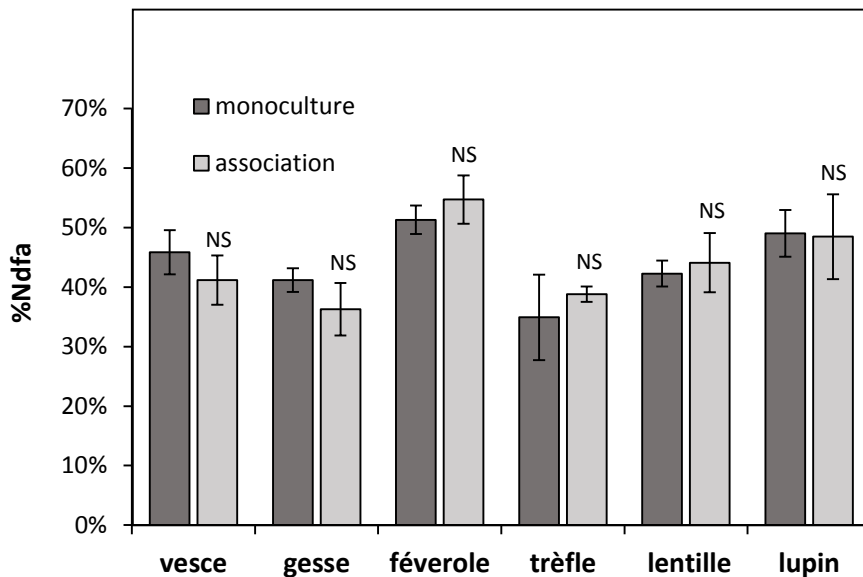


Figure 6 : Pourcentage d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) chez les Fabacées cultivées en monoculture et en association. Les barres verticales, indiquent la moyenne \pm l'erreur standard pour n=5. Les lettres NS signifient qu'il n'y a pas de différence significative entre monoculture et association.

ressources du sol et plus particulièrement de l'azote. Or, comme décrit précédemment dans la synthèse bibliographique, la rhizodéposition provient principalement de l'exsudation de composés azotés tels que des protéines, des acides aminés, ou encore de composés résultant de la dégradation de la nécromasse racinaire. Ainsi, ce fort développement racinaire pourrait entraîner une plus forte rhizodéposition et un transfert d'azote plus important du trèfle vers le colza. Afin de vérifier cette hypothèse, une expérimentation de marquage, présentée dans le chapitre 3, a donc été réalisée en conditions contrôlées grâce à l'utilisation conjointe d'un dispositif permettant de séparer le système racinaire des Fabacées en deux parties et de cultiver chacune d'elles de manière différentielle (dispositif « split-root ») et d'un marquage avec l'isotope stable ^{15}N pour étudier le transfert d'azote des Fabacées vers le colza.

Contrairement à nos résultats, Jamont *et al.* (2013a) ont montré que la croissance de la Fabacée (féverole) est augmentée lorsqu'elle est cultivée en association avec le colza. Cette différence peut résulter du fait qu'une augmentation de la capacité de fixation (%Ndfa) de la féverole est observée en association, alors que dans nos conditions de culture les valeurs de Ndfa des Fabacées déterminées en association sont identiques à celles observées en monoculture (Figure 9). Cette absence d'augmentation des capacités de fixation pourrait s'expliquer par la présence d'une trop forte teneur en N du sol utilisé (0,32%) bien que celui-ci ait été mélangé à du sable (volume à volume). En effet, des travaux portant sur le partage des ressources azotées ont montré que le bénéfice de l'association céréales-Fabacées est augmenté en condition de faible disponibilité en azote permettant d'augmenter la complémentarité de niche entre les deux espèces dans le partage de l'azote, alors qu'il s'estompe dès lors qu'une fertilisation azotée est pratiquée (Corre-Hellou *et al.*, 2006a ; Bedoussac et Justes, 2010a ; Bedoussac *et al.*, 2014). Cette hypothèse sera vérifiée en réalisant une expérimentation en conditions contrôlées en présence d'une disponibilité en azote du sol plus faible que celle utilisée lors de cette expérimentation (Chapitre 2).

Ce criblage a également permis d'étudier la compétition pour le soufre entre le colza et les Fabacées. Les résultats montrent que pour cet élément, le colza résiste mieux à la compétition interspécifique que les Fabacées. En effet, la quantité de soufre total du colza est identique en association et en monoculture, alors que celle des Fabacées est diminuée par rapport à leurs monocultures respectives. La prise en compte de la disponibilité en soufre est donc particulièrement importante dans le cadre des cultures associées Brassica-Fabacée intégrant des plantes exigeantes en cet élément. En effet, pour les Fabacées, la mise en place d'une bonne capacité à fixer le N_2 atmosphérique requiert une disponibilité suffisante en sulfate (Varin *et al.*, 2010). Pour le colza, une limitation en soufre se traduit par une diminution des rendements (Janzen et Bettany 1984 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Malhi *et al.*, 2007) et de la qualité des produits récoltés

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques des Fabacées retenues à l'issue du criblage et impact de l'association colza/Fabacée sur la croissance végétative et les nutriments azoté et soufré des Fabacées et du colza comparativement aux monocultures.

+ impact positif - Impact négatif = pas d'impact.

		Association colza/vesce	Association colza/trèfle	Association colza/lupin
type de système racinaire de la Fabacée		fasciculé	fasciculé	pivotant
hauteur de la Fabacée par rapport au colza		haute	basse	basse
biomasse totale	colza	+	++	+++
	Fabacée	-	=	=
biomasse racinaire	colza	-	-	+
	Fabacée	=	+++	=
biomasse aérienne	colza	+	++	+++
	Fabacée	-	-	=
quantité totale de N	colza	+	++	+++
	Fabacée	-	-	=
quantité totale de S	colza	+	+	+++
	Fabacée	-	=	-

(Dubousset *et al.*, 2010 ; D'Hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015). Une expérimentation a donc été réalisée afin d'étudier l'impact de la modulation de la fertilisation soufrée sur les performances de l'association colza-Fabacée (**Chapitre 4**).

Par ailleurs, la hauteur du système aérien est souvent considérée comme le critère principal déterminant le choix des espèces à associer puisqu'il joue un rôle important dans l'accès à la lumière des différentes plantes de l'association (Francis 1981 ; Davis et Garcia, 1983; Galwey et al, 1986 ; Keating et Carberry 1993 ; Midmore, 1993). La hauteur du système aérien des plantes a donc été mesurée en fin de culture. Les résultats montrent que le trèfle et le lupin présentent une hauteur de couvert inférieure à celle du colza (respectivement de 41 ± 3 et $26 \pm 0,5$ cm pour le lupin et le trèfle contre $50,7 \pm 1,5$ cm pour le colza, **Figure 4**), contrairement aux autres Fabacées (vesce, gesse, lentille et féverole). Ces deux espèces présentent donc l'avantage de ne pas créer d'ombrage au colza et sont donc à privilégier pour une association du colza à des Fabacées non gélives.

III.2. Conclusion

Au bilan, le choix des Fabacées pouvant être associées au colza nécessite de trouver des compromis entre compétitivité et complémentarité dans le partage des ressources, à la fois pour la lumière et pour les nutriments minéraux azotés et soufrés. A l'issue du criblage, **le lupin, le trèfle et la vesce** ont donc été retenues pour leur impact positif et contrasté sur la biomasse et les nutriments azotés et soufrés du colza au stade rosette (**Tableau 2**), afin de comprendre le(s) processus responsable(s) de ces performances contrastées : l'association colza-lupin et colza-vesce étant respectivement l'association la plus et la moins performante sur la croissance du colza, alors que l'association colza-trèfle présente un résultat intermédiaire. D'autre part, le lupin et le trèfle ont été choisis car ce sont les deux Fabacées qui ont le mieux résisté à la compétition, puisque contrairement aux autres espèces de Fabacées, leur croissance n'est pas impactée négativement par le colza. De plus, le très fort développement racinaire du trèfle en association présente une caractéristique potentiellement intéressante pour le transfert d'azote vers le colza (**Chapitre 3**).

A partir des 3 Fabacées retenues, des expérimentations ont été réalisées afin (i) d'évaluer la performance de ces 3 associations en conditions contrôlées et en situation de disponibilité en azote du sol plus limitante (**Chapitre 2**), (ii) d'estimer les transferts de composés azotés des Fabacées vers le colza à l'aide d'un marquage isotopique ^{15}N (**Chapitre 3**) et (iii) d'évaluer la performance de ces associations sur le rendement grainier du colza en conditions de plein champ et d'étudier l'impact de la fertilisation soufrée sur les performances agronomiques de l'association colza-Fabacée (**Chapitre 4**).

Chapitre 2

Plant growth and N balance in early stages of development of Rapeseed-Legume mixtures



Chapitre 2

Plant growth and N balance in early stages of development of Rapeseed-Legume mixtures

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article intitulé « **Plant growth and N balance in early stages of development of Rapeseed-Legume mixtures** », soumis à Plant and Soil.

Préambule

L'**analyse bibliographique** montre que les performances des associations végétales sont particulièrement augmentées en situation de bas niveaux d'intrants azotés. Nous nous sommes ainsi placés dans ce contexte de bas intrants, pour réaliser une expérimentation en conditions contrôlées visant à définir les performances agronomiques du colza au stade végétatif au sein des associations colza-vesce, colza-trèfle et colza-lupin retenues à l'issue du criblage (Chapitre 1). Considérant deux systèmes de cultures témoins (substitutif et additif), l'objectif est d'étudier l'effet des associations sur (i) la croissance et la nutrition azotée et soufrée du colza au stade rosette, (ii) la capacité de fixation de l'azote atmosphérique des Fabacées (%Ndfa) et (iii) l'impact de l'association sur le pool azoté du sol.

Principaux résultats :

- Le témoin colza en système substitutif (deux plantes par pot) présente un important retard de croissance par rapport au colza témoin en système additif (une plante par pot) et celui cultivé en association. Ce résultat souligne l'importance du choix du témoin et de son stade de développement, paramètre rarement considéré dans la littérature pour étudier les associations Brassicacées-Fabacées.
- En association, la biomasse ainsi que les teneurs en azote et en soufre du colza au stade rosette sont analogues à celles colza témoin en système additif. Ce résultat indique qu'à ce stade de développement, le colza ne souffre pas de compétition quelle que soit la Fabacée considérée.
- En association avec le trèfle, les feuilles de colza présentent un retard de sénescence par rapport aux colzas cultivé seul (système additif) ou en association avec la vesce ou le lupin.
- Par rapport à leurs monocultures respectives, une augmentation de la proportion d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) est déterminée pour les trois Fabacées (lupin : +34% ; trèfle : +140% ; vesce : +290%). Ce résultat traduit une forte séparation de niche pour la nutrition azotée des espèces en association et une entrée d'azote importante dans le système.
- Le stock d'azote du sol en fin de culture des associations colza-lupin et colza-trèfle est significativement plus élevé comparativement à celui de la monoculture de colza en système additif et de l'association colza-vesce.

Oilseed rape-legume mixtures: plant growth and N balance in early stages of growth development

Running title: Oilseed rape-legume mixtures early benefits.

Thaïs Génard^{1,2,3}, Philippe Etienne^{1,2,3}, Sylvain Diquélou^{1,2,3}, Jean-Claude Yvin⁴, Cécile Revellin⁵, Philippe Laîné^{1,2,3*}.

¹Normandie Université, Caen, France

²UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, UNICAEN, Caen, France

³UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, INRA, Caen, France

⁴Centre Mondial d'Innovation, Groupe Roullier, Saint Malo, France

⁵UMR 1347 Agroécologie, INRA, Dijon, France

*Corresponding author: philippe.laine@unicaen.fr ; phone: +33 231 565 374; fax: +33 231 565 360.

Footnotes:

This work conducted through the SERAPIS project was supported by the Regional Council of Lower Normandy, the Regional Council of Brittany and the European Regional Development Fund (ERDF) and Timac Agro International.

Submitted for publication to Plant and Soil.

Abstract

Background and Aims: In this study we tested whether legumes can improve the growth and N and S nutrition of oilseed rape and compared the effect of mixtures on legume N-fixation and soil N-resources.

Method: We consider oilseed rape monocrops using one (R) or two plants (RR) per pot and mixtures with lupine, clover or vetch grown in low N conditions.

Results: The R monocrop was the most relevant control, with the RR monocrop showing a significant growth delay (four leaf ranks difference). Plant biomass, and the N and S contents of oilseed rape grown in mixtures were maintained. Compared to the monocrop, the proportion of N derived from the atmosphere was increased by 34, 140 and 290% in lupine, clover and vetch, respectively. In mixture, both clover and lupine maintained the soil N pool (0.76 and 0.63 g.kg⁻¹ versus 0.5 g.kg⁻¹ in other treatments). Legumes suffered from competition for soil S resulting in a decrease of 40% in their S content compared to the monocrop. Compared to other treatments, SPAD values of oilseed rape mixed with clover were significantly higher in the oldest leaf ranks (from 6 to 9).

Conclusion: In our conditions, mixing legumes with oilseed rape is relevant to reduce N fertilization and improve nutrition and growth of oilseed rape.

Key words

Biological Nitrogen Fixation, *Brassica napus* L., legume, mixtures, sulphur.

Abbreviations

BNF: biological nitrogen fixation

IRMS: Isotope-Ratio Mass Spectrometry

%Ndfa: percentage of legume N derived from the biological fixation of atmospheric nitrogen.

I. Introduction

Excessive use of nitrogen fertilizers in intensive agricultural systems has affected the balance of the global nitrogen (N) cycle, resulting in negative environmental impacts. In most intensive monocrops, the inefficient use of nitrogen fertilizers can lead to N losses by denitrification and leaching into the environment. For example, nitrate leaching can be responsible for the eutrophication of waters while the nitrous oxide produced by denitrification plays an important role in ozone depletion, and both of these adversely affect climate and human health (Galloway *et al.*, 2003). Thus, new cultural practices must be developed in order to decrease N inputs and improve the agro-environmental balance of this crop.

In this context, intercropping through the process of biological N fixation (BNF) by legumes (Fabaceae) offers an environmentally sustainable source of N and can partly substitute or replace external N inputs (Garg *et al.*, 2007; Peoples *et al.*, 2009). Intercropping is defined as the growth of two or more crops in proximity in the same field during a growing season to promote interaction between them (Willey *et al.*, 1979). Previous studies have demonstrated that growing legumes with a cereal crop has a positive impact on yield, yield stability and the grain N content of the cereal (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001a; Jensen *et al.*, 1996a). Indeed, it has been frequently observed that cereal-legume mixtures offer improvements in the use of N resources (Vandermeer, 1989; Loreau *et al.*, 2001), mainly due to the fact that species do not compete for the same resource niche (located in either the soil or as dinitrogen N₂) at the same time and in the same space (Hauggaard-Nielsen, 2001a; Bedoussac and Juste, 2010a). For example, in cereal-pea mixtures, a cereal with a high N requirement is more competitive for soil mineral nitrogen due a deeper and faster growing root system and the N nutrition of the legume depends mainly on symbiotic fixation of dinitrogen (N₂) (Jensen *et al.*, 1996a; Corre-Hellou *et al.*, 2007; Bedoussac and Juste, 2010b). Many studies using different ¹⁵N-labelling methods have demonstrated that legumes can deposit a significant amount of N into the soil, which can be transferred from the legume to the non-fixing neighbouring plants (for review: Fustec *et al.*, 2010; Chalk *et al.*, 2014). It is also well documented that intercropping of legumes and cereals increases the efficiency of BNF compared to a monocrop (Jensen *et al.*, 1996b; Xia *et al.*, 2004). Moreover, the percentage of legume N derived from the biological fixation of N₂ (%Ndfa) is higher in low N input than in high N input systems (Jensen *et al.*, 1996a; Corre-Hellou *et al.*, 2007). Owing to this optimized use of resources, legume-cereal intercropping may sustain the yield of both crops under low N inputs (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001b, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Naudin *et al.*, 2010; Peltzer *et al.*, 2012). For example, Pelzer *et al.* (2012) have shown that pea–wheat intercrops allow maintenance of wheat grain production and require less than half of the nitrogen fertilizer compared to wheat grown alone.

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an important agricultural crop that requires a large amount of N and sulfur (S) inputs to maintain yield and the quality of harvest products (Colnenne *et al.*, 1998; Dubousset *et al.*, 2010; D'Hooghe *et al.*, 2014). Although oilseed rape is considered a nitrophilic plant, it is characterized by a low N use efficiency with only half the N derived from fertilizers recovered in the harvested seeds (Schjoerring *et al.*, 1995). These N (150-250 kg.ha⁻¹: Rathke *et al.*, 2006) and S (30-50 kg.ha⁻¹: Pedersen *et al.*, 1998) fertilizations are crucial and are performed at the beginning of spring at the bolting stage of oilseed rape to promote efficient growth, pod filling and yield. Some field experiments conducted on two mustard species (*Brassica campestris* Var. Toria and *Sinapis alba* L. cv. Gisilba) mixed with legumes have not shown any benefit to mustard yield compared with mustard as a sole crop (Waterer *et al.*, 1994; Banik *et al.*, 2000). However, Jamont *et al.* (2013a) have shown that intercropping faba bean (*Vicia faba* L. spp. *minor* cv. Divine) with oilseed rape under low N-conditions has a positive effect on dry weight and N contents in oilseed rape mainly due to the niche complementarity between the both species in sharing soil N resources. Cortes-Mora *et al.* (2010) have also shown that the yield and N contents of some *Brassica* species were significantly greater in legume-supported intercrops than when monocropped. In addition, these authors have detected N transfer from the legume to the *Brassica* species at the early stages of growth. Accordingly, mixing legumes with oilseed rape seems to be relevant (especially at the bolting stage of oilseed rape) to reduce the amount of N fertilizer or to improve oilseed rape nutrition in low N conditions. However, although recent results demonstrate benefits of legumes on *Brassica* yield, *Brassica*-legume mixtures still remain sparsely documented and require more knowledge of their practical application.

In this study, three legume species (lupine, clover and vetch) were used to examine the suitability of legumes in mixtures with oilseed rape in low N conditions. The first aim of this study was to evaluate whether combining oilseed rape with legumes can improve its growth and mineral nutrition (especially N and S) compared to two types of oilseed rape monocrops that considered either one or two plants per pot (R and RR) to determine their relevance as controls. The second aim was to compare the effect of mixtures on the N₂ fixation capacity of legumes (%Ndfa) and on soil N resources.

Table 1: Bacterial species and strains of the host legumes.

Strain	Specie	Host legume	References
T354 (MSDJ1056)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium incarnatum</i> var. Cegalo	Mazurier, 1989
P221 (MSDJ0469)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Vicia sativa</i> var. Nacre	Laguerre <i>et al.</i> , 1992
LL13 (MSDJ718)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lupinus albus</i> var. Orus	Laguerre <i>et al.</i> , 1994

II. Materials and Methods

II.1. Plant growth conditions and experimental design

Seeds of oilseed rape (*Brassica napus* var. Boheme) and three legumes that differ in their growth habit: upright lupine (*Lupinus albus* var. Orus), ground-covering clover (*Trifolium incarnatum* var. Cegalo) and climbing vetch (*Vicia sativa* var. Nacre), were germinated in a greenhouse on perlite over demineralized water for 1 week in the dark, followed by 2 weeks in the light. After first leaf emergence, seedlings were planted in pots (50 cm height and 14 cm diameter) filled with 12 kg of sand-soil mixture - to generate low N conditions and limit flush of N mineralization - (v/v: 2/1) with the following parameters: sand: quartz BB 0.8-1.4 mm diameter (SIBELCO, Paris, France) and soil: pH 6.1, clay 36.7%, silt 41.3%, total N 0.32% and total S 0.1%. The pots were watered exclusively with deionized water and brought back to initial weight every day to maintain initial soil humidity, which was fixed at 25%. Plants were grown with a thermoperiod of 20/17°C day/night and a photoperiod of 16 h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 350 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at canopy height. Seven plant combinations were established: two types of oilseed rape monocrops (Gibson *et al.*, 1999) of either one (R) or two oilseed rape plants (RR) per pot ; lupine (L), clover (C) and vetch (V) as monocrops; and oilseed rape-lupine (RL), oilseed rape-clover (RC) and oilseed rape-vetch (RV) in mixture systems. Legume monocrops consisted of two plants per pot and mixture systems consisted of one oilseed rape plant and one legume per pot.

II.2. Growth of rhizobium strains and plant inoculation conditions

To enhance the BNF of legumes in controlled growth conditions (see below), the unsterilized soil (to preserve native soil biota, especially microorganisms involved in N and S mineralization processes) was inoculated with specific strains of bacteria of each host legume (Mazurier *et al.*, 1989; Laguerre *et al.*, 1992, 1994; **Table 1**). The different strains were provided from the core collection of UMR1347 Agroécologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Dijon, France and were conserved at -80°C in Bergensen's medium (Bergensen, 1961). Before plant inoculation, each bacterial strain was grown on 100 ml of Bergensen's medium modified by the addition of 0.2 g.l⁻¹ of yeast extract and adjusted to pH 6.8 under sterilized conditions. This culture medium was incubated for 48 h at 28°C. Bacterial cultures were suspended in 100 ml of sterile deionized water and vortexed to obtain homogeneous inoculum suspensions. Each inoculum

suspension was applied to the soil of each host legume (5 ml per pot) at the time of seedling transplantation in the greenhouse.

II.3. Plant harvest

All plants were harvested after three months of growth. The shoots were separated from the roots. For each oilseed rape plant, leaves were separated based on their time of emergence (defined as the leaf rank number) and the leaf rank number incremented from the oldest to the younger leaves. According to Wenying and Kaikua (2012), a SPAD-502 chlorophyll meter (Minolta, Tokyo, Japan) was used as a relevant non-destructive method to estimate leaf chlorophyll contents of oilseed rape. In the monocrops, the roots of the two plants were pooled in the same sample. In the mixtures, the roots of each plant (oilseed rape and legume) were separated. Root samples were carefully washed with deionized water. In each pot, aliquots of soil from which roots were carefully removed (using a magnifying glass) were collected. Each sample (plant organs and soil) was weighed and oven dried (60°C) for DW determination and ground to fine powder before total N, ^{15}N and total S analysis.

II.4. Total N, $\delta^{15}\text{N}$ and total S analysis

Aliquots of 5 or 20 mg of DW of each plant organ or soil sample were placed into tin capsules for isotopic analysis, respectively. The total N and S contents and the isotopic ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ were determined by analysing samples with a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS) (Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). The total N or S amount (N_{tot} or S_{tot}) in each organ was calculated as:

$$N_{\text{total}} \text{ (or } S_{\text{total}}) = \%N \text{ (or \%S)} \times \text{DW} / 100$$

The $\delta^{15}\text{N}$ was calculated as:

$$\delta^{15}\text{N} = (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}} \times 1000$$

Where R_{sample} and R_{standard} are the isotopic ratios $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ of the sample and standard (atmospheric dinitrogen gas, 0.3663 Atom % ^{15}N), respectively.

II.5. Determination of the N_2 fixation capacity of each legume species (β value)

To determine the N_2 fixation capacity of each legume species, specific plant culture conditions were used. The β parameter is defined as the $\delta^{15}\text{N}$ value of legumes grown in sand with a nutrient solution free of nitrogen and is a prerequisite for the calculation of the proportion of a

legume's %Ndfa, as previously described by Shearer and Khol (1986). Seedlings of legumes (lupine, clover and vetch) were planted in pots (2 L) perforated at the base (free-draining) and filled with 2.5 kg of sand. Legumes were inoculated with specific rhizobium strains (**Table 1**). Each pot was watered for 40 days with 0.25 L day⁻¹ of N-free nutrient solution containing: K₂SO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, K₂HPO₄ 0.15 mM, CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 0.5 mM, EDTA 2NaFe 0.2 mM, H₃BO₃ 14 μM, MnSO₄ 5 μM, ZnSO₄ 3 μM, CuSO₄ 0.7 μM, Na₂MoO₄ 0.7 μM, CoCl₂ 0.1 μM. After 40 days, plants were harvested, weighed and oven dried (60°C) for DW determination and ground to fine powder before IRMS analysis to determine the δ¹⁵N corresponding to the β. Three replicates (three independent pots) of each legume were considered for this experiment.

II.6. Determination of the %Ndfa by legume species grown in monocrops or in mixtures with oilseed rape

%Ndfa was determined from plants grown in pots filled with a sand-soil mixture (w/w: 2/1) as previously described, using the natural abundance δ¹⁵N method according to the following formula given by Shearer and Khol (1986):

$$\%Ndfa = (\delta^{15}N_{\text{non-fixing plant}} - \delta^{15}N_{\text{legume}}) / (\delta^{15}N_{\text{non-fixing plant}} - \beta) \times 100$$

Where:

δ¹⁵N_{non-fixing plant} is the δ¹⁵N value of oilseed rape monocrops (R and RR) grown in a sand-soil mixture, δ¹⁵N_{legume} is the δ¹⁵N value of legumes grown in monocrops or in mixtures with oilseed rape in a sand-soil mixture.

II.7. Data and statistical analysis

The experiment was performed with five replicates except for the Ndfa determination, which was performed with three replicates. The resulting variations in data are expressed as the means ± S.E for n=5 (or n=3 for %Ndfa determination). As our main purpose was to compare individual intercrop systems to controls (not to check for general significant trends between 5 crops), we performed Student's t tests between each intercrop and control after verifying compliance of normality.

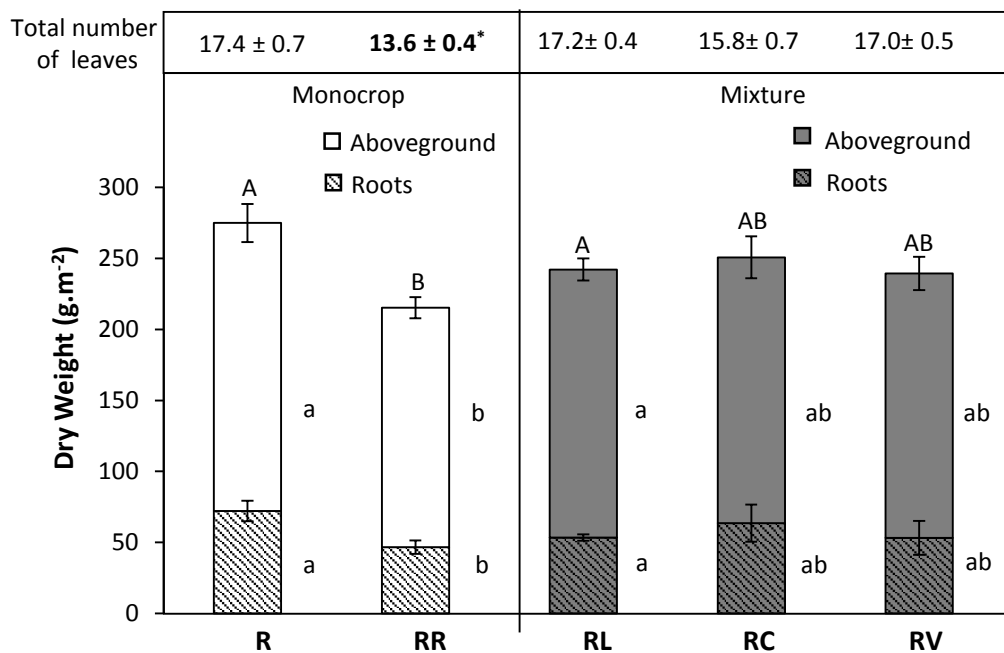


Figure 1: Total number of leaves (in the upper part) and dry weights (g.m⁻²) of *Brassica napus* grown as monocrops with one (R) or two oilseed rape plants per pot (RR) and in mixtures with lupine, clover and vetch (RL, RC and RV, respectively) at three month after sowing. Vertical bars indicate ± S.E. Different capital and lowercase letters indicate that the mean values of total DW, and root- and shoot-DW, respectively are significantly different at p < 0.05 (n=5). * indicates that the total number of leaves is significantly different at p < 0.05.

III. Results

III.1. In mixture, the growth of oilseed rape is unaffected

In monocrops, the total dry weight (DW) of oilseed rape grown alone (R) is significantly higher than the total DW of two oilseed rape plants grown together (RR; **Fig. 1**). The same trend was noticed for both aboveground and root DW. In the RR monocrop, the total leaf number of oilseed rape was significantly lower than the R monocrop or oilseed rape grown in mixtures (RL, RC, RV), where the values were all similar. These results suggest a delay in the growth of oilseed rape in the RR monocrop compared to the R monocrop and mixtures. Among all mixtures, only oilseed rape mixed with lupine (RL) showed a significantly higher biomass than the RR monocrop ($p < 0.05$; **Fig 1**). The DW of oilseed rape grown in as the R monocrop or with legumes was similar, regardless of legume species.

III.2. Oilseed rape grown with clover shows higher leaf SPAD values

For older leaves (leaf ranks 6 to 9), SPAD values from the RR monocrop were significantly higher than those from the R monocrop (**Fig. 2**). Alongside the biomass data (**Fig. 1**), this result confirms a different stage of growth between oilseed rape in RR and R monocrops. Consequently, the R monocrop was mainly retained to compare SPAD value of oilseed rape mixed with legumes. For all leaf ranks (6 to 12), RC oilseed rape leaves showed higher SPAD values than R monocrops (**Fig. 2**). For example, the SPAD values of leaf rank 6 were 28.8 ± 3.8 for RC *versus* 7.9 ± 0.6 for R. The SPAD values of oilseed rape from RL and RV were not significantly different to those determined from the oilseed rape R monocrop (**Fig. 2**).

III.3. The BNF of legumes is increased in mixtures

The %Ndfa expresses BNF according to the legume species ($\delta^{15}\text{N}$ values of oilseed rape and legumes in both monocrops and mixtures are provided in **supplemental data 1**). In monocrops, it was significantly higher in lupine (58.8 ± 5.3) than clover (16.5 ± 2.1) and vetch (17.7 ± 4.3) (**Fig. 3**). In mixtures, %Ndfa values were 79.0 ± 5.2 , 39.2 ± 7.2 and 69.0 ± 8.2 for lupine, clover and vetch, respectively. These data showed that in mixture, the BNF values were significantly increased ($p < 0.01$) by 34, 140 and 290% compared with their respective monocrop.

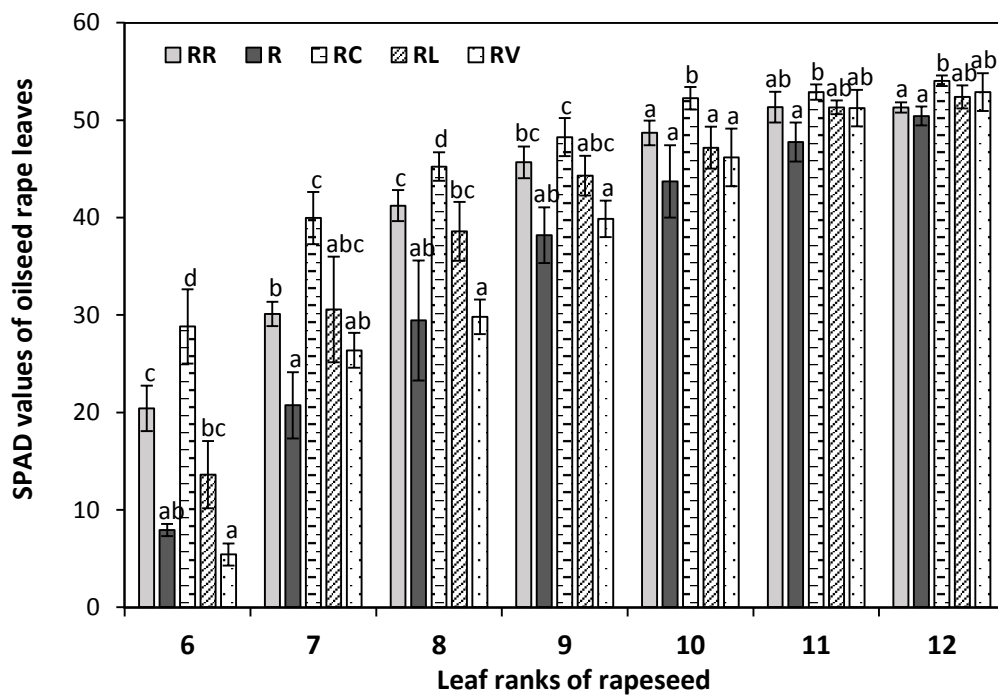


Figure 2: SPAD values of oilseed rape leaves (leaf ranks 6 to 12) in monocrops with one (R) or two (RR) oilseed rape plants per pot and in mixture with clover (RC), lupine (RL) and vetch (RV). Vertical bars indicate \pm S.E. (n=5). Different letters (a, b and c) indicate significant differences between crop types with $p < 0.05$.

III.4. Lupine or clover maintains oilseed rape N contents and preserves soil N resources

The oilseed rape N content was significantly higher in the RR monocrop ($2.2 \pm 0.1\%$) than in the R monocrop ($1.9 \pm 0.1\%$; **Fig. 4A**) but because the RR monocrop was characterized by a significantly lower DW (**Fig. 1**), the total N taken up by the two monocrops was similar. In mixture, regardless of the legume, the N contents of oilseed rape (approximately 2%) were not significantly different from the monocrops (R or RR; **Fig. 4A**).

The total residual N amounts in soil from the two oilseed rape monocrops (R and RR) were similar ($0.5 \pm 0.1 \text{ g.kg}^{-1}$) and not significantly different from the soil of oilseed rape-vetch (RV) mixture (**Fig 4B**). Conversely, the total residual amount of N from the soils of oilseed rape-lupine (RL) or oilseed rape-clover (RC) was significantly higher than the others (0.76 ± 0.07 and $0.63 \pm 0.03 \text{ g.kg}^{-1}$, respectively).

III.5. In mixtures, the total S contents decreased in legumes but not in oilseed rape

The total S contents of oilseed rape were not significantly different (approximately 0.14%) between the monocrops and mixtures (**Fig. 4C**). The total residual amount of S in the soil was also not affected by crop type and showed the same value (approximately 0.08 g.kg^{-1} ; **Fig. 4D**). On the other hand, the total S contents of lupine, clover and vetch were significantly lower in mixtures than in monocrops with decreases of 40, 45 and 40 %, respectively (**Fig. 5A**). These decreases in the total legume S contents were not due to S dilution associated with an increase in biomass (**Fig. 5B**), and therefore would be linked to a decrease in S taken up by legumes. All these results suggest that, in mixture, oilseed rape is more efficient at taking up S than legumes, thereby limiting the soil S availability for the legumes, which may suffer from competition for the available S.

IV. Discussion

IV.1. The oilseed rape R monocrop as a relevant control

This study showed that the two oilseed rape monocrops (R and RR) behave differently. Compared to R and mixtures, the RR monocrop showed a delay in development that was manifested by a reduction in the number of leaf ranks (-4 leaf ranks) and lower dry weights (**Fig. 1**). The higher SPAD values in the bottom leaves from the RR monocrop indicated that these leaves have higher chlorophyll content (compared to those from the R monocrop) and thus confirms this delay of growth. These data showed that in our growth conditions (*e.g.* low N input), the R monocrop seems to be the most accurate control to compare oilseed rape performance without artifacts due to differences in the growth stage. The smaller biomass in the RR monocrop may be

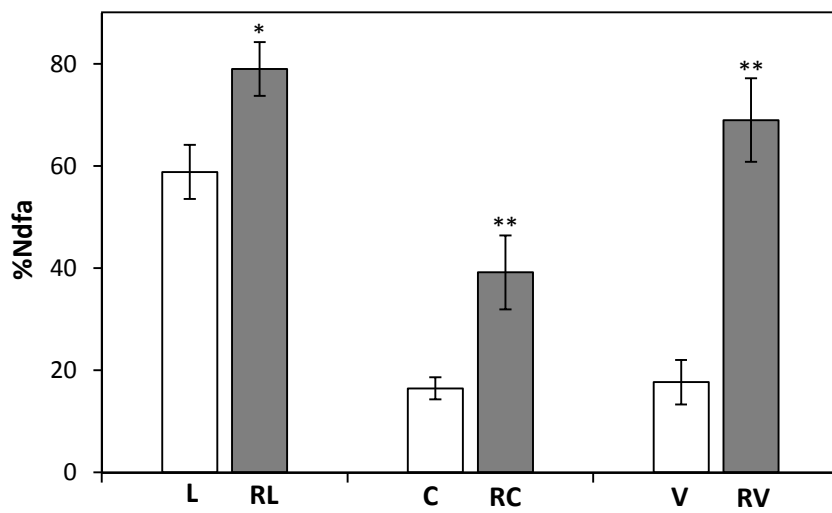


Figure 3: Percentage of nitrogen derived from the atmosphere (%Ndfa) in lupine (L), clover (C), and vetch (V) grown as monocrops (white bars) or in mixtures (grey bars) with oilseed rape (RL, RC and RV). Vertical bars indicate \pm S.E. (n=5). * and ** indicate significant differences between monocrops and mixtures, with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

explained by intraspecific competition in particular, which constrained light access. Nutrient availability did not seem to be limiting as the same N and S amounts were taken up by both oilseed rape monocrops suggesting no competition for soil nutrient resources (Figs. 4A and 4C). Numerous studies considering mixtures use RR monocrops as controls and express results per plant (e.g. dry weight per plant) without monitoring leaf ranks and/or total plant biomass per pot (Cortés-Mora *et al.*, 2010; Jamont *et al.*, 2013a). In these conditions, it is difficult to know if results indicating an increase in the performance of non-legume plants in mixtures were not caused by a delay in growth in the control monocrop due to intraspecific competition.

Therefore, by taking into account the most accurate control (being the R monocrop, which was at the same growth stage as oilseed rape in mixtures), our results show the effects of mixtures on the plant-soil complex during these early developmental stages. Based on observed changes in the physiological state of oilseed rape and/or the nitrogen pools of plants and soil, the potential benefits of mixtures on subsequent development stages are evident.

IV.2. Effect of legumes on oilseed rape growth

Our study has shown that intercrop yields were not significantly different from those of monocrops (Fig. 1). This result is agreement with previous work showing a maintenance (or a slight increase) of oilseed rape dry weight when grown in mixture with faba bean (Jamont *et al.*, 2013a). This is a key point, as intercropping of Brassicaceae, such as mustard with pea or lentil, decreases biomass compared to the sole crop (Banik *et al.*, 2000).

N taken up by the crop followed the same trend as DW production. Compared to control plants, no benefit of mixtures was noted for either the N contents or the plant N amounts, suggesting that the increases in N shown by other studies may be stage dependent and occur in later growth stages (Cortés-Mora *et al.*, 2010; Jamont *et al.*, 2013a). However, niche separation for N acquisition between oilseed rape and legumes was inherent as growing in mixtures significantly promoted BNF by the legumes.

One of the most interesting findings is the higher leaf SPAD values observed in oilseed rape grown in mixtures with clover. This result suggests a delay in leaf chlorophyll degradation (especially for older leaf ranks), which can be explained by a delay in leaf senescence. As proposed by some authors for *Brassica napus*, preservation of leaf chlorophyll content may promote an increase in the life span of leaves and an improvement in N remobilization efficiency (Desclos-Théveniau *et al.*, 2014) and/or allow a reduction in the asynchronism observed between the leaf remobilization of N and the pod filling steps (Malagoli *et al.*, 2005b).

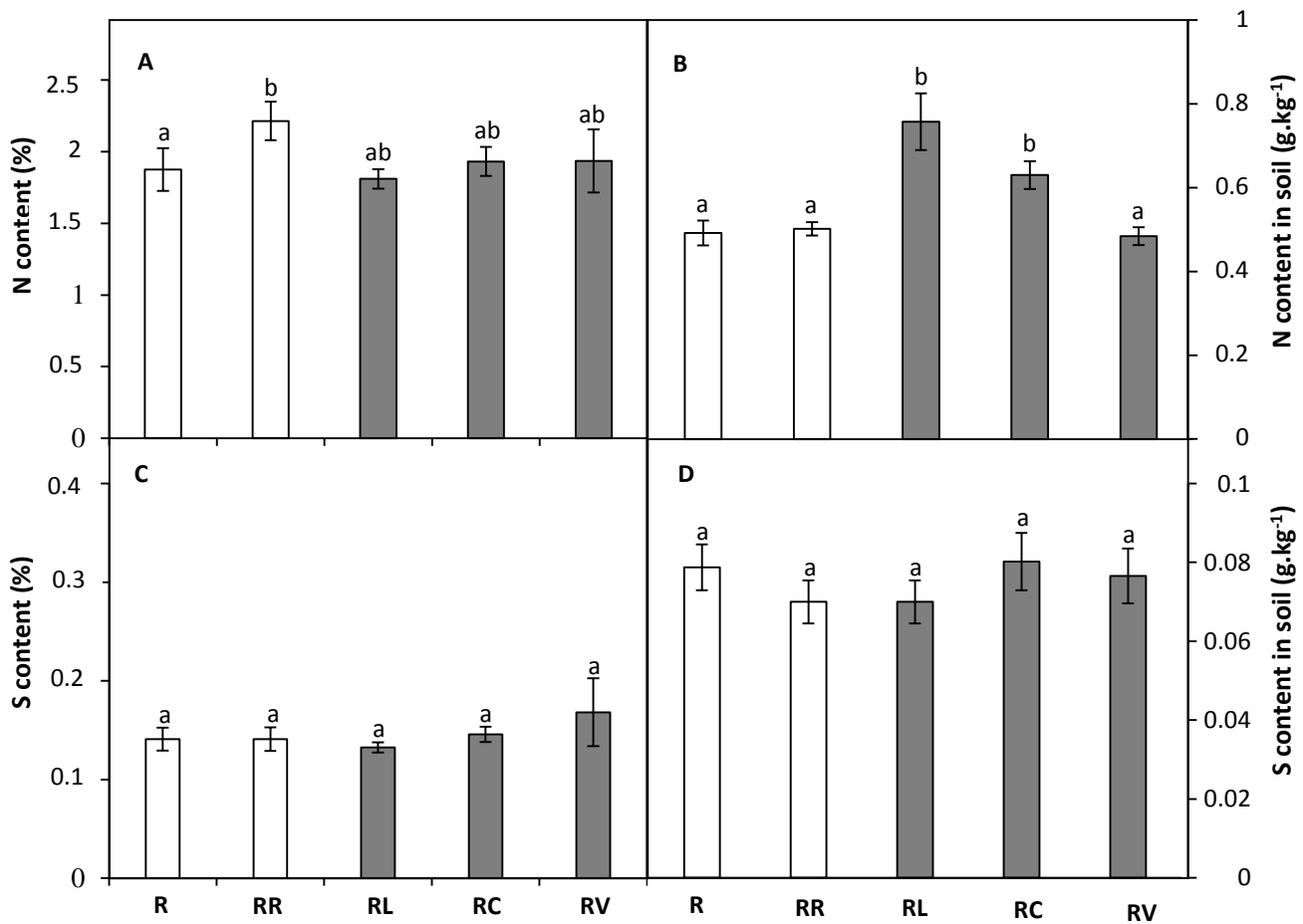


Figure 4: N (A) and S (C) contents (%) of oilseed rape and N (B) and S (D) contents in soil (g.kg⁻¹ of soil) in monocrops (white bars) with one or two oilseed rape plants per pot (R and RR, respectively) or in mixtures (grey bars) with lupine, clover and vetch (RL, RC and RV, respectively) at harvest time. Vertical bars indicate ± S.E. (n=5). Different letters indicate that mean values are significantly different at p < 0.05.

IV.3. Effect of oilseed rape on the BNF of legumes and soil N resources

In this study lupine showed the greatest %Ndfa compared to clover and vetch, regardless of the crop type (mixture or monocrop). These %Ndfa values were in the same range as those reported by Howeison *et al.* (1998) for white lupine at maturity: 68–85% in Australia, 44–92% in Germany and 80% in France. This high BNF of lupine compared to other legumes may be explained by its low sensitivity to and low nitrogenase inhibition by mineral N available in the soil (Serrano and Chamber, 1990; Lucinski *et al.*, 2001; Goergen *et al.*, 2009). Furthermore, the %Ndfa of lupine, clover and vetch in mixtures with oilseed rape was significantly higher than in their respective monocrops (+ 34%, + 140% and + 290%, respectively, Fig. 3). Moreover, all results agree with previous work showing an increase in legume %Ndfa in low N input systems (Jensen *et al.*, 1996a; Corre-Hellou *et al.*, 2006, 2007). For example, Corre-Hellou *et al.* (2006) have shown that %Ndfa increased on average by 21% in pea intercrops compared to pea as a sole crop. In our study, it can be suggested that the increase in the legume %Ndfa observed in mixtures could be due to the presence of *Brassica napus*, which requires higher amounts of NO₃⁻ for its growth than cereals. As a consequence, the high nitrate requirements of *Brassica napus* decreased the nitrate concentration in the soil and in turn increased the %Ndfa. This hypothesis is also supported by previous studies showing that N fertilization inhibits the N₂ fixation process (Waterer *et al.*, 1994; Macduff *et al.*, 1996).

At harvest time we found that the soil N contents were significantly greater in oilseed rape-lupine (RL) and oilseed rape-clover (RC) mixtures than in other crops. N amounts were approximately 50% (0.76 g.kg⁻¹) and 25% (0.63 g.kg⁻¹) higher than in controls and oilseed rape-vetch intercrops, respectively (Fig. 4B). These two mixture systems maintained higher soil N pools that could mostly benefit oilseed rape (as legumes are mostly dependent on N₂) for later growth stages, and especially during pod filling. Such an effect on soil pools was previously demonstrated in perennial grass-legume grasslands in which legumes increased the soil N pool to the benefit of grasses growing in their neighbourhood (Gylfadottir *et al.*, 2007; Pirhofer-Walzl *et al.*, 2012). Certainly, legumes can deposit significant amounts of N into the soil *via* N rhizodeposition leading to enrichment of N in soils and in intercropped plants (Jensen, 1996b; Jensen *et al.*, 1996c; Kahn *et al.*, 2002; Galloway *et al.*, 2003; Mahieu *et al.*, 2007). Thus, from our results, it is possible that lupine and clover have the highest capacity to exude N compounds for uptake by *Brassica napus*, which has also been described by Cortés-Mora *et al.* (2010) at the early stages of growth.

Two hypotheses may explain why this high N pool in the soil associated with lupine and clover was not used by oilseed rape. Firstly, it is possible that N compounds exuded from lupine or clover are taken up preferentially by oilseed rape and it therefore has less need of N from the soil

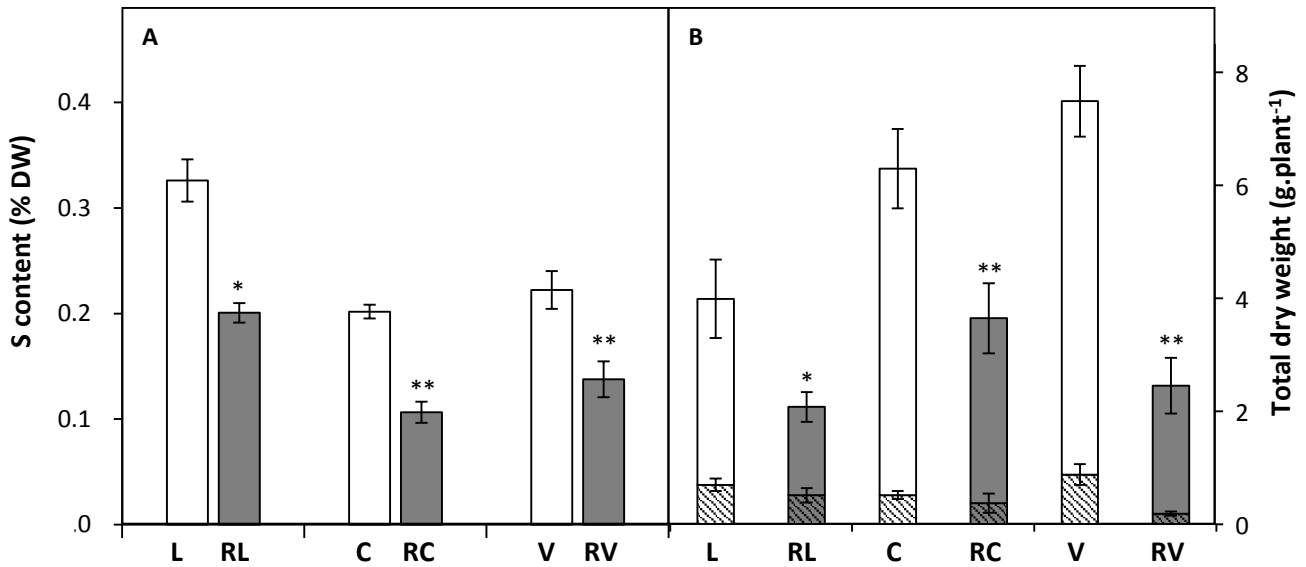


Figure 5: S content (% of DW) (A) and total dry weight (g.plant⁻¹) (B) of lupine, clover, and vetch grown in monocrops (white bars) (L, C and V, respectively) or in mixtures with oilseed rape (grey bars) (RL, RC and RV). The hatched histograms represent the root DWs of legumes. Vertical bars indicate ± S.E. (n=5). * and ** indicate significant differences between monocrops and mixtures, with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

to satisfy its growth. Secondly, the exuded N compounds may be unavailable to oilseed rape (in their entirety or partly) and may be temporarily stored in the soil before mineralization. Thus, this resulting elevated N pool may be available for later growth stages, from the bolting stage onwards, which then allows farmers to decrease N fertilization.

IV.4. Competition for soil S resources

In this work, the S contents of oilseed rape were the same regardless of the crop (Fig. 4C). This result showed that oilseed rape, known for its high S requirement for growth, took up the same S amount irrespective of the presence of legumes. Moreover, the S contents and dry weights (Fig. 5) of legumes were lower in mixtures than in monocrops, suggesting that legumes suffer from oilseed rape competition when accessing soil S resources. Indeed, oilseed rape with its particularly high need for S (McGrath and Zhao, 1996), as is the case for the Brassicaceae in general, is a strong competitor for it. Nevertheless, legumes also require high S availability, especially to achieve a high level of N₂ fixation (Scherer and Lange, 1996; Varin *et al.*, 2010). Even though an increase in the %Ndfa of legumes was observed in mixtures (Fig. 3), it is possible that an increased S input could further enhance this parameter. In fact, it has been shown that S fertilization restores and even preserves N₂ fixation under high N input conditions (Scherer and Lange, 1996; Habtegebrial *et al.*, 2007; Tallec *et al.*, 2008, 2009). Thus, S fertilization may be an efficient way to improve the agronomic potential of *Brassica*-legume mixtures.

V. Conclusions

To our knowledge this work is the first to study the effect of different legume-*Brassica napus* mixtures that considers the type of oilseed rape monocrops (R and RR). From this comparison we observed that, in our growth conditions, the oilseed rape R monocrop was more relevant than the RR monocrop, which shows a delay in growth. Oilseed rape-legume mixtures maintained a high level of DW production and the uptake of both N and S in oilseed rape indicated the particular benefit of lupine and clover. In fact, in both mixtures the soil N pool was substantially maintained, thanks to a significant increase in the %Ndfa of the legumes. Moreover, clover enabled an increase in SPAD values of *Brassica napus*, suggesting a preservation of the photosynthetic capacity and allowing N storage in these organs for a longer time. Accordingly, in low N conditions, combining legumes with oilseed rape seems to be relevant for reducing the amount of N fertilizer or improving the nutrition of oilseed rape during the growth cycle, especially if S inputs are optimized to minimize interspecific competition.

Acknowledgments

The authors are most grateful to Pr A. Ourry for his scientific advice and the SERAPIS project management. This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany, the European Regional Development Fund and CMI (Centre Mondial d'Innovation of Roullier group). The authors thank the seed producers, Caussade-Semences for seeds of clover and lupine, and Jouffray-Drillaud Eco Performance for vetch seeds. The authors thank Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript.

Supplemental data

Supplemental data 1 : Delta ^{15}N values (‰) of lupine, clover, vetch (L, C, V) and oilseed rape grown in monocrops with one (R) or two (RR) plants per pot or in mixtures (RL, RC and RV). Each value represents the mean \pm S.E. for n=5.

Delta ^{15}N			
	Legumes		Oilseed rape
L	4.367 \pm 0.542	R	10.383 \pm 0.460
C	8.829 \pm 0.203	RR	10.190 \pm 0.439
V	8.872 \pm 0.371		
RL	2.307 \pm 0.537	RL	10.317 \pm 0.356
RC	6.683 \pm 0.683	RC	11.263 \pm 0.536
RV	4.484 \pm 0.700	RV	11.570 \pm 0.665

Chapitre 3

**Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L.,
Trifolium incarnatum L. and *Vicia sativa* L.
contribute differently to
rapeseed (*Brassica napus* L.)
nitrogen nutrition**



Chapitre 3

Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article intitulé «**Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition**», publié dans la revue Heliyon, doi :10.1016/j.heliyon.2016.e00150.

Préambule

Les résultats précédents ayant soulevé l'hypothèse d'une contribution de l'azote fixé par le lupin et le trèfle à la nutrition du colza (et donc un transfert d'azote vers le colza), nous avons, au stade rosette du colza, **quantifié ce potentiel transfert d'azote au sein des 3 associations colza-lupin, colza-trèfle et colza-vesce**. Cette expérimentation a été conduite en conditions contrôlées à l'aide d'un dispositif « split-root system » couplé à un marquage au ¹⁵N.

Principaux résultats :

- Après 3 mois de culture, un transfert d'azote significatif a été mesuré du lupin et du trèfle vers le colza alors qu'aucun transfert significatif de la vesce vers le colza n'a été détecté.
- L'azote transféré par le trèfle et le lupin, ne permet pas d'améliorer la croissance (biomasse et quantité totale d'azote) du colza par rapport à sa monoculture.
- Dans nos conditions expérimentales, contrairement au trèfle et à la vesce, le lupin privilégie la fixation de l'azote atmosphérique à l'absorption racinaire d'azote minéral du sol pour sa nutrition azotée.

En conclusion, le trèfle et le lupin, présentant à la fois de fortes capacités de fixation d'azote atmosphérique et des transferts significatifs d'azote vers le colza, seraient à privilégier dans le cadre des associations de cultures visant à utiliser moins d'intrants azotés.

Received:
19 July 2016
Revised:
22 August 2016
Accepted:
26 August 2016

Heliyon 2 (2016) e00150



Nitrogen transfer from *Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. and *Vicia sativa* L. contribute differently to rapeseed (*Brassica napus* L.) nitrogen nutrition

Thaïs Génard^{a,b,c}, Philippe Etienne^{a,b,c}, Philippe Laîné^{a,b,c,*}, Jean-Claude Yvin^d,
Sylvain Diquélou^{a,b,c}

^a Normand Université, Caen, France

^b UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, UNICAEN, Caen, France

^c UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutriments N, C, S, INRA, Caen, France

^d Centre Mondial d'Innovation, Groupe Roullier, Saint Malo, France

* Corresponding author.

E-mail address: philippe.laine@unicaen.fr (P. Laîné).

Abstract

Nitrogen (N) transfer is well documented in legume-cereal intercropping but this is less often reported for legume-*Brassica* intercrops even though *Brassica* crops require higher levels of N fertilizers. The present study was carried out to quantify N transfer from legumes (*Lupinus albus* L., *Trifolium incarnatum* L. or *Vicia sativa* L.) to rapeseed (*Brassica napus* L.) using the split-root ¹⁵N-labelling method. After three months we observed that legumes did not alter the growth of rapeseed. Vetch showed the lowest growth and demonstrated low ¹⁵N shoot to root translocation and no significant N transfer to rapeseed. In contrast, significant ¹⁵N enrichment was found in lupine and clover and ¹⁵N was transferred to the associated rapeseed plants (around 6 and 4 mg N plant⁻¹, respectively), which contributed 2 to 3% of the rapeseed total N. Additionally, the data revealed that N₂ fixation dominated the N nutrition in lupine despite the high N level provided in the donor compartment,

suggesting a greater niche segregation between companion plants. Based on the results of this study we suggest that intercropping can be a relevant contributor to rapeseed N nutrition. Among the three legumes tested, clover and lupine seemed to be the best intercropping candidates.

Keyword: Plant biology

1. Introduction

To reduce the use of nitrogen (N) fertilizers and their adverse economic and environmental impacts, N₂-fixing legumes grown in rotations or under intercropping are considered an alternative and sustainable way to introduce N into agroecosystems (see review of Fustec et al., 2010). Indeed, legumes contribute to the enrichment of soil N *via* biological N₂-fixation and N rhizodeposition and facilitate N acquisition in companion plants through the transfer of N (Ledgard and Steele, 1992; Høgh-Jensen and Schjoerring, 2000). Indeed, some authors have shown that in grass-legume mixtures, legumes increase the soil-N pool and that the grasses can benefit from the N provided by legumes (Gylfadóttir et al., 2007; Pirhofer-Walzl et al., 2012). Nitrogen can be transferred within plant mixtures through different pathways (Fustec et al., 2010). Except for *Brassicaceae* and *Plantaginaceae* which are never mycorrhized, N transfer can occur *via* mycorrhizal fungi interconnecting the root systems of both species and indirectly through N rhizodeposition and root litter decomposition into the soil followed by uptake by the grass (Johansen and Jensen, 1996; Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001). N rhizodeposition mainly occurs through mineralization of legume litter, or through N root exudation (Ledgard and Steele, 1992; Paynel et al., 2001). Whichever process, the proportion of N transferred from legume to non-legume plants is different between species because they have different N₂-fixation abilities (Ta and Faris, 1987).

In ryegrass-clover mixtures it has been shown that 10% of the N fixed by clover is transferred to the grass and accounts for up 50% of the N in ryegrass (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2000; Rasmussen et al., 2007). The N transfer from white clover to perennial ryegrass has been assessed at between 11 and 113 kg N ha⁻¹ year⁻¹ with a mean of 70 kg N ha⁻¹ year⁻¹ (Ledgard and Steele, 1992; Elgersma et al., 2000). N transfer through exudation of ammonium and amino acids by clover roots followed by N uptake by ryegrass was shown to be a major pathway in young plants (two-months-old) (Paynel et al., 2001; Paynel and Cliquet, 2003). In older plants, the turnover of N in belowground parts is thought to be the main source of transferable N between plants (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2001). Giller et al. (1991) estimated in a greenhouse experiment that up to 15% of the N in N₂-fixing beans could be transferred to intercropped maize.

The transfer of N between the legumes and non-fixing plants is usually quantified by using ^{15}N -enriched methodologies, since any tracer incorporated into the legume and detected in the non-legume receiver plant shows evidence of transfer. Donor legume plants can be labelled by different labelling methods such as $^{15}\text{N}_2$ -labelling (Ta et al., 1989), foliar labelling (Ledgard et al., 1985; Giller et al., 1991), labelling roots induced on the legume stem (Hamel and Smith, 1991), transplanting labelled plants into soil with receiver plants (Tomm et al., 1994), the cotton-wick method in which ^{15}N is provided through the stem (Jamont et al., 2013) or split-root labelling of the legume donor (Jensen, 1996; Van Kessel et al., 1985; Purnamawati and Schmidtke, 2003). For example, using a split-root ^{15}N labelling method Jensen (1996) estimated that almost 19% of the N produced by field peas was transferred to barley grown in mixture. Martensson et al. (1998) also estimated that transfer from pea or red clover (donor plants) accounted for between 3 and 50% of total N in the chicory receiver plant. Wichern et al. (2008) outlined some advantages of the split-root technique. It allows continuous labelling using natural N uptake and assimilation, which should therefore uniformly label all compounds subject to N transfer.

Recent results have demonstrated the benefits of faba bean-rapeseed intercrops (*Vicia faba* L. spp. minor cv. Divine) in terms of dry weight (DW), N content and rapeseed yield, and this is mainly due to the niche complementarity between the two species in sharing soil N resources. Moreover, N transfers from faba bean to rapeseed were detected (about 10%) at the early stages of growth (Cortés-Mora et al., 2010). However, a field study with pea-mustard (*Sinapis alba* L.) intercrops failed to demonstrate significant N transfer from the legume to the non-legume (Waterer et al., 1994). Nevertheless, in a preliminary study, we have shown that rapeseed-legume mixtures maintained the biomass of rapeseed and the N and sulphur (S) contents and that clover in mixture preserved rapeseed leaf chlorophyll content. Moreover, the amount of N in the soil at harvest was significantly higher in rapeseed-lupine and rapeseed-clover mixtures compared to the rapeseed monoculture and rapeseed-vetch mixtures (Génard et al., personal communication).

Using a split-root ^{15}N labelling technique, this study was carried out to determine the effects of three legumes species (Lupine: *Lupinus albus* L., clover: *Trifolium incarnatum* L. and vetch: *Vicia sativa* L.) on rapeseed (*Brassica napus* L.) performances. Thus, it focused on (i) the effect of legume species on rapeseed growth and their ability to grow with rapeseed, (ii) the ability of legume species to take up inorganic N and to translocate N from root to shoot and then shoot to root and (iii) the relative N transfer of these legumes species to rapeseed in order to determine their contribution to rapeseed N nutrition.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design and plant growth conditions

Seeds of three legume species (white lupine, *Lupinus albus* L. var. Orus; Italian clover, *Trifolium incarnatum* L. var. Cegalo and common vetch, *Vicia sativa* L. var. Nacre) and rapeseed (*Brassica napus* var. Boheme) were germinated and grown on perlite over demineralized water for 2 weeks. At this time, the legume radicles were trimmed (upper 1 cm left intact) to stimulate the development of lateral roots. Then the seedlings were transferred to perlite for a further 2 weeks to allow the development of lateral roots before transplantation into a split-root design. This design allows separation of the root system of the legume (donor plant) into two equal root parts, each growing in a specific compartment (Fig. 1; Laîné et al., 1994; Jensen, 1996). For this, lateral roots of legumes were separated into two equal parts using a polyethylene Y tube (internal diameter: 8 mm, length of each branch: 40 mm) so as to direct the two parts of the root system. The first part was placed in a “donor compartment” (called DC) containing four litres of a nutrient solution corresponding to: 1 mM NH_4NO_3 , 1 mM K_2SO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 0.15 mM K_2HPO_4 , 3 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgSO_4 , 0.2 mM EDTA 2NaFe, 14 μM H_3BO_3 , 5 μM MnSO_4 , 3 μM ZnSO_4 , 0.7 μM CuSO_4 , 0.7 μM Na_2MoO_4 , 0.1 μM CoCl_2 . Two weeks after transplantation, this nutrient solution was labelled with $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ (99 atom% ^{15}N). This solution was renewed twice weekly to allow continuous labelling. The second part of the root system was placed in a two litre “receiver compartment” (called RC), in which the roots of the donor plant interacted with roots of rapeseed (receiver) in a silty-clay soil (0.32% total N, 0.10% total S; pH 6.1)/sand (quartz BB 0.8–1.4 mm diameter SIBELCO, Paris, France) mixture (v:v 1/3). Rapeseed plants grown alone in a 2-liters pot filled with a soil/sand mixture were used as control. Both the RC and control plants were watered daily with 60 ml of the nutrient solution described above but deprived of N.

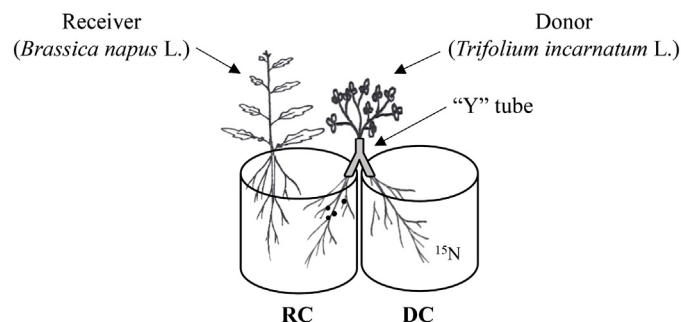


Fig. 1. Experimental unit. DC is the donor compartment; RC is the receiver compartment.

Following the method of Jensen (1996), the soil/sand mixture was not sterilized (to preserve native soil biota, especially microorganisms involved in N mineralization processes) and the RC was inoculated with suitable strains of symbiotic bacteria (Table 1). Before plant inoculation, each bacterial strain was grown on 100 ml of Bergersen's medium (Bergersen, 1961) modified by the addition of 0.2 g yeast extract l⁻¹ and adjusted to pH 6.8 under sterilized conditions and incubated for 48 h at 28 °C. Bacterial cultures were suspended in 100 ml of sterile deionized water and vortexed to obtain homogeneous inoculum suspensions. Each inoculum suspension was applied to the soil of each host legume (5 ml per pot) at the time of seedling transplantation.

This experiment was carried out in a greenhouse under a thermoperiod of 20/17 °C day/night and a photoperiod of 16/8 h. Natural light was supplemented with high pressure sodium lamps (Philips, MASTER Green Power T400W) supplying an average photosynthetically active radiation of 350 μmol photons m⁻² s⁻¹ at canopy height.

2.2. Plant harvest and N transfer assessment

Plants were harvested three months after transplanting and separated into shoots and roots. In RC, the roots of both plants (donor and receiver) were separated. Roots were carefully rinsed with deionized water. Plant samples were weighed and oven dried (60 °C) for 48 h for DW determination and ground to fine powder before total N and ¹⁵N/¹⁴N ratio analysis. The total N and the ¹⁵N/¹⁴N ratio were determined by analysing samples with an isotope ratio mass spectrometer (IRMS) (Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyser (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

Estimates of total N transfer from donor (legume) to the receiver (rapeseed) were based on the assumption that equal proportions of labelled and non-labelled N were transferred. The percentage of total donor N transferred to the receiver (%N_{transfer}) was calculated from the ratio between labelled N in the receiver and total labelled N in both the receiver and the donor plant (Ledgard et al., 1985):

$$\%N_{\text{transfer}} = \frac{^{15}\text{N content}_{\text{receiver}}}{(^{15}\text{N content}_{\text{receiver}} + ^{15}\text{N content}_{\text{donor}})} \times 100 \quad (1)$$

where

$$^{15}\text{N content} = (\text{atom } \% ^{15}\text{N excess} \times \text{total N}) / \text{atom } \% ^{15}\text{N excess}_{\text{labelled N}} \quad (2)$$

with: atom % ¹⁵N excess_{labelledN} = 99

$$\text{atom } \% ^{15}\text{N excess}_{\text{plant}} = \text{atom } \% ^{15}\text{N}_{\text{plant}} - \text{atom } \% ^{15}\text{N}_{\text{control}}$$

Then, total amount of N (mg plant⁻¹) transferred from the donor (N_{transfer}) was calculated as:

Table 1. Characteristics (strain, genera, species and plant origin) of symbiotic bacteria used to inoculate different legume species.

Host legume	Strain	Genera and species	Plant origin	Reference
<i>Trifolium incarnatum</i> L.	T354 (MSDJ1056)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i> nodule isolate	Mazurier (1989)
<i>Vicia sativa</i> L.	P221 (MSDJ0469)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> nodule isolate	Laguerre et al. (1992)
<i>Lupinus albus</i> L.	LL13 (MSDJ718)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lupinus luteus</i> nodule isolate	Laguerre et al. (1994)

$$N_{\text{transfer}} = \%N_{\text{transfer}} \times \text{total } N_{\text{donor}}/100 \quad (3)$$

The percentage of N in the receiver derived from transfer (%Ndft) was calculated as:

$$\%Ndft = N_{\text{transfer}} \times 100/\text{total } N_{\text{receiver}} \quad (4)$$

2.3. Data and statistical analysis

The experiment was performed with five replicates except for clover (n = 3). The resulting variations in data are expressed as the means \pm S.E. Data were analysed using analysis of variance (ANOVA), after verifying compliance of normality, and significantly different means between treatments were separated with the Tukey's multiple range test ($P \leq 0.05$).

3. Results

3.1. Biomass, total N amount and ^{15}N excess of legumes and rapeseed

Clover had a higher total dry weight than lupine and vetch (Table 2). Shoot, total root and RC root DW of clover followed the same trend. The DC root DW of lupine and clover were similar and significantly higher than vetch (Table 2).

The N amounts in whole plants, shoots and DC roots were not significantly different for lupine and clover and significantly higher than those of vetch (for example, about 14, 15 and 7 fold higher in clover than in vetch, respectively). Moreover, compared to vetch, clover showed the highest values for N amount in RC (18 fold) and total root (12 fold). The lack of difference in the N amounts observed between clover and lupine could be explained by the higher N content of lupine (around 3 versus 2%), which offset its lower dry weight (Table 2).

Table 2. Dry weight and N amount in donor plant (lupine, clover or vetch) parts (root in receiver compartment (RC), root in donor compartment (DC), total root or shoot) or in the whole plant at harvest time. Each value represents mean \pm S.E. for $n = 3$ (clover) or $n = 5$ (lupine and vetch). For each parameter, different letters (a, b and c) indicate significant differences between species at $p < 0.05$ (Anova followed by Tuckey test).

Legumes	Dry weight (g plant ⁻¹)					N amount (mg N plant ⁻¹)				
	RC root	DC root	Total root	Shoot	Whole plant	RC root	DC root	Total root	Shoot	Whole plant
Lupine	0.64 a (± 0.16)	1.29 b (± 0.31)	1.94 a (± 0.38)	6.33 a (± 1.13)	8.27 a (± 1.47)	17.22 ab (± 4.40)	41.66 b (± 12.04)	58.87 ab (± 14.63)	272.99 b (± 44.37)	331.86 b (± 58.50)
Clover	4.52 b (± 2.12)	1.45 b (± 0.24)	5.97 b (± 2.24)	22.47 b (± 6.10)	28.44 b (± 8.08)	65.05 b (± 30.35)	49.62 b (± 10.89)	114.67 b (± 28.86)	466.93 b (± 110.55)	581.60 b (± 137.72)
Vetch	0.37 a (± 0.22)	0.18 a (± 0.04)	0.48 a (± 0.20)	1.47 a (± 0.55)	1.94 a (± 0.60)	3.56 a (± 2.29)	6.73 a (± 1.44)	9.58 a (± 3.05)	31.21 a (± 8.19)	40.79 a (± 10.69)

The atom% ¹⁵N excess in whole plants, shoots, total roots and DC roots of clover and vetch was significantly higher (around 60%, except for clover total root: 35%) than in lupine (around 15%). The lowest values were measured in RC roots for which clover showed higher values than lupine and vetch (Table 3).

Total DW, shoot and root DW and the total N amounts in rapeseed grown in mixtures (rapeseed-lupine, rapeseed-clover and rapeseed-vetch) was similar to the DW and total N amounts of rapeseed grown alone (Control) (Table 4). The atom% ¹⁵N excess of rapeseed grown with clover was significantly higher than in rapeseed grown with lupine or vetch, the latter showing a similar value to rapeseed grown alone (Table 4). These values of ¹⁵N enrichment found in shoots and roots of

Table 3. ¹⁵Nitrogen labeling (expressed in atom% ¹⁵N excess) in donor plants (lupine, clover or vetch) at harvest time. RC root and DC root correspond to legume roots in the receiver compartment (RC) and donor compartment (DC), respectively. Each value represents mean \pm S.E. for $n = 3$ (clover) or $n = 5$ (lupine and vetch). For each parameter, different letters (a, b and c) indicate significant differences between species at $p < 0.05$ (Anova followed by Tuckey test).

	Atom% ¹⁵ N excess				
	RC root	DC root	Total root	Shoot	Whole plant
Lupine	2.432 a (± 0.267)	21.084 a (± 4.191)	14.678 a (± 3.306)	15.773 a (± 2.558)	15.584 a (± 2.657)
Clover	15.497 b (± 2.363)	62.492 b (± 8.735)	35.194 ab (± 3.028)	69.247 b (± 7.401)	62.349 b (± 6.129)
Vetch	0.688 a (± 0.124)	74.448 b (± 6.648)	58.444 b (± 8.069)	64.076 b (± 9.177)	62.647 b (± 7.257)

Table 4. Total dry weight, N amount and atom % ^{15}N excess in rapeseed grown alone (control) and rapeseed (R, receiver) grown in mixture with different donor plants (lupine, L; clover, C or vetch, V) at harvest time. Each value represents mean \pm S.E. for $n = 3$ (RC) or $n = 5$ (RL and RV). For each parameter, different letters (a, b and c) indicate significant differences between mixtures at $p < 0.05$ (Anova followed by Tuckey test).

	Dry weight (g plant ⁻¹)	N amount (mg N plant ⁻¹)	Atom% ^{15}N excess
control	17.45 a (± 0.93)	143.79 a (± 7.53)	0.371 a (± 0.007)
RL	23.53 a (± 1.76)	189.36 a (± 15.51)	0.457 b (± 0.024)
RC	18.70 a (± 2.54)	186.91 a (± 28.08)	1.310 c (± 0.366)
RV	18.94 a (± 1.68)	150.81 a (± 13.07)	0.408 ab (± 0.018)

rapeseed indicate that N had been transferred from the nutrient solution to legumes and then from legumes to rapeseed. From these data, it could be underlined that the ^{15}N enrichment is maintained from DC roots to shoots but the enrichment from shoots to RC roots is less effective, especially in vetch (94 fold lower).

3.2. N transfer from clover and lupine to rapeseed

No significant N transfer occurred from vetch to rapeseed. The percentages of N transferred ($\%N_{\text{transfer}}$) from lupine or clover to rapeseed were not significantly different ($p = 0.208$), which was also reflected in similar amounts of N being transferred to rapeseed from lupine and clover, respectively ($p = 0.252$). Finally, in rapeseed the N derived from transfer ($\%N_{\text{dft}}$) accounted for a slightly higher percentage ($p = 0.07$) of total N in rapeseed-lupine than in rapeseed-clover (Table 5).

Table 5. Percentage (N transfer %) and amount (mg N plant⁻¹) of N transferred from donor (Lupin (L) or clover (C)) to receiver plants (Rapeseed (R)); contribution (Ndft %) to total N of the receiver plant.

	N transfer (%)	N transferred (mg N plant ⁻¹)	Ndft (%)
RL	2.17 (± 0.64)	6.04 (± 0.96)	3.14 (± 0.32)
RC	0.88 (± 0.44)	4.01 (± 1.31)	2.02 (± 0.40)

4. Discussion

Facilitation of N resources between legumes and their associated companion crops has been widely described, especially for cereals (Vandermeer, 1989; Loreau and Hector, 2001) and constitutes a promising tool for agro-ecology. Such interactions have been attributed to two potentially interconnected processes: (i) niche segregation between species that can force one partner to exploit resources neglected in a single species system (for example, deeper soil nutrient pools by trees in agroforestry) and (ii) N transfer from an N₂ fixing legume to the companion crop. To satisfy these processes, legume species need to ensure proper growth in intercrops without limiting the companion species and then they must release and transfer significant amounts of N to the commercial crop.

Our results show that in comparison to control plants, which were grown alone, growth at the rosette stage of rapeseed was not limited by clover, lupine or vetch, even though rapeseed had to share the same soil volume and nutrient pools. This contrasts with decrease of *Brassica* performance measured in mustard – pea or – lentil mixtures by Banik et al. (2000) or Jamont et al. (2013) who noticed a 30% growth increase of rapeseed when associated with faba bean. Taken together, these results suggest that the choice of the legume is crucial for the growth performance of *Brassica* species. In our experiment, lupine and especially clover grew well with rapeseed, whereas vetch produced a very low dry weight and then appeared to be less compatible.

The atom %¹⁵N excesses we measured were significantly higher in both clover and vetch than in lupine (around 60% against 15%). This shows that these two species derived the most part of their N nutrition from the donor compartment (DC), not the receiver compartment (RC), even though their root biomass was 2 to 3 fold greater in the latter. Thus, a clear segregation between rapeseed and these two legumes was revealed, the companion crops exploiting two different N pools. For these two legumes, N₂ fixation therefore seemed to be limited compared to root uptake. Such limitations in N fixation have been described by numerous authors for clover (Macduff et al., 1996; Soussana et al., 2002) and attributed to a decrease in nodule number and dry weight due to high nitrate availability. Indeed, in our experimental design, nitrate was highly available in the DC thanks to a nutrient solution renewed twice weekly, and very few nodules were observed when roots were collected. The atom %¹⁵N excess of lupine was much lower, indicating that the ¹⁵N nutrient solution did not constitute its main N resource, whereas unlike both clover and vetch the root biomass of lupine was slightly higher in the DC ($p < 0.1$). At harvest, we observed numerous large nodules on the root systems from the two compartments suggesting that the nodulation process was effective. Some authors such as Luciński et al. (2002) have noted that *Lupinus albus* growth is not affected by mineral N when NH₄NO₃ is provided. Serrano & Chamber (1990)

showed that some *Bradyrhizobium* strains are able to infect roots sufficiently at a relatively high nitrate concentration (12 mM). Moreover, Goergen et al. (2009) found that lupine may rely mostly on fixed N₂ when N nutrient solutions up to 5 mM are provided. Together with our observations on nodule formation and the low root biomass in RC, this led us to conclude that in our system, the N nutrition of lupine relied mainly on N₂ fixation and to a lesser extent on NH₄NO₃ uptake from the DC. Therefore, species niche segregation for N nutrition also occurred between this legume and rapeseed.

In our study, a split root system was used for the first time to study N-transfer from three legume species to rapeseed. This method allows continuous ¹⁵N labelling using a natural pathway of N uptake and assimilation, which should uniformly label all organs and compounds subject to N transfer from the legume root system in the DC to the shoot then the roots in the RC, and finally to the companion plant (rapeseed). This allows a more complete and realistic monitoring than shoot-labelling methods (Chalk et al., 2014; Wichern et al., 2008). Overall, the ¹⁵N enrichment of the legumes was high and equivalent in both DC roots and shoots, indicating a high translocation level in the xylem. The ¹⁵N enrichment of legume RC roots was much weaker, being reduced 94 fold (vetch), 6 fold (lupine) and 4 fold (clover) compared to shoots (Table 3). Considering that legume root biomass was statistically similar in both the RC and DC, the ¹⁵N amount in RC roots was low and suggested a low phloem translocation of N compounds from shoot to roots, especially for vetch. This explained the lack of ¹⁵N enrichment in rapeseed grown with vetch compared to rapeseed grown alone (Table 4). In contrast, significant ¹⁵N enrichment had been found in the shoot and roots of rapeseed grown with lupine and clover, with the latter having a significantly higher atom% ¹⁵N excess (Table 4). However, in the RC, where roots of lupine were less ¹⁵N labelled than roots of clover, both species transferred statistically similar amounts ($p = 0.252$) of N (6.04 ± 0.96 and 4.01 ± 1.31 , respectively). Taking into account the amount of N in rapeseed, the Ndft % was even slightly higher ($p = 0.07$) when mixed with lupine ($3.14 \pm 0.32\%$) than when mixed with clover ($2.02 \pm 0.40\%$). Despite possible variation according to species, plant age, ¹⁵N addition, harvest, duration of ¹⁵N labelling and the number of ¹⁵N applications, the results obtained in our study are consistent with values previously monitored using a split root design and reported in the review of Chalk et al. (2014) (<10% and often <1%). For example, Ndft values of 0.3% when intercropping barley with pea and between 0.7 and 1.4% when intercropping maize with soybean were obtained by Johansen and Jensen (1996) and Van Kessel et al. (1985), respectively. For the three rapeseed-legume mixtures studied, our results revealed a ten fold higher N transfer from legume to rapeseed than reported by Jamont et al. (2013) who considered faba bean associated with rapeseed at a similar stage of development, biomass and rapeseed N content as in the current work.

5. Conclusion

From this study, it could be concluded that rapeseed growth was not altered by the presence of legumes. In contrast to vetch, lupine and clover may be considered as suitable candidates for rapeseed legume mixtures because both species have shown significant capacity for N transfer that is available for rapeseed nutrition. Moreover, lupine may be particularly interesting since its N nutrition relies mainly on N₂ fixation, which promises a good niche segregation from the main crop and high N inputs into the crop system.

Declarations

Author contribution statement

Thaïs Génard, Philippe Etienne, Philippe Laîné, Jean-Claude Yvin, Sylvain Diquélou: Conceived and designed the experiments; Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Funding statement

This work, conducted through the SERAPIS project, was supported by the Regional Council of Lower Normandy (grant number 12P03057), the Regional Council of Brittany and the European Regional Development Fund (ERDF) and CMI (Centre Mondial d'Innovation of Roullier group).

Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Additional information

No additional information is available for this paper.

Acknowledgments

The authors are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the elemental analysis used in this study. The authors thank Dr Laurence Cantrill, Director of "Out of Site English", for revising the English in the manuscript. The authors thank the seed producers, Caussade-Semences for seeds of clover and lupine, and Jouffray-Drillaud Eco Performance for vetch seeds.

References

- Banik, P., Sasmal, T., Ghosal, P.K., Bagchi, D.K., 2000. Evaluation of mustard (*Brassica campestris* Var. Toria) and legume intercropping under 1: 1 and 2: 1 row-replacement series systems. *J. Agron. Crop Sci.* 185, 9–14.
- Bergersen, F.J., 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Aust. J. Biol. Sci.* 14, 349–360.
- Chalk, P.M., Peoples, M.B., McNeill, A.M., Boddey, R.M., Unkovich, M.J., Gardener, M.J., Silva, C.F., Chen, D., 2014. Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of ¹⁵N-enriched techniques. *Soil Biol. Biochem.* 73, 10–21.
- Cortés-Mora, A., Piva, G., Jamont, M., Fustec, J., 2010. Niche separation and nitrogen transfer in Brassica-legume intercrops. *Ratarstvo I Povrtarstvo* 47, 581–586.
- Elgersma, A., Schlepers, H., Nassiri, M., 2000. Interactions between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) under contrasting nitrogen availability: productivity seasonal patterns of species composition. N₂ fixation, N transfer and N recovery. *Plant and Soil* 221, 281–299.
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., Cliquet, J.-B., 2010. Nitrogen rhizodeposition of legumes: A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 57–66.
- Giller, K.E., Ormesher, J., Awah, F.M., 1991. Nitrogen transfer from Phaseolus bean to intercropped maize measured using ¹⁵N-enrichment and ¹⁵N-isotope dilution methods. *Soil Biol. Biochem.* 23, 339–346.
- Goergen, E., Chambers, J.C., Blank, R., 2009. Effects of water and nitrogen availability on nitrogen contribution by the legume, *Lupinus argenteus* Pursh. *Appl. Soil Ecol.* 42, 200–208.
- Gylfadóttir, T., Helgadóttir, Á., Høgh-Jensen, H., 2007. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. *Plant and Soil* 297, 93–104.
- Hamel, C., Smith, D.L., 1991. Plant development in a mycorrhizal field-grown mixture. *Soil Biol. Biochem.* 23, 661–665.
- Høgh-Jensen, H., Schjoerring, J.K., 2000. Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by ¹⁵N leaf feeding compared with indirect dilution of soil ¹⁵N. *Plant and Soil* 227, 171–183.
- Høgh-Jensen, H., Schjoerring, J.K., 2001. Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biol. Biochem.* 33, 439–448.

- Jamont, M., Piva, G., Fustec, J., 2013. Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? *Plant and Soil* 371, 641–653.
- Jensen, E.S., 1996. Barley uptake of N deposited in the rhizosphere of associated field pea. *Soil Biol. Biochem.* 28, 159–168.
- Johansen, A., Jensen, E.S., 1996. Transfer of N and P from intact or decomposing roots of pea to barley interconnected by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Soil Biol. Biochem.* 28, 73–81.
- Laguerre, G., Mazurier, S.I., Amarger, N., 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Lett.* 101, 17–26.
- Laguerre, G., Allard, M.-R., Revoy, F., Amarger, N., 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 56–63.
- Laîné, P., Bigot, J., Ourry, A., Boucaud, J., 1994. Effects of low temperature on nitrate uptake, and xylem and phloem flows of nitrogen: in *Secale cereale* L. and *Brassica napus* L. *New Phytol.* 127, 675–683.
- Ledgard, S.F., Freney, J.R., Simpson, J.R., 1985. Assessing nitrogen transfer from legumes to associated grasses. *Soil Biol. Biochem.* 17, 575–577.
- Ledgard, S.F., Steele, K.W., 1992. Biological nitrogen fixation in mixed legume/ grass pastures. *Plant and Soil* 141, 137–153.
- Loreau, M., Hector, A., 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature* 412, 72–76.
- Luciński, R., Polcyn, W., Ratajczak, L., 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association rhizobium-legumes. *Acta Biochim. Pol.* 49, 537–546.
- Macduff, J.H., Jarvis, S.C., Davidson, I.A., 1996. Inhibition of N₂ fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) at low concentrations of NO₃⁻ in flowing solution culture. *Plant and Soil* 180, 287–295.
- Martensson, A.M., Rydberg, I., Vestberg, M., 1998. Potential to improve transfer of N in intercropped systems by optimising host-endophyte combinations. *Plant and Soil* 205, 57–66.
- Mazurier, S., 1989. Diversité de populations naturelles nodulantes de *Rhizobium leguminosarum*. Lyon 1.

- Paynel, F., Murray, P.J., Cliquet, J.B., 2001. Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and Soil* 229, 235–243.
- Paynel, F., Cliquet, J.B., 2003. N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds. *Agronomie* 23, 503–510.
- Pirhofer-Walzl, K., Rasmussen, J., Høgh-Jensen, H., Eriksen, J., Søgaard, K., Rasmussen, J., 2012. Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. *Plant and Soil* 350, 71–84.
- Purnamawati, H., Schmidtke, K., 2003. Nitrogen transfer of two cultivar faba bean (*Vicia faba* L.) to oat (*Avena sativa* L.). *Indonesian J. Agron.* 31, 31–36.
- Rasmussen, J., Eriksen, J., Jensen, E.S., Esbensen, K.H., Høgh-Jensen, H., 2007. In situ carbon and nitrogen dynamics in ryegrass–clover mixtures: Transfers, deposition and leaching. *Soil Biol. Biochem.* 39, 804–815.
- Serrano, A., Chamber, M., 1990. Nitrate reduction in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol.* 136, 240–246.
- Soussana, J., Minchin, F.R., Macduff, J.H., Raistrick, N., Abberton, M.T., Michaelson-Yeates, T.P.T., 2002. A simple model of feedback regulation for nitrate uptake and N₂ fixation in contrasting phenotypes of white clover. *Ann. Bot.* 90, 139–147.
- Ta, T.C., Faris, M.A., 1987. Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant and Soil* 98, 265–274.
- Ta, T.C., Faris, M.A., Macdowall, F.D.H., 1989. Evaluation of ¹⁵N methods to measure nitrogen transfer from alfalfa to companion timothy. *Plant and Soil* 114, 243–247.
- Tomm, G.O., Kessel, C., van Slinkard, A.E., 1994. Bi-directional transfer of nitrogen between alfalfa and brome grass: Short and long term evidence. *Plant and Soil* 164, 77–86.
- Van Kessel, C., Singleton, P.W., Hoben, H.J., 1985. Enhanced N-transfer from a soybean to maize by vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. *Plant Physiol.* 79, 562–563.
- Vandermeer, J.H., 1989. *The Ecology of Intercropping*. University Press, Cambridge.
- Waterer, J.G., Vessey, J.K., Stobbe, E.H., Soper, R.J., 1994. Yield and symbiotic nitrogen fixation in a pea-mustard intercrop as influenced by N fertilizer addition. *Soil Biol. Biochem.* 26, 447–453.

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

Chapitre 4

Impact of sulfur fertilization level on agronomic performances of rapeseed-clover mixture



Chapitre 4

Impact of sulfur fertilization level on agronomic performances of rapeseed-clover mixture

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article intitulé «**Impact of sulfur fertilization level on agronomic performances of rapeseed-clover mixture**» soumis à Journal of Plant nutrition and Soil Science (jpln.201600466).

Préambule

Dans le cadre de cultures associées intégrant deux plantes exigeantes en soufre (Brassicacée et Fabacée), la prise en compte de la disponibilité en cet élément est particulièrement importante. Ce dernier chapitre a donc pour objectif d'**étudier l'impact de la fertilisation soufrée sur les performances agronomiques de l'association colza-trèfle en conditions d'apports azotés modérés** (100 kg N .ha⁻¹). Une expérimentation en système additif sur cases lysimétriques, considérant **deux niveaux de fertilisation soufrée (30 et 60 kg S .ha⁻¹)**, a donc été réalisée afin d'étudier l'effet du soufre sur (i) la biomasse et la nutrition azotée et soufrée des deux plantes, (ii) la capacité de fixation de l'azote atmosphérique du trèfle, (iii) le rendement et la qualité des graines de colza et (iv) le lessivage de N-NO₃⁻ et de S-SO₄²⁻. Un marquage de l'engrais au ¹⁵N a été réalisé afin de tracer le devenir de l'engrais azoté au sein des deux plantes.

Principaux Résultats :

- En association, un apport de soufre deux fois plus important (passant de 30 à 60 kg S .ha⁻¹) permet d'augmenter significativement la capacité de fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) du trèfle d'un facteur de 1,32 par rapport à sa monoculture.
- Au cours de la période automno-hivernale (de décembre à février), la présence d'un couvert de trèfle associé au colza augmente significativement le lessivage du N-NO₃⁻ (+18%) et du S-SO₄²⁻ de (+112%) comparativement à la monoculture de colza.
- Un apport de soufre deux fois plus important (passant de 30 à 60 kg S.ha⁻¹) n'améliore pas les performances agronomiques du colza, qu'il soit cultivé en monoculture ou en association. De plus en association, la plus forte fertilisation S (60 kg S .ha⁻¹) engendre une baisse significative du rendement grainier du colza.
- En condition de faibles intrants azotés (100 kg N .ha⁻¹), le rendement grainier et la qualité des graines du colza n'est pas affecté par la présence du trèfle (système additif).

Impact of sulfur fertilization levels on the agronomic performance of rapeseed-clover mixtures

Thaïs Génard^{1,2,3}, Philippe Laîné^{1,2,3*}, Sylvain Diquélou^{1,2,3}, Jean-Claude Yvin⁴, Philippe Etienne^{1,2,3}

¹Normandie Université, Caen, France

²UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, UNICAEN, Caen, France

³UMR 950 Ecophysiologie Végétale, Agronomie et nutritions N, C, S, INRA, Caen, France

⁴Centre Mondial d'Innovation, Groupe Roullier, Saint Malo, France

*Corresponding author: philippe.laine@unicaen.fr; phone: +33 231 565 374; fax: +33 231 565 360.

Footnotes:

This work conducted through the SERAPIS project was supported by the Regional Council of Lower Normandy, the Regional Council of Brittany and the European Regional Development Fund (ERDF) and Timac Agro International.

Submitted for publication to Journal of Plant Nutrition and Soil Science.

Abstract

Rapeseed is a crop requiring high levels of nitrogen (N) fertilizer for growth and to optimize yield and seed quality. To limit environmental pollution associated with intensive N fertilizer use, rapeseed-clover mixtures grown in lysimeters under low N conditions (100 kg.N.ha⁻¹) were studied. To investigate the high sulfur (S) requirements of both plants, two levels of S fertilization (30 and 60 kg.S.ha⁻¹) were applied in order to (i) examine the effect of S fertilization on the agronomic performance of rapeseed and the dinitrogen fixing capacity of clover and (ii) to monitor nitrate and sulfate leaching losses. This study has shown that irrespective of the type of cropping (monocrops or mixtures), the biomasses and total N and S contents of both plants were similar, as was the rapeseed seed quality. The same trend was obtained in response to increases in the S fertilization level, even though an improvement (1.3 fold) in the fixing capacity of dinitrogen (%Ndfa) was observed in clover associated with rapeseed. However, with the highest S fertilization level (60 kg.S.ha⁻¹), the yield of rapeseed grown in mixture was significantly lower than the yield of rapeseed grown as a monocrop (3.3 *versus* 3.8 t.ha⁻¹, respectively). This study demonstrated that rapeseed mixed with clover did not require an increase in the S fertilization level to maintain yield and seed quality, despite both plants having high S needs. More surprisingly, this study showed that compared to rapeseed monocrops, the rapeseed-clover mixture led to 18 and 112% losses of N (N-NO₃⁻) and S (S-SO₄²⁻) during the winter period, respectively.

Key words

Clover, lysimeter, %Ndfa, %Ndff, rapeseed, seed quality, yield.

Abbreviations

IRMS: Isotope-Ratio Mass Spectrometry

%Ndfa: percentage of N derived from atmosphere

%Ndff: percentage of N derived from fertilizer

R: sole rapeseed crop

RC: Rapeseed-Clover mixture

I. Introduction

Annual intercrops, which exploit the ability of legumes to reduce dinitrogen (N_2), are now considered as an environmental and economic alternative for limiting pollutions linked to intensive use of nitrogen (N) fertilizer (see review: (Fustec *et al.*, 2010). Legume-cereal intercropping is known to increase yield per unit surface area and yield stability compared to sole crops (Lithourgidis *et al.*, 2011; Malézieux *et al.*, 2009; Naudin *et al.*, 2010; Pelzer *et al.*, 2012). An additional benefit is to reduce the risk of N leaching (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2003; Mariotti *et al.*, 2015) and to limit diseases, pests (Trenbath, 1993) and weeds (Corre-Hellou *et al.*, 2011; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001a).

However, few studies have been performed on *Brassica* species mixed with legumes (Banik *et al.*, 2000; Schröder and Köpke, 2012). Recently, Cadoux *et al.* (2015) demonstrated that before winter, the total aerial dry weights and aerial N contents of winter oilseed rape were higher in mixtures containing frost-sensitive legume crops than in sole winter oilseed rape. In addition, in spring after destruction of the companion plants, these authors have shown that the shoot nitrogen content and yield of rapeseed grown with legumes under low N fertilization (-30 kg.N.ha^{-1}) are at least similar, if not higher than the yield of rapeseed controls receiving an optimal level of N fertilization (ranging between 130 and 190 kg.N.ha^{-1} , depending on the experimental site). Moreover, under controlled conditions, recent results have shown a beneficial effect of rapeseed intercropped with faba bean (*Vicia faba* L. spp. *minor* cv. Divine) on the dry weight (DW) and total N content of rapeseed due to the niche complementarity in the use of N sources (soil mineral N and biological N_2 fixation) (Cortés-Mora *et al.*, 2010; Jamont *et al.*, 2013a). Furthermore, Cortés-Mora *et al.* (2010) have demonstrated N transfer from faba bean to rapeseed (about 10%) during the early stages of growth. These studies suggest that in intercrop systems, legumes were able to transfer a portion of fixed N_2 to rapeseed and enable reductions in the level of N fertilization of this N-demanding crop.

In addition to these strong N requirements, winter oilseed rape is also a crop requiring high levels of sulfur (S) fertilizer to sustain growth and seed yield (McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001; Zhao *et al.*, 1997). Indeed, rapeseed is a species highly sensitive to S mineral limitation, which induces a reduction in yield and the quality of harvest products through modifications of lipid and the protein composition of seeds (D'Hooghe *et al.*, 2014; Janzen and Bettany, 1984; Malhi *et al.*, 2007; McGrath and Zhao, 1996; Scherer, 2001). In addition, Dubousset *et al.*, (2010) have shown that decreased S availability reduces the nitrogen (N) use efficiency of oilseed rape. Thus, an input of S fertilizer is usually practiced to avoid such negative effect of S limitation on rapeseed growth and yield (Grant *et al.*, 2012).

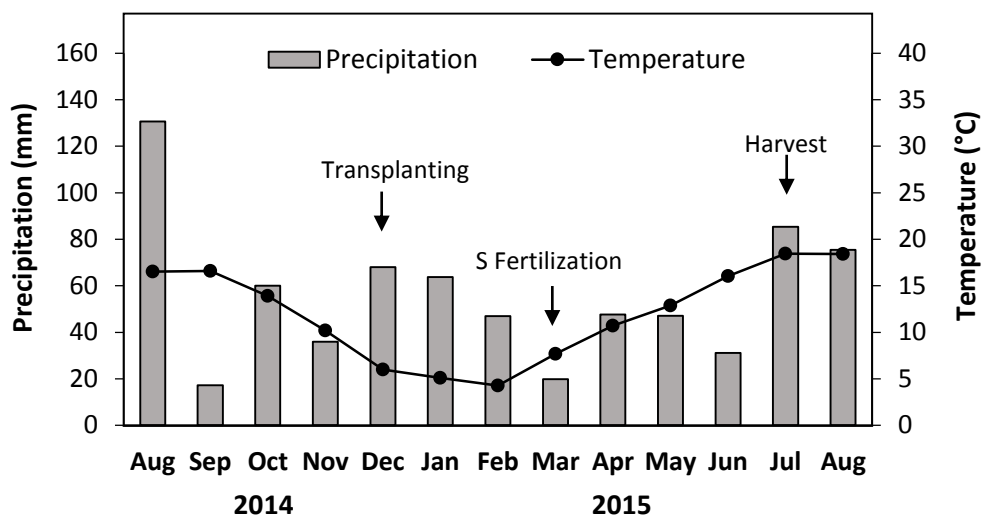


Figure 1 : Mean monthly temperature and precipitation recorded at the meteorological station during the 2014-2015 growing season. Experimental design stages indicated with arrows.

Legumes also require high S availability for growth but also to improve the N₂ fixation process. Indeed, in clover it has been shown that S supply promotes an increase in nodule number and nitrogenase activity allowing better N₂ fixation (Scherer and Lange, 1996; Varin *et al.*, 2010) and an increase in clover production (Gilbert and Robson, 1984a; Giller and Wilson, 1991; Sinclair *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1956). Moreover, other studies have shown that S-deficiency causes a decrease in N acquisition by plants as a result of a decrease in N uptake (Clarkson *et al.*, 1989; Karmoker *et al.*, 1991) or N₂ fixation (Pacyna *et al.*, 2006; Scherer *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 1999). All these results suggest that in rapeseed-clover intercrops, the high S requirements of both plants could induce competition for soil S resources with negative effects on the agronomic performance (growth, N₂ fixation, yield, seed quality) of one/or both of the plants. To avoid this, a higher S fertilization level could be required by intercrops compared to sole crops.

The objective of this study was to investigate the effect of different levels of S fertilization on the agronomic performance of rapeseed-clover intercrops grown in lysimeters. Therefore, under low N fertilization (100 kg.N.ha⁻¹), two S fertilization levels (30 and 60 kg.S.ha⁻¹) were applied to monitor the effect of S on (i) the growth and S and N status of both plants, (ii) the N₂ fixing capacity of clover and (iii) the yield and seed quality of rapeseed. Moreover, the N-NO₃⁻ and S-SO₄²⁻ leaching losses in lysimeters were examined during the plant growth cycle.

II. Materials and Methods

II.1. Site and lysimeter description

II.1.1. Experimental site and climatic characteristics

The field experiment was conducted from September 2014 to July 2015 at the experimental station located in Lieury, in northern France (00°00'34.3"W, 48°59'24.2"N). The lysimeter device was composed of 21 polyester resin boxes with an area of 2 m² and a depth of 110 cm with a 10 cm thick base of fine stones for drainage. Each lysimeter box was connected to a bucket collecting water that percolated through a PVC tube. All buckets were located in a concrete tunnel below the boxes.

Rainfall and air temperature have been measured continuously at a meteorological station at the Lycée Le Robillard in Lieury (Calvados, France) (**Fig. 1**). The mean annual maximum and minimum air temperatures are 15.3 and 5.6°C, respectively, and annual precipitation reaches 653.8 mm during the period of rapeseed cultivation.

Table 1 : Physical and chemical characteristics of the soil in the lysimeters.

Depth (cm)	Particle size distribution (%)			pH (water)	Organic C (mg C g ⁻¹)	Total N (mg N g ⁻¹)	C/N	CEC (cmol kg ⁻¹)	Total CaCO ₃ (%)
	Sand	Silt	Clay						
0-20	32	38	30	7.9	25.4	3.21	7.9	16.5	10
20-40	34	38	28	8.1	15	1.87	8	11.5	12
40-65	41	35	24	8.3	7.6	0.93	8.2	7.2	28
65-100	49	34	17	8.4	3.4	0.4	8.5	4.6	38

II.1.2. Soil properties of the lysimeters

Each lysimeter box has a volume of 2.2 m³ and was filled in the same order as the original soil layers with soil collected from a nearby plot. The soil in the lysimeter boxes was a Calcaric Cambisols (World Reference Base for soil resources, 2006), with a fertile surface layer in terms of organic matter (6.3% in 0-20 cm), a relatively basic pH (**Table 1**) and a high content of calcium carbonate increasing with depth.

II.2. Experimental design, ¹⁵N labeling and harvest

Winter oilseed rape (*Brassica napus* L. 'Boheme') was grown as a sole crop (R) and as an intercrop (RC) with Italian clover (*Trifolium incarnatum* L.).

Winter oilseed rape and clover were sown separately on September 2014 in a neighboring plot of the experimental site. On December 1st in 2014, rapeseed and clover seedlings were transplanted into the lysimeters in a randomized design with R and RC. The RC was based on an additive design (De Wit and Van den Bergh, 1965), *i.e.* the density of rapeseed (60 plants per lysimeter⁻¹) was the same in the R and in the RC. Moreover, in RC lysimeters, clover was transplanted with a density of 125 plants per lysimeter⁻¹. The component crops were arranged in alternate rows with 4 rows of rapeseed and 5 rows of clover with a row spacing of 14 cm.

On December 16th 2014, each lysimeter was fertilized with a combined phosphorus (P) and potassium (K) fertilizer supplying 30 kg P ha⁻¹ and 90 kg K ha⁻¹. On March 10th 2015, a second P/K fertilization was applied (60 kg P ha⁻¹ and 180 kg K ha⁻¹). At the same time, 100 kg N ha⁻¹ was allocated to the lysimeters using a ¹⁵N-labeled fertilizer (¹⁵N atom excess=5%) as ¹⁵NH₄¹⁵NO₃. Furthermore, the lysimeters were also fertilized with two different levels of S fertilizer (MgSO₄) providing 30 (S30) and 60 kg S. ha⁻¹ (S60).

The experiment was carried out as a randomized complete design with three replications (for each crop type (R and RC) and S fertilizer levels (S30 and S60)). The lysimeters were managed with no application of herbicides and pesticides, but with hand weeding.

During the crop growing season, water that leached from lysimeters was collected regularly and quantified monthly on site using a weighing machine. An aliquot of 50 ml was kept at -20°C for nitrate (NO₃⁻) and sulfate (SO₄²⁻) concentration determination. On July 3rd in 2015, at the seed maturity stage, the plants' total shoots (senescent leaves, stem and pods) were harvested manually from each lysimeter by cutting the plants at ground level. Moreover, taproots of rapeseed were separated from the soil and were carefully washed with deionized water. Pods were separated from the stem then the pericarp and seeds were sorted for rapeseed yield determination. All samples (shoots, taproots and seeds) were oven-dried at 60°C for 2 days for dry weight (DW) determination.

II.3. Elemental and biochemical analysis

II.3.1. Determination of N-NO₃⁻ and S-SO₄²⁻ concentrations of leached water

A 5 ml leached water subsample was filtered on 45µm filters and kept frozen at -20°C prior to analysis of N-NO₃⁻ and S-SO₄²⁻ concentrations using ion chromatography (HPLC, ACS3000, Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA) with a conductivity detector. The eluent solution consisted of 1.8 mM Na₂CO₃ and 1.7 mM Na₂HCO₃, and was pumped isocratically over an AS17 guard column.

II.3.2. Total S, N and ¹⁵N analysis in plants and soil

Aliquots of 5 or 20 mg of each dried plant organ or soil sample were placed into tin capsules for N and S isotopic analysis, respectively. The total N and S contents (%N and %S of DW) and the isotopic ratio ¹⁵N/¹⁴N were determined using a continuous flow isotope mass spectrometer (IRMS) (Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy).

II.3.3. Determination of oil, proteins and glucosinolate contents by NIRS

Seed samples (about 5 g) were scanned on a monochromator Near Infra Red System (NIRSystem model 6500, FOSS NIRSystem Inc, Silver Spring, MD, USA) equipped with the transport module, in the reflectance mode. The results were predicted from an external calibration established for oil and total glucosinolate contents (CRAW, Gembloux, Belgium). The results were given in % of oil per seed dry matter (DM) and in µmol of total glucosinolates per g of seed DM.

II.4. Calculation of total N and S amounts and the percentage of N derived from dinitrogen (%Ndfa) and fertilizer (%Ndff)

The total N or S amounts (N_{tot} or S_{tot}) in each organ were calculated as:

$$N_{\text{total}} \text{ (or } S_{\text{total}}) = \%N \text{ (or \%S)} \times \text{DW} / 100$$

The percentage of N derived from fertilizer (%Ndff) was calculated as:

$$\%Ndff = E^{15}N_{\text{plant}} / E^{15}N_{\text{fertilizer}} \times 100$$

Where E¹⁵N is the ¹⁵N atom% excess of the plant (N_{plant}) or of fertilizer (N_{fertilizer}).

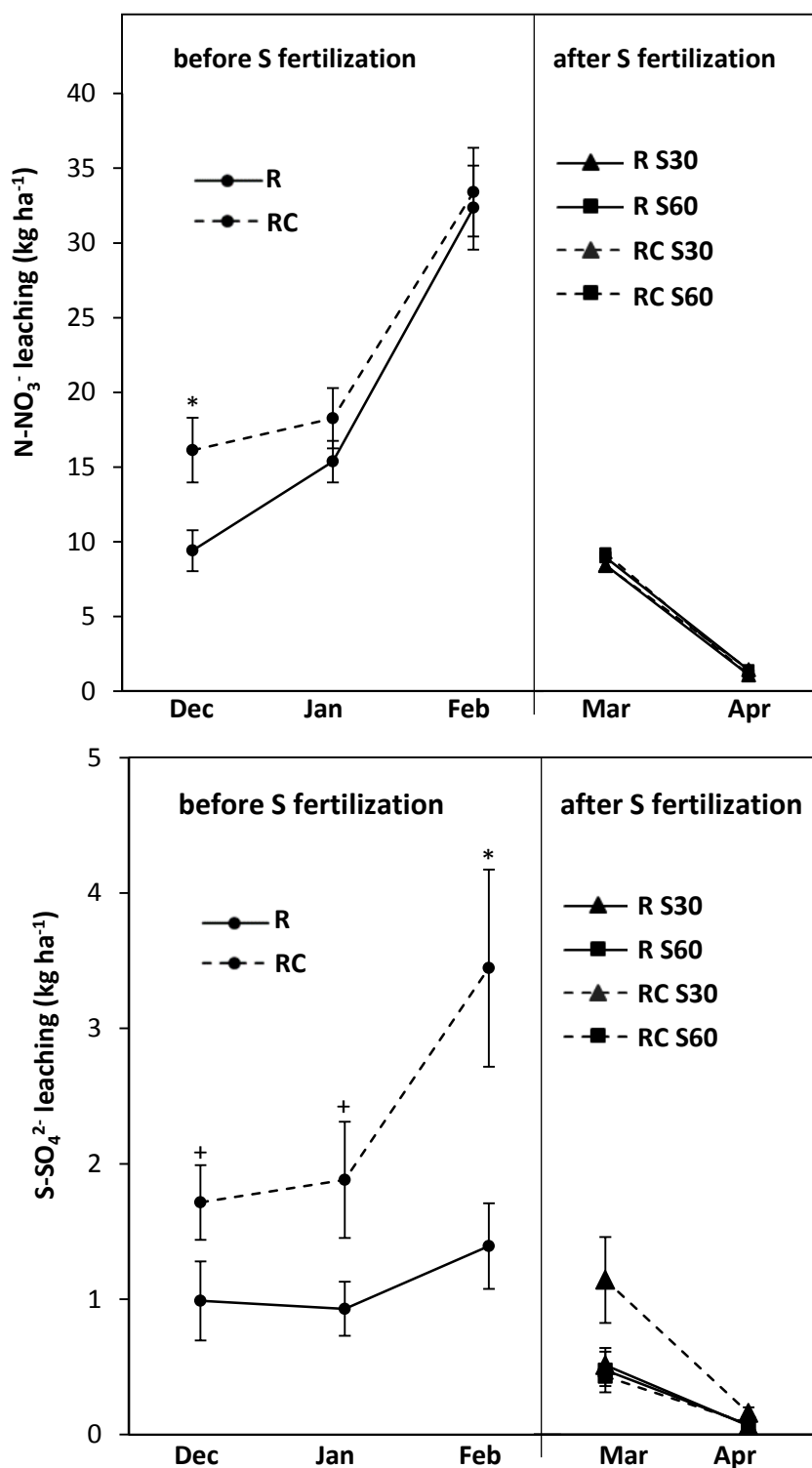


Figure 2 : Monthly leached N-NO₃⁻ (A) and S-SO₄²⁻ (B) from the sole crop (R) of rapeseed or the intercrop (RC) of rapeseed and clover grown in lysimeters, before or after S fertilization (30 or 60 kg.ha⁻¹ for S30 or S60, respectively). Vertical bars indicate ±SE for n=9 from December to February and n=3 from March and April. + and * indicate significant differences between treatments at p<0.1 and p<0.05, respectively.

The percentage of shoot N derived from the atmosphere (%Ndfa) in the clover grown in the intercrop (RC) was determined using the ^{15}N -dilution method using rapeseed grown as the sole crop (R) as the reference crop, as defined by (Larue and Patterson, 1981):

$$\%Ndfa = (1 - (E^{15}\text{N}_{\text{clover RC}} / E^{15}\text{N}_{\text{rapeseed R}})) \times 100$$

Where $E^{15}\text{N}_{\text{clover RC}}$ is the ^{15}N atom% excess of clover grown in intercrop and $E^{15}\text{N}_{\text{rapeseed R}}$ is the ^{15}N atom% excess of rapeseed grown as the sole crop.

II.5. Data and statistical analysis

The experiment was performed with three replicates for each crop (R S30 and S60, RC S30 and S60). The resulting variations in data are expressed as the means \pm S.E. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), after verifying compliance of normality, and significantly different means between treatments were separated with the Tukey's multiple range test ($P \leq 0.05$).

III. Results

III.1. N-NO_3^- and S-SO_4^{2-} leaching

Before N and S fertilization, nutrient leaching increased from December to February (Fig. 2). After S and N fertilizations, nutrient leaching significantly decreased in both March and April, and during the following period no leaching was detected. During the growing season, the cumulative amount of N leached (around $75 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) was fifteen fold higher than the amount of S (around $5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$). During winter period (from December to February), compared to the sole crop of rapeseed, intercropping rapeseed with clover promoted significant increases of 18 and 112% in N and S losses, respectively. For N this increase mostly occurred in December whereas for S highest increase appeared mostly in February. In March and April, values of N and S losses were similar irrespective of the crop type (R or RC) and S fertilizer levels (S30 or S60).

III.2. Biomass and S and N contents of rapeseed and clover

When rapeseed was grown alone (R), DW reached 45.3 ± 1.1 and $46.6 \pm 1.8 \text{ g}\cdot\text{plant}^{-1}$ under S30 and S60, respectively (Table 2). In intercrops, the DW of rapeseed associated with clover (RC) was not affected despite the levels of S fertilization. Whatever the growth condition (R or RC) and S fertilization levels, the N contents at harvest were similar and reached around 1.1 % of DW. The

Table 2 : Dry weight (DW) and S and N contents (in % of DW) measured in the sole crop of rapeseed (R) or the intercrop of rapeseed and clover (RC) fertilized with 30 or 60 kg S.ha⁻¹ (S30 or S60, respectively). The values represent mean \pm SE for n=3.

Rapeseed	DW (g.plant⁻¹)	S content (%)	N content (%)
R S30	45.3 \pm 1.1	0.27 \pm 0.01	1.18 \pm 0.06
R S60	46.6 \pm 1.8	0.28 \pm 0.01	1.11 \pm 0.05
RC S30	48.6 \pm 0.7	0.26 \pm 0.02	1.12 \pm 0.03
RC S60	44.9 \pm 2.7	0.31 \pm 0.01	1.10 \pm 0.06
Clover			
RC S30	1.4 \pm 0.4	0.21 \pm 0.01	1.45 \pm 0.06
RC S60	1.2 \pm 0.3	0.28 \pm 0.02	1.57 \pm 0.10

same trend was observed for S contents, which reached around 0.28 even though S60 promoted a slightly higher S content in rapeseed grown with clover (RC S60) compared to rapeseed grown alone with S30 (R S30) ($p=0.07$) (Table 2).

For clover, the S fertilization levels did not have an effect on biomass production and N content which reached around 1.2 g.plant^{-1} and 1.57 % of DW, respectively (Table 2). Moreover, S fertilization promoted a slight increase in the S content of clover grown with S60 from 0.21 ± 0.01 to 0.028 ± 0.02 % of DW ($p=0.07$).

III.3. N nutrition of clover and rapeseed

For clover, there was a significant 1.32 fold improvement in the percentage of N derived from the atmosphere (%Ndfa) when S fertilization increased from S30 to S60 (Fig. 3A). Likewise, the percentage of N derived from fertilizer (%Ndff) slightly decreased from 18.6 to 15.7% ($p=0.09$) (Fig. 3B).

For the rapeseed monocrop (R) and rapeseed grown with clover (RC), the %Ndff was similar when S fertilization increased from S30 to S60. However, the %Ndff of rapeseed grown under S30 fertilization was significantly increased from 32.2 % for R S30 to 37.8 % for RC S30. Taken together, these results showed a significant benefit effect of neighboring clover on N fertilizer use efficiency at the lower S fertilization level (S30) and no effect from an S fertilization increase.

III.4. Yield and seed quality components of rapeseed

In R S30, R S60 or RC S30 growth conditions, seed yields of rapeseed were similar and close to 360 gDW.m^{-2} (Table 3). In contrast, RC S60 induced a significant decrease in seed yield ($331.5\pm 9.8 \text{ gDW.m}^{-2}$) compared to R S60 ($380.8\pm 3.5 \text{ gDW.m}^{-2}$). Nevertheless, whatever the growth conditions, the thousand seed weight remained the same *i.e.* around 3.8 mg. Concerning seed quality components tested in this study, including oil, protein and glucosinolate contents, similar values were obtained for all growth conditions (Table 3). Thus, the mean values of oil and protein contents were close to 51.9 and 17.6% and the glucosinolate content reached $10.3 \mu\text{mol.g DW}^{-1}$.

Analysis of the fatty acid composition in the rapeseed seeds showed that linoleic acid (C18:2 ω -6) increased in association with the clover intercrop at S30 from 20.1 ± 0.1 to $20.6\%\pm 0.1$ (Fig. 4). However, the ω -3: ω -6 ratio remained at similar values (between 2.01 and 2.10) regardless of the treatment, and C18-1 and other fatty acids were not significantly affected by crop type and S fertilization.

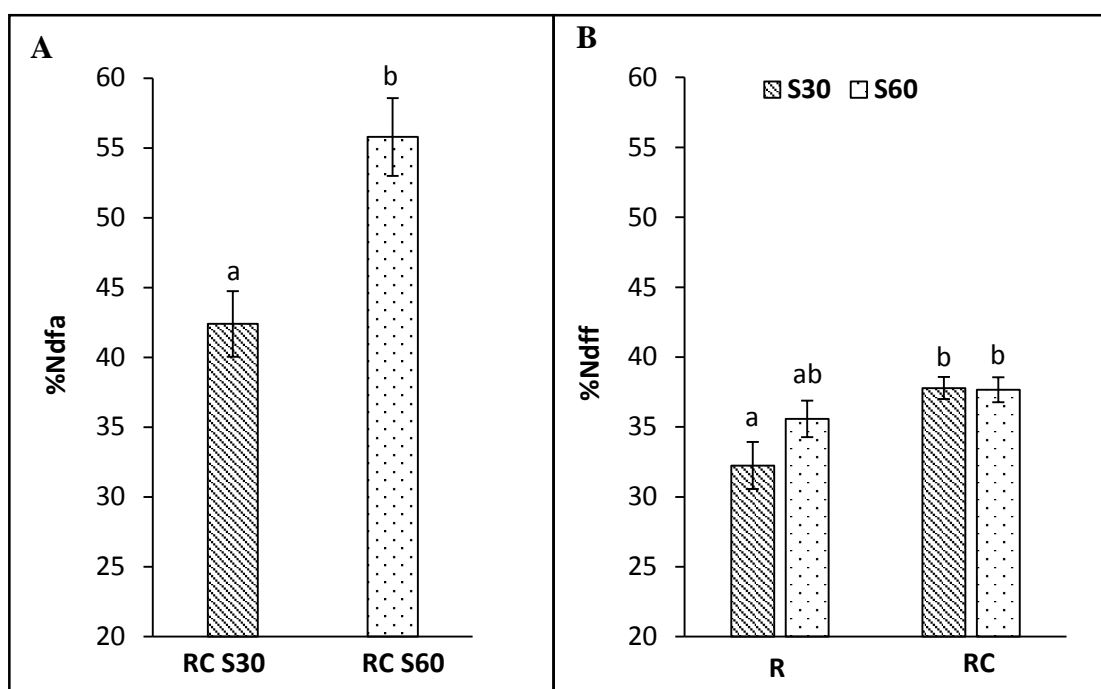


Figure 3 : Percentage of nitrogen derived from the atmosphere (%Ndfa) in clover grown in the intercrop (RC) under S30 or S60 fertilization (**A**) and the percentage of nitrogen derived from fertilizer (%Ndfa) of rapeseed grown as a sole crop (R) or intercropped (RC) with clover, under S30 or S60 fertilization (**B**). The values represent mean \pm SE for n=3. Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Table 3 : Yield components and oil, protein and glucosinolate contents in mature seeds produced by rapeseed grown as a sole crop (R) under S30 or S60 fertilization and intercropped (RC) with clover under S30 and S60 fertilization. The values represent mean \pm SE for n=3.

	Seed yield (g DW m ⁻²)	Thousand seed weight (g)	Oil content (% DW)	Protein content (% DW)	Glucosinolate content (μ mol g ⁻¹ DW)
R S30	368.9 \pm 6.6 ^{ab}	4.1 \pm 0.1	52.2 \pm 0.3	17.7 \pm 0.3	12.7 \pm 1.8
RC S30	348.7 \pm 19.6 ^{ab}	3.8 \pm 0.2	51.1 \pm 0.5	17.6 \pm 0.0	8.8 \pm 1.1
R S60	380.8 \pm 3.5 ^b	3.7 \pm 0.1	52.5 \pm 0.3	17.6 \pm 0.2	8.6 \pm 0.8
RC S60	331.5 \pm 9.8 ^a	3.8 \pm 0.1	51.6 \pm 0.6	17.7 \pm 0.1	10.3 \pm 0.9

IV. Discussion

This study focused on the potential beneficial effects of mixing clover with rapeseed grown with different levels of S fertilizer. Indeed, to achieve high yield in monocrops, both clover and rapeseed required high S fertilization levels. For example, *Varin et al.* (2009) have shown that in clover grown in a mesocosm with 100 kg.N.ha⁻¹, 24 kg.S.ha⁻¹ of fertilization allowed increases in leaf biomass and N₂ fixation capacity. Likewise, numerous studies have shown that rapeseed required S fertilization ranging from 20 (in the USA) to 30 (France) to 60 kg.N.ha⁻¹ (Bangladesh) to achieve a high yield and a high quality of harvested products (*e.g.*: Jackson 2000; Begum *et al.*, 2016; Sarda *et al.*, 2013). However, this S fertilization should be carefully adjusted because levels of S that are too high may increase glucosinolate content (Schnug, 1991; Zhao *et al.*, 1993). Moreover, Joshi *et al.* (1998) have demonstrated that a balance of N/S fertilization resulted in a higher oil quality. Thereby, in our additive system of rapeseed-clover mixture, two fertilization levels have been chosen 30 and 60 kg.S.ha⁻¹ were chosen that correspond to S recommendations for rapeseed monocrops or clover-ryegrass mixtures (Tallec *et al.*, 2009) and the addition of S required by clover in monocrops, respectively. Moreover, testing two S fertilization levels seems to be relevant in mixtures where clover induced a significant increase in S leaching.

In this study, the N-NO₃⁻ and S-SO₄²⁻ leaching losses were higher in early winter (before N and S fertilizations) than in spring (after N and S fertilization) where the losses became very low (for all growth conditions around 5 and 1 kg.ha⁻¹.month⁻¹, respectively). During winter, and especially in December, mixing clover with rapeseed significantly increased N-NO₃⁻ (+ 50%). This result was consistent with previous studies showing that clover use as an intercalary crop increased nitrate leaching (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2003). Moreover, mixing clover significantly increased S-SO₄²⁻ leaching by 2 fold during winter from December to February. To our knowledge, this study is the first to underline this potential detrimental effect of clover associated with rapeseed on the soil mineral pool and ground water quality.

Considering the N budget of crops, previous studies have shown that legume species grown in mixture rely more on N₂ fixation for their N nutrition (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2009) than when grown alone. However, this beneficial effect seems to depend on the non-fixing companion plant since (Fan *et al.*, 2006) observed that faba bean intercropped with wheat increased their %Ndfa, but this was not the case with faba bean intercropped with maize. Moreover, nitrate fertilization inhibited N₂ fixation from several days to weeks (Fan *et al.*, 2006; Naudin *et al.*, 2010). In our growth conditions with a low N fertilization (100 kg.N.ha⁻¹), an increase in S input from 30 to 60 kg.S.ha⁻¹ promoted a 1.3 fold increase in the %Ndfa of clover. This result was in accordance with *Varin et al.*

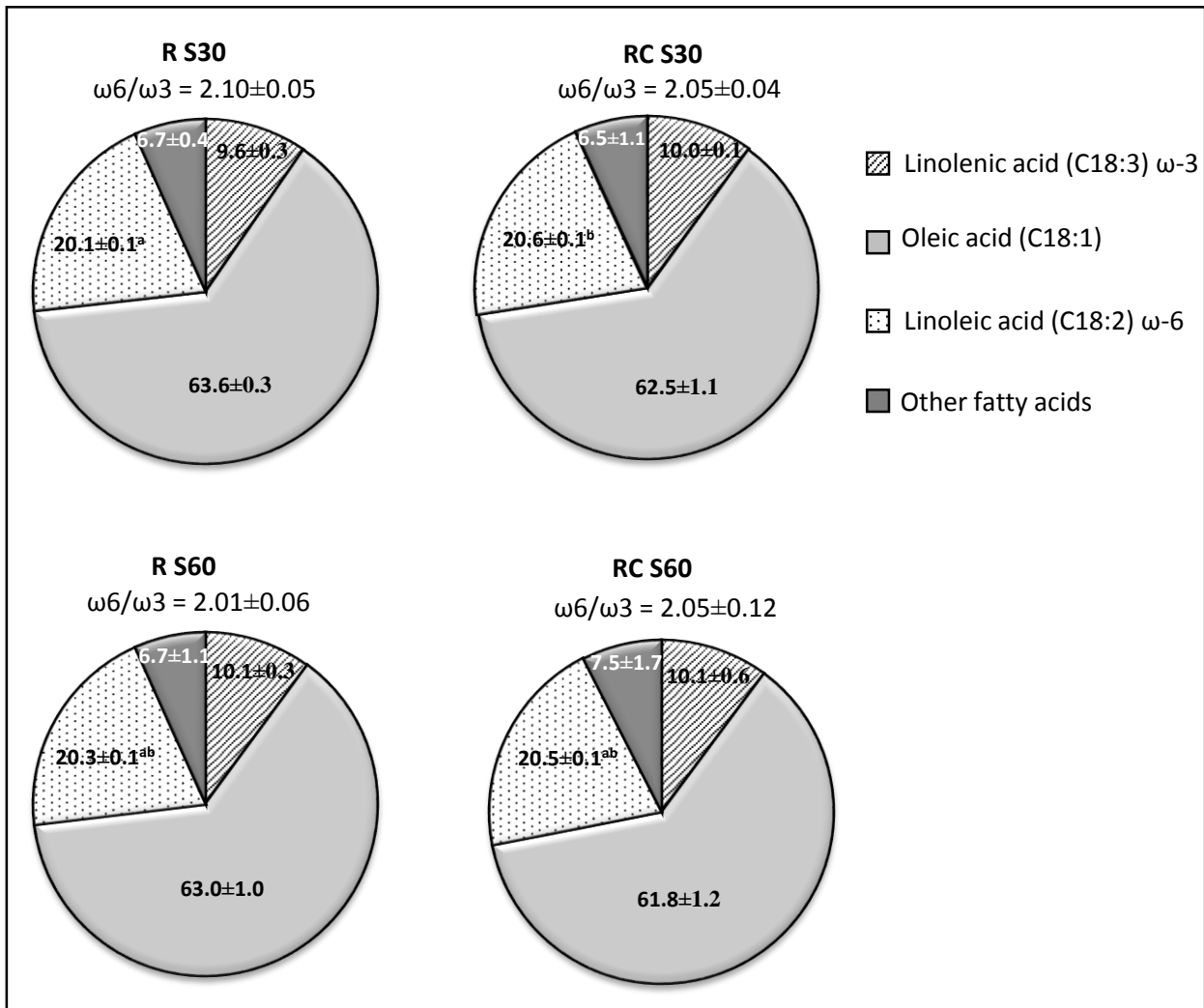


Figure 4 : Fatty acid composition (in %) of mature seeds harvested from rapeseed grown as a sole crop (R) and intercropped (RC) with clover under S30 and S60 fertilization. The $\omega 6/\omega 3$ ratios are also indicated above the pie charts. Values are mean \pm SE for n=3. Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

(2010) who have demonstrated that in white clover S fertilization increased the nodule number, the individual volume of nodules, and nitrogenase activity, and this indicated that S fertilizer alleviated the inhibitory effect of N fertilization commonly observed in legume species (Soussana *et al.*, 2002). As a consequence, our results suggest that S fertilization may enhance niche segregation for N resources in rapeseed-legume mixtures. However, even if the Ndff of rapeseed was improved in mixture with clover at S30 (1.2 fold), an increase on the S fertilization level (S60) has no effect on this parameter. Despite this improvement in Ndff observed at S30, the N content of rapeseed remained almost the same whatever the growth condition, which is in contrast to previous findings from *Brassica napus*-pea intercrops that showed a greater rapeseed N content than in monocrops (Szumigalski and Van Acker, 2006). Nevertheless, at moderate S fertilization (S30), mixing induced a greater N fertilizer use efficiency, which may help to preserve N soil resources.

In this study, the biomasses of rapeseed remained the same irrespective of the cropping type (monocrop or mixture) and reached around 46 gDW.plant⁻¹. Moreover, in mixture, the increase in S fertilization from 30 to 60 kg.S.ha⁻¹ had no effect on the growth of rapeseed and clover (Table 2). Additionally, our results showed that the yield of rapeseed was similar when it was grown as a monocrop with S30 and S60 but also in mixture with clover at S30. This data suggests that, in monocrops, S fertilization has no effect on rapeseed yield production. Moreover, in mixture with S30, the presence of clover was not detrimental to rapeseed yield. In contrast, in mixture with S60, the yield of rapeseed is significantly lower than rapeseed grown in mixture with S30 (3.3 versus 3.8 t.ha⁻¹, respectively). Most previous studies on intercropping systems have considered grain species (for example maize, wheat, barley or rapeseed associated with faba bean or pea) and determined a global yield of both species (Fan *et al.*, 2006; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2009; Naudin *et al.*, 2010; Yahuza, 2012). Very often, a beneficial effect has been shown in terms of land equivalent ratio (LER) even when each species produced less than their corresponding monocrops. In this study, our aim was to consider only the yield of rapeseed and it was interesting to note that the presence of the legume has no detrimental effect on this parameter when S fertilization is low (S30). The results recorded at S60 were consistent with a previous study showing that in wheat-faba mixtures, wheat seed yield was substantially reduced when S fertilizer was applied (Yahuza, 2012). However, Bergkvist (2002) reported that the effects of different varieties of white clover were not consistent, with some varieties decreasing rapeseed yield and others improving it. Therefore, consideration of varieties other than Cegalo used in our study may lead to promotion or suppression of the S effect. Finally, cropping (monocrops or mixtures) or S fertilization conditions have no effect on the seed quality components (protein, oil and glucosinolate contents and oil composition) except for linoleic

acid (ω -6) which is significantly higher in seeds of rapeseed in mixture grown with S30 in comparison to the monocrop. However, regardless of the treatment, the ω -6/ ω -3 ratio of rapeseed seeds remained close to 2, which is considered a good value for rapeseed oil quality (D'Hooghe *et al.*, 2014).

All these data suggest that in spite of the high S needs of clover and rapeseed, no increase in S fertilization is generally recommended for rapeseed monocrops (30 kg.S.ha⁻¹; Terres Inovia) in order to maintain the yield and seed quality of rapeseed grown in mixture.

Acknowledgments

The authors are most grateful to the PLATIN' (Plateau d'Isotopie de Normandie) core facility for the elemental analysis used in this study. The authors thank Laurence Cantrill for improving the English in the manuscript. The authors thank the seed producers, Caussade-Semences for seeds of clover and lupine, and Jouffray-Drillaud Eco Performance for vetch seeds.

Discussion générale et perspectives



Discussion générale et perspectives

I. Discussion

I.1. Contexte général et rappel des objectifs de la thèse

Face aux enjeux économiques et environnementaux actuels, les chercheurs et les agriculteurs sont amenés à repenser et à développer de nouvelles stratégies agronomiques afin de diminuer l'utilisation des engrais azotés, tout en maintenant des niveaux de production et de qualité élevés (Griffon, 1999 ; Tilman *et al.*, 2002). Parmi ces stratégies, l'utilisation de cultures associées (Willey, 1979a) qui consistent à cultiver sur une même surface et pendant une période significative de leur développement une espèce de grande culture et une Fabacée, capable de fixer l'azote atmosphérique grâce à son association symbiotique avec des bactéries du sol de la famille des Rhizobiacées, constitue une piste d'amélioration intéressante. En effet, si les bénéfiques de l'association des Fabacées aux céréales sont connus depuis longtemps (pour revue, Malézieux *et al.*, 2009), des résultats récents montrent des intérêts équivalents chez les oléagineux comme le colza (Jamont *et al.*, 2013a ; Cadoux *et al.*, 2015). De par sa faible efficacité d'utilisation de l'azote (Schjoerring *et al.*, 1995), la culture du colza nécessite une fertilisation azotée particulièrement importante (Rathke *et al.*, 2005). De ce fait, le colza d'hiver constitue une plante de choix pour l'étude des cultures associées dans un contexte de diminution des intrants azotés. En France, l'association de Fabacées avec le colza d'hiver est une pratique qui commence à se développer. Les premiers essais réalisés en plein champ par Terres Inovia permettent d'être optimiste quant à l'intérêt des associations colza-Fabacées, puisqu'elles permettraient d'obtenir un rendement en graines similaires à celui du colza en monoculture mais avec une dose de fertilisant azoté moindre de 30 kg N.ha⁻¹. Toutefois, les études portant sur ces associations sont récentes et peu nombreuses (Jamont *et al.*, 2013a ; Cadoux *et al.*, 2015). Il apparaît donc indispensable d'étudier, d'évaluer et de mieux comprendre les différents processus mis en jeu (compétition, facilitation) entre les deux espèces au sein de l'association.

Ainsi, ce travail de thèse, dont la finalité agronomique est de limiter l'apport d'engrais azotés à la culture de colza d'hiver, avait pour objectifs (i) **d'analyser et de comprendre le fonctionnement de l'association colza-Fabacée, et plus particulièrement d'évaluer l'impact de la présence de la Fabacée sur les performances agronomiques du colza en condition de faibles intrants azotés (biomasse, nutrition azotée et soufrée, rendement grainier et qualité des graines),** (ii) **d'étudier l'effet d'une modulation de la fertilisation soufrée sur les performances de**

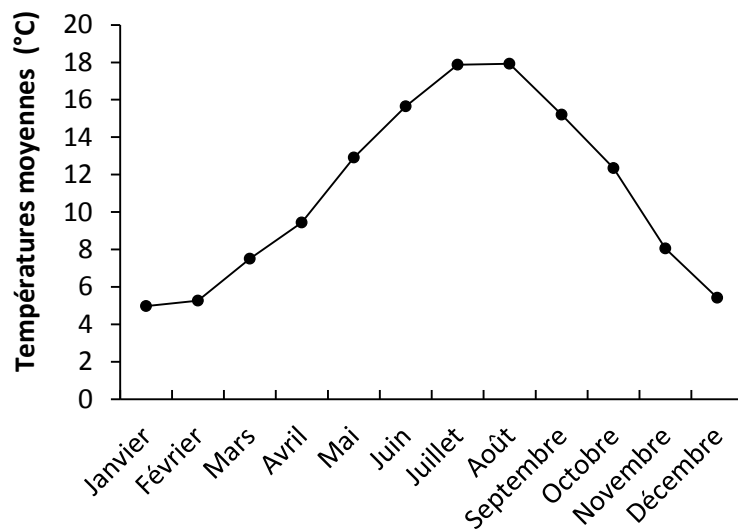


Figure 1: Températures (°C) moyennes mensuelles enregistrées par la station météorologique de St Pierre-sur-Dives (Normandie, Calvados (14)) sur les 30 dernières années de 1986 à 2016.

l'association et enfin (iii) d'évaluer l'impact des Fabacées sur le lessivage de l'azote et du soufre durant la culture.

Deux stratégies de cultures associant colza et Fabacées pouvaient être envisagées : (i) une culture associant des Fabacées gélives pour obtenir une destruction par le gel de ces plantes en hiver et permettant ainsi la restitution d'azote au printemps par minéralisation des nécromasses aérienne et racinaire et (ii) une culture associant des Fabacées non gélives continuant à fixer l'azote atmosphérique pendant toute la durée de la culture du colza, et permettant une restitution d'azote tout au long de son cycle de développement par exsudation de composés azotés et/ou minéralisation de la nécromasse produite en continu. Cependant, compte-tenu des conditions climatiques de la Normandie, dont les températures hivernales moyennes s'élèvent à 5°C (**Figure 1**), l'association d'un couvert gélif de Fabacées au colza d'hiver semblait difficilement envisageable. Des essais expérimentaux effectués par Terres Inovia ont d'ailleurs soulevé la difficulté de maîtriser le développement des Fabacées suite à leur non destruction par le gel (*Cadoux et al., 2015*). Notre stratégie de recherche s'est donc orientée vers une **culture de colza d'hiver associée à des Fabacées non gélives**. De plus, afin de répondre à la finalité agronomique qui est de limiter l'utilisation des engrais azotés tout en maintenant un rendement élevé du colza, nous avons utilisés les Fabacées comme plantes compagnes dans un **système additif** dans lequel la densité de colza en association est la même qu'en monoculture.

I.2. Impact des associations sur la performance agronomique du colza au stade rosette et compétitivité des Fabacées

Dans un premier temps, nous avons donc entrepris un criblage de sept Fabacées en conditions contrôlées (*Vicia sativa* L., *Lathyrus sativus* L., *Lens culinaris* L., *Trifolium incarnatum* L., *Lupinus albus* L., *Vicia Faba*, *Trigonella foenum-graecum* ; **Matériel et Méthodes**) se distinguant par des architectures aériennes et racinaires différentes (**Matériel et Méthodes, Tableau 2**).

Pour ce criblage, deux aspects principaux ont été considérés : (i) les performances du colza au stade rosette en termes de biomasse et de nutriments azotés et soufrés et (ii) la capacité de la Fabacée à se développer en présence du colza (compétition interspécifique). Sur ce dernier critère, le fénugrec (*Trigonella foenum-graecum*) a été d'emblée éliminé compte-tenu de ses difficultés à croître en présence du colza. Avec les six autres Fabacées, les résultats ont montré une augmentation significative de la biomasse (**Chapitre 1, Figure 1A**) et de la quantité totale d'azote et de soufre (**Chapitre 1, Figures 4A et 5A**) du colza au stade rosette comparé à la monoculture de

colza (deux plantes par pot). Toutefois, cet impact positif sur la croissance du colza était contrasté selon l'espèce de Fabacée considérée. En effet, parmi les six associations testées (colza-gesse, colza-lentille, colza-trèfle, colza-lupin, colza-vesce et colza-féverole), l'association colza-lupin est celle qui a présenté les meilleurs effets sur la croissance du colza. En effet, le colza cultivé avec le lupin a produit deux fois plus de biomasse totale et a prélevé des quantités d'azote (+100%) et de soufre (+125%) plus importantes. En revanche, l'association colza-vesce a été la moins performante avec une augmentation de la biomasse totale du colza de seulement 15%, et s'accompagnant notamment d'une diminution de 20% de sa biomasse racinaire. **Le lupin et la vesce ont ainsi été retenus pour la suite des travaux afin de comprendre le(s) processus responsable(s) de leurs impacts contrastés sur la croissance du colza.** Comparé aux autres associations, l'association colza-trèfle présentait des résultats intermédiaires, avec une augmentation de la biomasse totale du colza de 45% et des quantités d'azote et de soufre prélevées plus importantes (respectivement de 80 et 40%). Par ailleurs, il a également été observé que **le trèfle cultivé en association présentait une forte augmentation de sa biomasse racinaire (+450% comparé à la monoculture) (Chapitre 1, Figure 1B).** Cette stimulation de la croissance racinaire peut s'expliquer notamment par la forte compétition exercée par le colza vis-à-vis des ressources du sol (azote, soufre, phosphore, eau) obligeant ainsi le trèfle à développer d'avantage son système racinaire afin de prospecter un volume de sol plus important. Comme décrit dans la littérature, la rhizodéposition azotée provient essentiellement de la dégradation des racines consécutive à la croissance et la progression du système racinaire dans le sol (pour revue *Fustec et al., 2010*). Ainsi, comparativement aux deux autres associations retenues (lupin-colza et vesce-colza), ce fort développement racinaire du trèfle pourrait entraîner une rhizodéposition azotée plus élevée et potentiellement à terme sur un cycle de culture complet un transfert d'azote plus important vers le colza. De ce fait, **l'association trèfle colza a également été retenue** pour la suite des expérimentations visant notamment à quantifier et à comparer le transfert potentiel d'azote des Fabacées vers le colza au stade rosette (**Chapitre 3**) et dont les résultats seront discutés plus loin dans ce document. Par ailleurs, la hauteur du couvert joue un rôle important dans le partage de la lumière entre les différentes plantes au sein des cultures associées (Francis 1981 ; Davis et Garcia, 1983; Galwey *et al.*, 1986 ; Keating et Carberry 1993 ; Midmore, 1993). Ainsi, la hauteur du couvert du lupin et du trèfle, inférieure à celle du colza, présente l'avantage de ne pas créer d'ombrage au colza et a donc été un critère supplémentaire dans le choix de ces deux espèces (**Chapitre 1, Figure 3**).

D'autre part, la capacité de la Fabacée à résister à la compétition avec le colza a confirmé cette sélection du lupin et du trèfle. Parmi les sept Fabacées, ces deux espèces sont celles qui ont le mieux résisté à la compétition interspécifique. En effet, les résultats obtenus ont montré que la croissance (biomasse et nutriments azotés et soufrés) du lupin et du trèfle n'est pas affectée en présence du colza (**Chapitre 1, Figures 1B, 4B et 5B**) contrairement aux autres Fabacées pour lesquelles une réduction de la biomasse importante (30% en moyenne) a pu être observée (**Chapitre 1, Figure 1B**).

Des études menées sur le partage des ressources azotées en cultures associées céréale-Fabacée ont montré que les performances de l'association, particulièrement fortes en situation de bas niveaux intrants azotés (Corre-Hellou *et al.*, 2006a,b ; Bedoussac et Justes, 2010a ; Naudin *et al.*, 2010, Bedoussac *et al.*, 2014), seraient principalement dû à l'augmentation de la complémentarité de niche pour l'azote. Ainsi, l'expérimentation conduite en conditions contrôlées en situation de faible disponibilité en azote (0,12% ; **Chapitre 2**) avec les trois associations retenues à l'issue du criblage (colza-vesce, colza-trèfle et colza-lupin) montre des résultats allant dans ce sens. En effet, en accord avec la littérature, nous avons constaté une augmentation de la proportion d'azote issu de la fixation de l'azote atmosphérique (%Ndfa) chez les Fabacées cultivées en association (34, 140 et 290% respectivement pour le lupin, le trèfle et la vesce) comparativement à leur monoculture (**Chapitre 2, Figure 3**). Cette augmentation est cependant plus importante que celle observée classiquement au sein des associations céréale-Fabacée. Ce résultat peut notamment s'expliquer par le fait que les besoins azotés et les capacités d'absorption de l'azote du colza sont plus élevés que ceux des céréales, ce qui conduirait à une diminution des ressources azotées du sol disponibles pour la Fabacée. Dans ce contexte, celle-ci augmenterait ses capacités de fixation de l'azote atmosphérique afin de maintenir sa croissance sur un milieu pauvre en azote minéral. Cette complémentarité de niche confirme l'intérêt de ces Fabacées dans des situations où l'azote est limitant et plus particulièrement lorsqu'elles sont associées avec des plantes fortement exigeantes en azote comme le colza. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les associations céréales-Fabacées montrant notamment que l'équilibre entre la fixation symbiotique d'azote de la Fabacée et le prélèvement d'azote minéral du sol par les deux espèces conditionnent fortement la performance de l'association (Fujita *et al.*, 1992 ; Tofinga *et al.*, 1993 ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2001a,b ; Corre-Hellou 2005 ; Corre-Hellou *et al.*, 2006a ; Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2003 ; Corre-Hellou et Crozat 2004, Naudin *et al.*, 2010).

Cette expérimentation conduite en condition limitante d'intrants azotés a permis de mettre en évidence le **rôle significatif du trèfle et du lupin dans la préservation des ressources en azote total du sol**. En effet, les résultats montrent que comparativement au sol provenant de la monoculture de colza et de l'association colza-vesce, **le pool azoté du sol provenant des associations lupin-colza et trèfle-colza en fin de culture est plus élevé de respectivement de 25 et 50% (Chapitre 2, Figure 4B)**. Des études portant sur les associations Graminées-Fabacées ayant montré que ces dernières pouvaient déposer une quantité significative d'azote dans le sol et ainsi augmenter le pool d'azote du sol (Gylfadottir *et al.*, 2007 ; Fustec *et al.*, 2010 ; Pirhofer-Walzl *et al.*, 2012), il peut être suggéré que le trèfle et le lupin présenteraient donc des capacités de rhizodéposition (exsudation de composés N et/ou dégradation de la nécromasse racinaire) plus importantes que la vesce. Par ailleurs, deux hypothèses peuvent expliquer cette préservation du pool azoté du sol. La première est que le colza a absorbé et utilisé préférentiellement pour sa croissance l'azote provenant de la rhizodéposition du trèfle et du lupin, préservant ainsi une partie du stock d'azote du sol initialement présent. La deuxième est que les composés azotés provenant de la rhizodéposition des Fabacées ne seraient pas ou peu absorbés par le colza (séquestration par les microorganismes du sol par exemple) et contribueraient ainsi à augmenter au pool d'azote total du sol.

Au cours de cette expérimentation, nous avons également montré un maintien des **teneurs en chlorophylles des feuilles âgées du colza associé au trèfle** comparativement aux mêmes feuilles provenant du colza cultivé en monoculture (une plante par pot (R) ; (Chapitre 2, Figure 2). Chez le colza au stade végétatif, la dégradation des chlorophylles des feuilles matures est associée à un processus de sénescence séquentielle qui permet de maintenir la croissance du colza grâce à une mobilisation d'azote endogène des tissus sénescents (feuilles âgées) vers les organes en croissance (jeunes feuilles), mobilisation qui est exacerbée lors d'une faible disponibilité en azote du sol (Gombert *et al.*, 2006, Avice et Etienne 2014). Desclos-Théveniau *et al.* (2014) suggèrent que le maintien des teneurs foliaires en chlorophylles chez *Brassica napus* permettrait une augmentation de la durée de vie des feuilles. A terme, cette augmentation de la durée de vie des feuilles pourrait permettre de réduire l'asynchronisme observé entre la remobilisation de l'azote foliaire et le remplissage des graines de colza et permettre ainsi une augmentation du rendement du colza (Malagoli *et al.*, 2005b). Ainsi, dans le cas de l'association trèfle-colza, le retard de sénescence foliaire du colza pourrait s'expliquer par une meilleure disponibilité en azote du sol (hypothèses développées ci-dessus) qui permettrait au colza de maintenir sa croissance en limitant la remobilisation d'azote endogène *via* la sénescence. Sur un cycle de culture entier, il peut être suggéré que ce ralentissement de la progression de la sénescence pourrait se traduire par une

augmentation de durée de vie des feuilles et conduire à une augmentation de rendement du colza cultivé en association.

Par ailleurs, cette expérimentation a permis de souligner la difficulté d'évaluer en mésocosme selon un système additif les bénéfices des associations sur la croissance du colza. Ainsi, au cours des expérimentations, deux monocultures de colza (témoins) ont été utilisées pour comparer les performances de l'association colza-Fabacée : (i) l'une contenant deux plantes de colza par pot (RR) et (ii) l'autre ne contenant qu'une seule plante de colza par pot (R) (**Chapitre 2**). Les résultats ont montré qu'il était préférable d'utiliser la monoculture R pour comparer les performances de l'association. En effet, alors que dans la monoculture R les plantes de colza présentaient une biomasse et un nombre de rangs foliaires équivalents à ceux cultivés en association, celles issues de la monoculture RR présentaient un retard de croissance se traduisant notamment par une biomasse et un nombre de rangs foliaires (-4 rangs) significativement plus faibles, probablement dû à la forte compétition intraspécifique (colza-colza) (**Chapitre 2, Figure 1**). Dans ces conditions, il est donc difficile de déterminer si les effets bénéfiques observés en association sont dus à un meilleur accès aux ressources azotées lié à la ségrégation de niche entre espèces ou seulement à un stade de croissance plus avancé résultant d'une compétition globalement moins forte que ce soit pour les ressources du sol ou la lumière. Ces résultats sont en accord avec Garnier *et al.* (1997) qui avaient déjà abordé la difficulté du choix des témoins en comparant des mélanges graminées-Fabacées en systèmes substitutif et additif. Ces auteurs affirmaient, que pour tester correctement l'hypothèse d'une augmentation de la productivité d'une association, il est plus pertinent de comparer la productivité de ces mélanges avec celle de la monoculture la plus productive.

I.3. Transfert d'azote de la vesce, du lupin et du trèfle vers le colza au stade rosette

Comme nous l'avons énoncé ci-dessus, le plus fort maintien du pool azoté du sol constaté dans les associations colza-lupin et colza-trèfle que dans l'association colza-vesce pourrait être dû à une rhizodéposition et/ou à un transfert vers le colza plus importants d'azote par le lupin et le trèfle que par la vesce. De plus, l'expérimentation de criblage a montré que le trèfle présentait un système racinaire plus développé lorsqu'il se trouvait en association et qu'il pouvait ainsi potentiellement augmenter sa rhizodéposition. L'expérimentation réalisée grâce à l'utilisation d'un dispositif de type « split-root system » couplé à un marquage au ^{15}N a montré qu'après 3 mois de culture aucun transfert significatif d'azote de la vesce vers le colza n'avait eu lieu (**Chapitre 3, Tableau 4**). Cette absence de transfert peut s'expliquer par le faible développement racinaire de la

vesce lorsque que celle-ci est cultivée avec le colza (**Chapitre 3, Tableau 2**) suggérant ainsi sa faible résistance à la présence du colza. En revanche, un **transfert significatif d'azote a été mesuré du lupin et du trèfle vers le colza (Chapitre 3, Tableau 5)** à l'image de ce que Cortès-Mora *et al.* (2010) avaient mis en évidence dans l'association colza-féverole. Durant les 3 mois de culture associée, l'azote transféré représente seulement 2 à 3% de l'azote total du colza (**Chapitre 3, Tableau 5**), et ne permet pas d'améliorer la croissance du colza (biomasse et quantité d'azote similaires à la monoculture) (**Chapitre 4, Tableau 4**). Les valeurs de transfert mesurées sont donc logiquement très inférieures à celles mesurées à l'issue d'un cycle entier de culture (Høgh-Jensen et Schjoering, 2001). De plus, compte tenu du dispositif expérimental utilisé (« split-root system»), seule une partie du système racinaire des Fabacées était en contact avec le système racinaire du colza réduisant d'une part, le transfert d'azote pouvant se faire *via* la rhizodéposition, et d'autre part la compétition entre les deux plantes pour le partage des ressources azotées du sol diminuant ainsi l'effet de complémentarité de niche. En effet, des études ont montré que la diminution ou l'absence de contact entre les systèmes racinaires des deux espèces associées diminuait la compétition entre les deux plantes et se traduisait par une diminution des transferts d'azote de la Fabacée vers la céréale (Jensen, 1996b, Xiao *et al.*, 2004 ; Brauman *et al.*, 2011).

Lors de cette expérimentation, nous avons également constaté que dans nos conditions expérimentales, **le lupin privilégiait la fixation de l'azote atmosphérique** à l'absorption racinaire d'azote contrairement au trèfle et à la vesce. En effet, les valeurs d'excès isotopique en ^{15}N mesurées étaient plus faibles chez le lupin (environ 15%) que chez le trèfle et la vesce (environ 60%) (**Tableau 3 ; Chapitre 4**). Ces résultats indiquent la source d'azote minéral (solution nutritive marquée au $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$) présente dans le compartiment donneur ne constitue pas la source principale d'azote du lupin, et ceci malgré un développement de son système racinaire important dans ce compartiment au cours de l'expérimentation (**Chapitre 4, Tableau 2**). Par ailleurs, nos résultats montrent que la forte disponibilité en azote minéral du milieu (solution de NH_4NO_3 à 1mM renouvelée 2 fois par semaine) n'affecte pas les capacités de fixation d'azote atmosphérique du lupin contrairement à ce qui a été observé chez le trèfle. Ces résultats sont accords avec de précédentes études montrant que le lupin est peu sensible au NH_4NO_3 et plus généralement aux fortes concentrations en N minéral (Lucinski *et al.*, 2002 ; Serrano et Chamber, 1990 ; Goergen *et al.*, 2009) alors que la fixation d'azote atmosphérique du trèfle est négativement affectée par un apport d'azote minéral (Soussana *et al.*, 2002 ; Tallec *et al.*, 2009). De plus, lors de l'expérimentation décrite au **chapitre 3**, nous avons observé qu'en monoculture le lupin possède une capacité de fixation de l'azote atmosphérique plus importante (%Ndfa de 60%) que celle de la vesce (%Ndfa de 17%) et du trèfle (%Ndfa de 16%). Par ailleurs, nous avons montré que la capacité de fixation de

ces trois Fabacées est augmentée lorsqu'elles sont cultivées en association avec le colza pour atteindre des valeurs de %Ndfa de 80, 70 et 40% respectivement pour le lupin, la vesce et le trèfle. Ainsi, même si les capacités de fixation de la vesce sont fortement augmentées en association et atteignent des valeurs proches du lupin, l'absence de transfert d'azote de cette plante vers le colza laisse supposer des capacités d'exsudation de composés azotés faibles voire nulles rendant cette Fabacée peu intéressante dans un contexte d'association visant à réduire l'utilisation d'intrants azotés. A contrario, le trèfle et surtout le lupin, qui présentent à la fois de fortes capacités de fixation d'azote atmosphérique et de transfert d'azote vers le colza, seraient donc des Fabacées à privilégier dans le cadre du recours à des pratiques agricoles visant à utiliser moins d'intrants azotés.

I.4. Effet du couvert de trèfle sur les performances agronomiques du colza au stade reproducteur et sur le lessivage du nitrate et du sulfate

Compte-tenus des résultats obtenus en conditions contrôlées, le trèfle et le lupin semblent être des Fabacées efficaces pour améliorer les performances du colza au stade rosette. Par conséquent, une première expérimentation a été réalisée en cases lysimétriques (conditions de plein champ) afin d'évaluer l'impact de ces deux Fabacées sur le rendement grainier et la qualité des graines de colza. Cependant, lors de cette expérimentation préliminaire, nous avons observé que le lupin ne s'est pas (ou très peu) développé sur les sols argilo-calcaires de la plaine de Caen (résultats non présentés). C'est pourquoi, nous avons poursuivi les travaux de recherche en considérant uniquement l'association colza-trèfle (**Chapitre 4**).

Cette seconde expérimentation en conditions de plein champ a permis de montrer qu'en condition d'intrants azotés modérés ($100 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$), le rendement du colza cultivé en présence de trèfle (système additif) était similaire au rendement du colza en monoculture (**Chapitre 4**). En effet, la masse de graines par m^2 (de $357 \text{ g de MS} \cdot \text{m}^{-2}$ en moyenne, soit $35,7 \text{ q} \cdot \text{ha}^{-1}$) ainsi que le poids de mille graines ($3,9 \text{ g}$ en moyenne), composantes principales du rendement, n'ont pas été affectés par la présence du couvert de trèfle (**Chapitre 5, Tableau 3**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le colza d'hiver associé à des mélanges de Fabacées gélives (Cadoux *et al.*, 2015) montrant que la présence des Fabacées n'affecte pas le rendement du colza. Ainsi, contrairement à certaines études rapportant un effet négatif des couverts de Fabacées sur les performances agronomiques de la moutarde (Banik *et al.*, 2000 ; Waterer *et al.*, 1994), la présence du trèfle au sein de l'association n'affecte pas le rendement du colza. De plus, l'analyse des teneurs en huile et

en protéines ainsi que l'analyse de la composition en acides gras de l'huile des graines de colza cultivés en association et en monoculture a montré que la qualité des graines (teneur en huile, protéines et composition en acides gras) du colza cultivé en présence de trèfle était comparable à la qualité des graines de colza cultivés seuls (**Chapitre 5, Tableau 3**). A notre connaissance, notre étude apporte pour la première fois des informations quant à l'absence d'effet négatif de la présence du trèfle sur les paramètres de rendement grainier et sur la qualité des graines de colza. Par ailleurs, pour un apport de 30 kg S.ha⁻¹, la proportion d'azote du colza provenant du fertilisant (%Ndff) est plus élevée en association qu'en monoculture (**Chapitre 5, Figure 3B**). Ce résultat suggère qu'en association, **la complémentarité de niche des deux espèces permettrait au colza d'absorber une quantité plus importante d'azote issue du fertilisant.**

D'autre part, cette expérimentation conduite en cases lysimétriques a également montré qu'au cours de la période automno-hivernale (avant fertilisation), la présence d'un couvert de trèfle associé au colza augmentait de manière significative le lessivage du nitrate (notamment en décembre passant de 9,41 ±1,37 à 16,14 ±2,16 kg N-NO₃⁻.ha⁻¹) et surtout du sulfate (augmentation d'un facteur 2, passant de 3,31 ±0,79 à 7,04 ±1,39 kg S-SO₄²⁻.ha⁻¹) comparé à la monoculture de colza (**Chapitre 5, Figure 2A**). Si l'impact négatif des Fabacées sur le lessivage du nitrate est bien connu (Hauggaard-Nielsen *et al.*, 2003), celui de ces dernières sur le lessivage du sulfate est particulièrement novateur puisqu'aucune donnée, à notre connaissance, n'est disponible dans la littérature. Toutefois, en dépit d'un apport de fertilisation soufrée effectué au mois de mars, il est à noter que ces différences de lessivage de sulfate ne sont plus observées durant le reste de la période de culture (**Chapitre 5, Figure 2B**). Ceci peut s'expliquer d'une part, par les faibles précipitations enregistrées à partir du mois de mars et d'autre part, par une augmentation des besoins en soufre des plantes afin d'assurer leur croissance à la reprise de végétation en sortie d'hiver.

I.5. Effet de la fertilisation soufrée sur les performances de l'association colza-trèfle

Compte-tenu des pertes de sulfate pendant la période automno-hivernal, mais également des fortes exigences en soufre des deux plantes (colza et trèfle), **l'hypothèse qu'un apport de soufre supplémentaire pourrait améliorer les performances agronomiques de l'association a été testée.** En effet, le colza est une espèce exigeante en S (besoins estimés à environ 45 kg.ha⁻¹) et particulièrement sensible à la limitation en cet élément pouvant ainsi provoquer une diminution de rendement (Janzen et Bettany 1984 ; McGrath et Zhao, 1996 ; Malhi *et al.*, 2007) et une perte de

qualité des graines (Dubousset *et al.*, 2010 ; D'Hooghe *et al.*, 2014 ; Brunel-Muguet *et al.*, 2015). En France, l'institut technique Terres Inovia recommande un apport d'engrais soufrés de 30 kg de S.ha⁻¹ de colza afin de limiter ces pertes. Par ailleurs, le trèfle est également une plante exigeante en S (Walker *et al.*, 1956 ; Gilbert et Robson, 1984a,b ; Sinclair *et al.*, 1996 ; Tallec *et al.*, 2008, 2009) et l'apport en fertilisant soufré permet d'améliorer les capacités de fixation d'azote atmosphérique *via* notamment une augmentation du nombre de nodules et de l'activité nitrogénase (Varin *et al.*, 2009, 2010). A titre d'exemple, Varin *et al.* (2009) ont montré (comparativement à une culture témoin non fertilisée en S) qu'un apport de 24 kg S.ha⁻¹ permettait une augmentation de biomasse et de l'activité nitrogénase du trèfle cultivé en mésocosmes avec une fertilisation azotée de 100 kg.N.ha⁻¹. Compte-tenu de tous ces éléments et du fait que nos cultures associées soient conduites en système additif, nous avons réalisé un apport de 30 kg S .ha⁻¹ (S30) correspondant à la fertilisation soufrée préconisée pour la monoculture de colza et un apport deux fois plus important, *i.e.* de 60 kg S .ha⁻¹ (S60), correspondant à la somme des deux niveaux de fertilisation préconisés pour le colza et le trèfle.

Cette expérimentation nous a permis de montrer qu'un **apport de S doublé permet d'augmenter significativement (facteur 1,3) la capacité de fixation d'azote atmosphérique (%Ndfa) du trèfle cultivé en association (Chapitre 5, Figure 3A)**. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes montrant un effet positif de la fertilisation soufrée sur le nombre de nodules et l'activité nitrogénase des du trèfle blanc (Varin *et al.*, 2009, 2010). Ainsi, l'ensemble de nos études montre que la capacité de fixation d'azote atmosphérique du trèfle peut être améliorée d'une part *via* l'association avec le colza (augmentation du %Ndfa de 16 à 40% ; **Chapitre 3**) et d'autre part, grâce à une augmentation des apports soufrés (de 30 à 60 kg S.ha⁻¹) au sein de cette association (augmentation du %Ndfa de 40 à 52% ; **Chapitre 4**). Cependant, l'augmentation de la fertilisation S (de 30 à 60 kg S.ha⁻¹), quelles que soient les conditions de culture du colza (monoculture ou association), n'a eu aucun impact sur le %Ndff. De plus, l'analyse du rendement grainier et de la qualité grainière a permis de montrer qu'un apport de soufre supplémentaire n'améliorait pas les performances agronomiques du colza, qu'il soit cultivé en monoculture ou en association. De manière surprenante, il a même été constaté que le rendement grainier du colza cultivé en association avec 60 kg S .ha⁻¹ était plus faible que le rendement grainier du colza cultivé en monoculture (**Chapitre 5, Tableau 3**).

Outre le fait d'apporter des résultats nouveaux et intéressants concernant le lessivage du sulfate, cette étude montre que l'apport de soufre au-delà de 30 kg S.ha⁻¹ n'améliore pas les performances agronomiques de l'association colza-trèfle et peut même se traduire par des effets négatifs notamment sur le rendement grainier du colza. Par conséquent, dans le cadre des cultures

associées colza-trèfle, la dose actuelle préconisée par Terres Inovia (30 kg S.ha⁻¹) pour la monoculture du colza semble être adéquate en vue de l'obtention d'un rendement du colza en association satisfaisant en conditions d'intrants azotés modérés (100 kg N.ha⁻¹).

Au bilan, les travaux menés dans le cadre de cette thèse contribuent à enrichir les recherches encore peu nombreuses sur les associations entre les Brassicacées et les Fabacées. Les expérimentations effectuées en conditions contrôlées ont permis de sélectionner, à partir de sept Fabacées, deux Fabacées présentant un bon potentiel pour être associé au colza : le lupin et le trèfle. Nos travaux ont permis de préciser les modalités d'action de ces Fabacées (augmentation de la capacité de fixation de l'azote atmosphérique, enrichissement du sol en azote) sur les performances de l'association, notamment sur la croissance, la teneur foliaire en chlorophylles, les nutriments N et S et sur le rendement et la qualité des graines du colza.

II. Perspectives

A l'issue de ce travail de thèse, plusieurs perspectives peuvent être proposées afin de mieux caractériser les différents processus et les interactions nutritionnelles mis en jeu au sein des associations colza-Fabacées et d'en optimiser la conception et la gestion.

- Quantification et identification des composés azotés rhizodéposés par le trèfle et le lupin.

L'expérimentation effectuée en conditions d'azote limitant décrite dans le **chapitre 2** suggère que le trèfle et le lupin présentent des capacités de rhizodéposition de composés azotés (exsudation et/ou dégradation de la nécromasse racinaire) plus importantes que la vesce. L'expérimentation conduite en « split-root system » dans le **chapitre 3** confirme ces résultats. Cependant, l'origine et la nature des composés azotés transférés restent à déterminer. Pour ce faire, un système de micro-lysimètre analogue à celui précédemment utilisé au laboratoire par Paynel et Cliquet (2003) couplé à un marquage isotopique au ^{15}N des Fabacées pourrait être mis en place. Les exsudats récoltés pourraient être identifiés et quantifiés par chromatographie (échangeuse d'ions, LC-MS ou GC-MS). Ceci nous permettrait de préciser si l'azote rhizodéposé par les différentes Fabacées est sous une forme assimilable directement par le colza comme montré par Paynel et Cliquet (2003) pour le trèfle blanc (*Trifolium repens* L. : ammonium majoritairement mais également sérine et glycine) ou non (composés azotés plus complexes nécessitant leur dégradation préalable par les bactéries telluriques).

- Quantification de la contribution de la fixation de l'azote atmosphérique au maintien du pool azoté du sol et au transfert d'azote vers le colza.

L'utilisation conjointe de la technique de « split-root system » et d'un marquage isotopique en ^{15}N a permis de détecter un transfert significatif provenant de l'azote de la Fabacée vers le colza (**Chapitre 3**). Cependant cette technique ne permet pas de quantifier de manière précise le niveau de contribution de la fixation de l'azote atmosphérique aux transferts (plante-sol et plante-plante). L'utilisation d'un marquage au $^{15}\text{N}_2$ au sein d'une chambre phytotronique (Voisin *et al.*, 2000 ; Lesuffleur *et al.*, 2013) permettrait de quantifier la part d'azote issu de la fixation de N_2 transférée vers le sol et au colza, en réelle situation de bas intrants azotés. A titre d'exemple, un tel dispositif a permis à Lesuffleur *et al.* (2013) de montrer que 4% de l'azote fixé par le trèfle blanc est transféré au ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) après seulement 3 jours de marquage. Par ailleurs, cette expérimentation permettrait également de confirmer la plus faible inhibition de la fixation de l'azote atmosphérique par l'azote minéral du sol chez le lupin et de quantifier les faibles capacités de transfert d'azote de la vesce suggérées dans le **chapitre 3**.

- Identification de l'origine de l'augmentation du lessivage du sulfate sous couvert de trèfle.

Les résultats présentés dans le **chapitre 4** montrent que le lessivage du sulfate est 2 fois plus important lorsque le colza est associé au trèfle. Deux hypothèses principales peuvent expliquer cette augmentation du lessivage du sulfate. La présence du trèfle pourrait augmenter la minéralisation du soufre organique présent dans le sol et ainsi conduire à un lessivage plus important comme ceci a été montré pour le lessivage du nitrate (Beaudoin *et al.*, 2005 ; Francis *et al.*, 1994 ; Jensen et Hauggaard-Nielsen, 2003 ; Maidl *et al.*, 1996). L'augmentation du lessivage du sulfate pourrait également être due à la rhizodéposition de composés soufrés comme le sulfate ou des composés organiques ensuite minéralisés par les bactéries du sol. A l'image des expérimentations proposées pour la quantification et l'identification des composés azotés rhizodéposés, des expérimentations similaires utilisant un marquage au ³⁴S pourraient être mises en place afin de quantifier et de déterminer l'origine et la nature des composés soufrés impliqués.

- Evaluation de l'impact de différents niveaux d'intrants soufrés sur la rhizodéposition azotée du trèfle et sur le transfert d'azote vers le colza.

L'expérimentation réalisée en cases lysimétriques a montré qu'un apport plus important en soufre (60 kg.ha⁻¹ soit 2 fois la fertilisation préconisée pour ces espèces en culture pure) a permis d'augmenter la ségrégation de niche du trèfle *via* une augmentation de la contribution de la fixation de l'azote atmosphérique à sa nutrition azotée (**Chapitre 4**). Une expérimentation en conditions contrôlées avec différents niveaux d'apport en soufre couplé à un marquage isotopique en ¹⁵N permettrait d'évaluer si cet apport de soufre a des conséquences sur les quantités d'azote fixé, rhizodéposé puis transféré vers le colza.

- Optimisation de la fertilisation soufrée de l'association Fabacée-colza.

Le raisonnement de la fertilisation soufrée est complexe, l'efficacité d'alimentation d'une plante cible pouvant être modifiée par la plante compagne. L'utilisation des indicateurs de la nutrition soufrée utilisables en conditions de plein champ développés au cours des travaux doctoraux (contrat Sérapis) d'E. Sorin et A. Maillard (Sorin *et al.*, 2015 ; Maillard, 2016 ; Sorin, 2016) est à valider et à adapter aux cultures associées afin d'ajuster les doses d'intrants soufrés aux besoins réels des deux plantes (colza et Fabacées). A titre d'exemple, un des indicateurs proposés est le ratio [Mo]:[S] foliaire, dont les variations traduisent le statut soufré de la plante : une augmentation de ce ratio principalement due à une chute des teneurs en S associée à une augmentation de l'absorption de Molybdène (Mo) traduit une carence en S de la plante. Les valeurs seuils de cet indicateur ont été estimées pour le colza mais restent à déterminer pour d'autres espèces cultivées et notamment pour les Fabacées.

- Etudes de la performance de l'association colza-lupin dans différents contextes pédologiques.

Le sol argilo-calcaire de la plaine de Caen n'étant pas propice au bon développement du lupin blanc (voir discussion générale), nous avons écarté ce dernier pour les expérimentations en cases lysimétriques. Cependant, en conditions contrôlées, l'association colza-lupin a montré des résultats intéressants, avec notamment une très forte capacité de fixation et de transfert de celui-ci (**Chapitres 1 et 3**). Il serait donc pertinent de tester cette association sur différents types de sols dépourvus de calcaire actif. En effet, des résultats préliminaires obtenus sur des cases lysimétriques contenant un sol limoneux (Bretagne) ont montré un potentiel de croissance du lupin largement supérieur à celui observé sur les cases lysimétriques contenant un sol argilo-calcaire typique de la plaine de Caen.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

- A -

Amarger N. 1980. Aspect microbiologique de la culture des légumineuses. Le Sélectionneur Français **28** :61-66.

Amarger N. 1981. Selection of Rhizobium strains on their competitive ability for nodulation. *Soil Biology and Biochemistry*, **13**:481-486.

Amarger N., Mariotti A., Mariotti F., Durr J.C., Bourguignon C., Lagacherie B. 1979. Estimate of symbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in ¹⁵N natural abundance. *Plant and Soil*, **52**:269-280.

Andersen M.K., Hauggaard-Nielsen H., Ambus P., Jensen E.S. 2005. Biomass production, symbiotic nitrogen fixation and inorganic N use in dual and tri-component annual intercrops. *Plant and Soil*, **266**:273–287.

Andersen M.K., Hauggaard-Nielsen H., Weiner J., Jensen E.S. 2007. Competitive dynamics in two- and three-component intercrops. *Journal of Applied Ecology*, **44**:545-551.

Anil L., Park J., Phipps R.H., Miller F.A. 1998. Temperate intercropping of cereals for forage: review of the potential for growth and utilisation with particular reference to the Uk. *Grass Forage Science*, **53**:301-317.

Arkoun M., Jannin L., Laîné P., Mascalux-Daubresse C., Citerne S., Garnica M., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A. 2013. A physiological and molecular study of the effects of nickel deficiency and phenylphosphorodiamidate (PPD) application on urea metabolism in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil*, **362**:79-92.

Avice J.C., Etienne P. 2014. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany*, **65**:3813-3824.

- B -

Baccar R. 2007. Les associations blé-pois : quelles variétés associer en mélange ? Stage de Master 2, Agronomie, AgroParisTech, Paris.

Bais H.P., Weir T.L., 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.

Banik P., Sasmal T., Ghosal P.K., Bagchi D.K. 2000. Evaluation of mustard (*Brassica campestris* var. Toria) and legume intercropping under 1:1 and 2:1 row-replacement series systems. *Journal of Agronomy Crop Science*, **185**:9-14.

Beaudoin N., Saad J.K., Van Laethem C., Machet J.M., Maucorps J., Mary B. 2005. Nitrate leaching in intensive agriculture in Northern France: Effect of farming practices, soils and crop rotations. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **111**:292-310.

- Bedoussac L., Justes E. 2010a.** 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.
- Bedoussac L., Justes E. 2010b.** 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., Journet E.P., Hauggaard-Nielsen H., Naudin C., Corre-Hellou G., Prieur L., Jensen E.S., Justes E. 2014.** Eco-functional Intensification by Cereal-Grain Legume Intercropping in Organic Farming Systems for Increased Yields, Reduced Weeds and Improved Grain Protein Concentration In: Bellon S, Penvern S (Edition) Organic farming, Prototype for sustainable agricultures. Springer Science, Dordrecht, pp 47-64.
- Begum F., Hossain F., Islam M.M., Mondal M.R.I. 2016.** Effect of sulphur on biochemical parameters of rapeseed (*Brassica campestris* L.) in grey terrace soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **62**:261-276.
- Bellostas N., Jensen E.S. 2004.** Intercropping of cereals and grain legumes in European organic farming systems - INTERCROP. Grain legumes, pp. 14-15.
- Bergersen F.J. 1961.** The growth of rhizobium in synthetic media. *Australian Journal of Biological Sciences*, **14**:349–360.
- Bergkvist G. 2002.** Influence of white clover traits on biomass and yield in winter wheat- or winter oilseed rape-clover intercrops. *Biological Agriculture and Horticulture*, **21**:151-164.
- 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.
- Bethlenfalvay G.J., Reyes-Solis M.G., Camel S.B., Ferrera-Cerrato R. 1991** Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhiza mycelium. *Physiologia Plantarum*, **82**:113-432.
- Beuve N., Rispaill N., Laîné P., Cliquet J.B., Ourry A., Le Deunff E. 2004.** Putative role of γ -aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. *Plant, Cell and Environment*, **27**: 1035-1046.
- Biarnès V., Gaillard B., Jeuffroy M.H., Guichard L., Hellou G. 2008.** Céréales et légumineuses: une association pour produire du blé avec peu d'intrants ? *Perspectives Agricoles*, **347**: 52-55.
- Billard V., Etienne P., Jannin L., Garnica M., Cruz F., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Ourry A. 2014.** Two Biostimulants Derived from Algae or Humic Acid Induce Similar Responses in the Mineral Content and Gene Expression of Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, **33**: 305-316.
- Brauman A., Bernard L., Oris F., Taschen E., Pablo A.L., Amenc L., Fustec J., Malagoli P., Hinsinger H. 2011.** To what extent the rhizosphere of cereal/legume intercropping represents a specific microbial environment? In Colloque Rhizosphere 3, 25-30th September 2011, Perth, Australia.
- Brophy L.S., Heichel G.H. 1989** Nitrogen release from roots of alfalfa and soybean grown in sand culture. *Plant and Soil*, **116**:77-84.

Brunel-Muguet S., D'Hooghe P., Bataille M.P., Larre C., Kim TH., Trouverie J., Avice J.C., Etienne P., Duerr C. 2015. Heat stress during seed filling interferes with sulfur restriction on grain composition and seed germination in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Frontiers in Plant Science*, **6**:213.

Bulson H.A.J, Snaydon R.W., Stopes C.E. 1997. Effets of plant density on intercropped wheat and field beans in an organic farming system. *Journal of Agricultural Science*, **128**: 59-71.

- C -

Cadoux S., Sauzet G., Baillet A., Champolivier L., Pontet C., Robert C., Lieven J., Mangenot O., Fauvin P., Wagner D., Flenet F. 2014. Synthèse technique 'colza d'hiver associé à un couvert automnal'. Synthèse des essais « CLE » 2011, 2012, 2013 et 2014. Poitou-Charentes, Centre, Lorraine. Rapport de l'action Cetiom Phytosol C3110040.

Cadoux S., Sauzet G., Valantin-Morison M., Pontet C., Champolivier L., Robert C., Lieven J., Flénet F., Mangenot O., Fauvin P., Landé N. 2015. Intercropping frost sensitive legume crops with winter oilseed rape reduces weed competition, insect damage, and improves nitrogen use efficiency. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, **22**:D302.

Callaway R.M. 1995. Positive interactions among plants. *Botanical Review*, **61**:301-349.

Carter M.S., Ambus P. 2006. Biologically fixed N₂ as a source for N₂O production in a grass-clover mixture, measured by ¹⁵N₂. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **74**:13-26.

Chalk P.M. 1996. Nitrogen transfer from legumes to cereals in intercropping. In: Ito, O., Johansen, C., Adu-Gyamfi, J.J., Katayama, K., Kumar Rao, J.V.D.K., Rego, T.J. (Edition), Dynamics of Roots and Nitrogen in Cropping Systems of the Semi-arid Tropics. *Japan International Research Center for Agricultural Sciences*, Tsukuba, pp. 351-374.

Chalk P.M., In acio C.T., Craswell E.T., Chen D. 2015. Letter to the Editor: on the usage of absolute (x) and relative (d) values of ¹⁵N abundance. *Soil Biology and Biochemistry*, **85**:51-53.

Chalk P.M., Ladha J.K., Padre A. 2002. Efficacy of three ¹⁵N labelling techniques for estimating below ground N in *Sesbania rostrata*. *Biology and Fertility of Soils*, **35**:387-398.

Chalk P.M., Peoples M.B., McNeill A.M., Boddey R.M., Unkovich M.J., Gardener M.J., Silva C.F., Chen D. 2014. Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of ¹⁵N-enriched techniques, *Soil Biology and Biochemistry*, **73**:10-21.

Chardon F., Noël V., Masclaux-Daubresse C. 2012. Exploring NUE in crops and in *Arabidopsis* ideotypes to improve yield and seed quality. *Journal of Experimental Botany*, **63**:3401-3412.

Clarkson D.T., Saker L.R., Purves J.V. 1989. Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulphate Status. Evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *Journal of Experimental Botany*, **40**:953-963.

Colnenne C., Meynard J.M., Reau R., Justes E., Merrien A. 1998. Determination of critical nitrogen dilution curve for winter oilseed rape. *Annals of Botany*, **81**:311-317.

Connolly J., Wayne P., Murray R. 1990. Time course of plant-plant interactions in experimental mixtures of annuals - Density, frequency, and nutrient effects. *Oecologia*, **82**:513-526.

Coplen T.B. 2011. Guidelines and recommended terms for expression of stable isotope- ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25**:2538-2560.

Corre-Hellou G. 2005. Acquisition de l'azote dans des associations Pois-Orge (*Pisum sativum* L. - *Hordeum vulgare* L.) en relation avec le fonctionnement du peuplement. Thèse de Doctorat, Université d'Angers, France, 100p.

Corre-Hellou G., Baranger A., Bedoussac L., Cassagne N., Cannavacciuolo M., Fustec J., Pelzer E., Piva G. 2014. Interactions entre facteurs biotiques et fonctionnement des associations végétales. *Innovations Agronomiques*, **40**:25-42.

Corre-Hellou G., Brisson N. Launay M., Fustec J., Crozat Y. 2007. Effect of root depth penetration on soil N sharing and dry matter in pea-barley intercrops given different soil N supplies. *Field Crops Research*, **103**:76-85.

Corre-Hellou G., Crozat Y. 2004. N₂ fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). *European Journal of Agronomy*, **22**: 449-458.

Corre-Hellou G., Dibet A., Aveline A., Crozat Y., 2006b. Le pois au service des systèmes de culture a faibles intrants : quels besoins variétaux ? *Dossiers de l'environnement de l'Inra*, **30**: 111-116.

Corre-Hellou G., Dibet A., Hauggaard-Nielsen H., Crozat Y., Gooding M., Ambus P., Dahlmann C., von Fragstein P., Pristeri A., Monti M., Jensen E.S. 2011. The competitive ability of pea-barley intercrops against weeds and the interactions with crop productivity and soil N availability. *Field Crops Research*, **122**:264-272.

Corre-Hellou G., Fustec J., Crozat Y. 2006a. Interspecific competition for soil N and its interaction with N₂ fixation, leaf expansion and crop growth in pea-barley intercrops. *Plant and Soil*, **282**:195-208.

Cortés-Mora F.A., Piva G., Jamont M., Fustec J. 2010. Niche separation and nitrogen transfer in Brassica-Legume intercrops. *Field Vegetable and Crop Research*, **47**:581-586.

Cruz P., Soussana J.F. 1997. Mixed crops. In: Lemaire G (ed) *Diagnosis of the nitrogen status in crops*. Springer, Berlin, pp 131-144.

Curl E.A., Truelove B. 1986. *The Rhizosphere*. Advanced Series in Agricultural Sciences 15. Springer-Verlag, Heidelberg 288p.

- D -

Dahlin A.S., Stenberg M. 2010. Transfer of N from red clover to perennial ryegrass in mixed stands under different cutting strategies. *European Journal of Agronomy*, **33**:149-156.

Dariush M., Ahad M., Meysam O. 2006. Assessing the Land Equivalent Ratio (LER). Of two corn (*Zea mays* L.) varieties intercropping at various levels in karaj, Inran. *Journal of Central European Agriculture*, **7**:359-364.

Daudin D., Sierra J. 2008. Spatial and temporal variation of below-ground N transfer from a leguminous tree to an associated grass in an agroforestry system. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **126**:275-280.

- Davis J.H.C., Garcia S. 1983.** Competitive ability and growth habit of indeterminate beans and maize for intercropping. *Field Crops Research*, **6**:59–75.
- Dazzo F.B., Hubbell D.H. 1975.** Croos-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association. *Applied Microbiology*, **30**:1017-1033.
- Dazzo F.B., Hrabak E.M. 1981.** Presence of trifolin A, a Rhizobium-binding lectin, in clover root exudates. *Journal of supramolecular structure and cellular biochemistry*, **16**:133-138.
- Dejoux J.F. 1999.** Evaluation d'itinéraires techniques du colza d'hiver en semis très précoces. Analyse agronomique, conséquences environnementales et économiques. Thèse de Doctorat, INA Paris Grignon, France, 244p.
- Dejoux J.F., Recous S., Meynard J.M., Trinsoutrot I., Leterme P. 2000.** The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralization, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant and Soil*, **218**:257-272.
- Desclos-Théveniau M., Coquet L., Jouenne T., Etienne P. 2014.** Proteomic analysis of residual proteins in blades and petioles of fallen leaves of *Brassica napus*. *Plant Biology*, **17**:408–418.
- 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. 1960.** On competition. *Verslagen Van Landbouwkundige Onderzoekingen*, **66**:1-82.
- De Wit, C.T., Van den Bergh, J.P., 1965.** Competition between herbage plants. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, **13**:212-221.
- D'Hooghe P., Dubousset L., Gallardo K., Kopriva S., Avice J.C., Trouverie J. 2014.** Evidence for proteomic and metabolic adaptations associated with alterations of seed yield and quality in sulfur-limited *Brassica napus* L. *Molecular and Cellular Proteomics*, **13**:1165-1183.
- Dubach M., Russelle M.P. 1994.** Forage legume roots and nodules and their role nitrogen transfer. *Agronomy Journal*, **86**:259-266.
- Dubousset L., Etienne P., Avice J.C. 2010.** Is the remobilization of S and N reserves for seed filling of winter oilseed rape modulated by sulphate restrictions occurring at different growth stages? *Journal of Experimental Botany*, **61**:4313–4324.
- Dreccer M.F., Schapendonk A.H.C.M., Slafer G.A., Rabbinge R. 2000.** Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply: absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stages determining yield. *Plant and Soil*, **220**:189-205.

- E -

Elgersma A., Schlepers H., Nassiri M. 2000. Interactions between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) under contrasting nitrogen availability: productivity, seasonal patterns of species composition, N₂ fixation, N transfer and N recovery. *Plant and Soil*, **221**:281-299.

- F -

- 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.
- Farnham D.E., George J.R. 1994.** Dinitrogen fixation and nitrogen transfer in Birdsfoot trefoil-Orchardgrass communities. *Agronomy Journal*, **86**:690-694.
- Fayaud B., 2012.** Déterminants de la croissance précoce et impact sur les interactions entre espèces dans les associations de cultures à base de légumineuses. Thèse de Doctorat L'UNAM Université d'Angers, France, 159 p.
- Forde B.G. 2000.** Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**:219-235.
- Francis C. 1981.** Development of plant genotypes for multiple cropping systems. *Plant Breed*, **2**:179-231.
- Francis G.S., Haynes R.J., Williams P.H. 1994.** Nitrogen mineralization, nitrate leaching and crop growth after ploughing-in leguminous and non-leguminous grain crop residues. *The Journal of Agricultural Science*, **123**:81-87.
- Francis R., Read D.J. 1984.** Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature*, **307**:53-56.
- Frankow-Lindberg B.E., Dahlin A.S. 2013.** N₂ fixation, N transfer, and yield in grassland communities including a deep-rooted legume or non-legume species. *Plant and Soil*, **370**:567-581.
- Frey B., Schüepp H. 1992.** Transfer of symbiotically fixed nitrogen from berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) to maize via vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae. *New Phytologist*, **122**:447-454.
- Fujita K., Ofosu-Budu K., Ogata S. 1992.** Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. *Plant and Soil*, **141**:155-175.
- Fukai S. and Trenbath B. 1993.** Processes determining intercrop productivity and yields of component crops. *Field Crops Research*, **34**:247-271.
- Fustec J., Lesuffleur F., Mahieu S., Cliquet J.B. 2010.** Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **30**:57-66.

- G -

- Galloway J.N., Aber J.D., Erisman J.W., Seitzinger S.P., Howarth R.W., Cowling E.B., Cosby B.J. 2003.** The nitrogen cascade. *Bioscience*, **53**:341-356.
- Galwey N., De Queiroz M., Willey R. 1986.** Genotypic variation in the response of sorghum to intercropping with cowpea, and in the effect on the associated legume. *Field Crops Research*, **14**:263-290.
- Garg N., Geetanjali N. 2007.** Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, **27**:59-68.

- Garnier E., Navas M.L., Austin M.P., Lilley J.M., Gifford R.M. 1997.** A problem for biodiversity-productivity studies: how to compare the productivity of multispecific plant mixtures to that of monocultures? *Acta Oecologica*, **18**:657-670.
- Giambalvo D., Ruisi P., Di Miceli G., Frenda A.S., Amato G. 2011.** Forage production, N uptake, N₂ fixation, and N recovery of berseem clover grown in pure stand and in mixture with annual ryegrass under different managements. *Plant and Soil*, **342**:379-391.
- 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.
- Gilbert M., Robson A. 1984a.** Studies on competition for sulfur between subterranean clover and annual ryegrass. I. Effect of nitrogen and sulfur supply. *Australian Journal of Agricultural Research*, **35**:75-83.
- Gilbert M.A., Robson A.D. 1984b.** Studies on competition for sulfur between subterranean clover and annual ryegrass. III. Effects of plant density and nitrogen supply. *Australian Journal of Agricultural Research*, **35**:75-83.
- Giller K.E., Beare M.H., Izac A.N. and Swift M.J. 1997.** Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, **6**:3-16.
- Giller K.E., Ormesher J., Awah F.M., 1991.** Nitrogen transfer from Phaseolus bean to intercropped maize measured using ¹⁵N-enrichment and ¹⁵N isotope-dilution methods. *Soil Biology and Biochemistry*, **23**:339-346.
- Giller K.E., Wilson K. J. 1991.** Nitrogen fixation in tropical cropping systems. *CAB International Wallingford* 313.
- Girondé A., Poret M., Etienne P., Trouverie J., Bouchereau A., Le Cahérec F., Leport L., Orsel M., Niogret M.F., Deleu C., Avice J.C. 2015.** A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. *Journal of Experimental Botany*, **66**:2461-73.
- Goergen E., Chambers J.C., Blank R. 2009.** Effects of water and nitrogen availability on nitrogen contribution by the legume, *Lupinus argenteus* Pursh. *Applied Soil Ecology*, **42**:200-208.
- Gombert J., Etienne P., Ourry A., Le Dily F. 2006.** The expression patterns of *SAG12/Cab* genes reveal the spatial and temporal progression of leaf senescence in *Brassica napus* L. with sensitivity to the environment. *Journal of Experimental Botany*, **57**:1949-1956.
- Good A.G., Johnson S.J., Pauw M.D., Carroll R.T., Savidov N., Vidmar J., Lu Z., Taylor G., Stroehrer V. 2007.** Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. *Canadian Journal of Botany*, **85**:252-262.
- Grant C.A., Mahli S.S., Karamanos R.E. 2012.** Sulfur management for rapeseed. *Field Crops Research*, **128**:119-128.
- 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.
- Griffon M. 1999.** Développement durable et agriculture : la révolution doublement verte. *Cahier Agriculture*, **8**:259-267.

Gylfadottir T., Hlgadottir A., Høgh-Jensen H. 2007. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. *Plant and Soil*, **297**:93-104.

- H -

Habekotté B. 1993. Quantitative analysis of pod formation, seed set and seed filling in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) under field conditions. *Field Crops Research*, **35**:21-33.

Habtegebrial Habtemichial K., Ram Singh B., Aune J.B. 2007. Wheat response to N₂ fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by sulfur fertilization and rhizobial inoculation in semi-arid Northern Ethiopia. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **170**:412-418.

Hamblin A., Tennant D. 1987. Root Length Density and Water Uptake in Cereals and Grain Legumes: How Well are they Correlated? *Australian Journal of Agricultural Research*, **38**:513-527.

Hamel C., Barrantes-Cartin U., Furlan V., Smith D.L. 1991a. Endomycorrhizal fungi in nitrogen transfer from soybean to maize. *Plant and Soil*, **138**:33-40.

Hamel C., Smith D.L. 1992. Mycorrhizae-mediated ¹⁵N transfer from soybean to corn in field-grown intercrops: effect of component crop spatial relationships. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**:499-501.

Hamel C., Smith D.L. 1991b. Plant development in a mycorrhizal field-grown mixture. *Soil Biology and Biochemistry*, **23**:661-665.

Hartwig N.L., Ammon H.U. 2002. Cover crops and living mulches. *Weed Science*, **50**:688-699.

Hauggaard-Nielsen H., Ambus P., Jensen E.S. 2001a. Interspecific competition. N use and interference with weeds in pea-barley intercropping. *Field Crop Research*, **70**:101-109.

Hauggaard-Nielsen H., Ambus P., Jensen E.S. 2001b. Temporal and spatial distribution of roots and competition for nitrogen in pea-barley intercrops—a field study employing ³²P technique, *Plant and Soil*, **236**:63–74.

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., Andersen M.K. 2000. Intercropping grain legumes and cereals in organic cropping systems. *Grain Legumes*, **30**:18-19.

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 N₂-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. 2001a. 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., Jensen E. 2005. Facilitative root interactions in intercrops. *Plant and Soil*, **274**:237-250.

- Haugaard-Nielsen H., Jørnsgaard B., Kinane J., Jensen E.S. 2008.** Grain legume–cereal intercropping: The practical application of diversity, competition and facilitation in arable and organic cropping systems. *Renewable Agriculture and Food Systems Journal*, **23**:3-12.
- Haystead A., Malaczuck N., Grove T.S. 1988.** Underground transfer of nitrogen between pasture plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **108**:417-423.
- Hebinger H. 2013.** Le colza. Paris: Editions France Agricole, « Agriproduction », 528p.
- Hertenberger G., Wanek W. 2004.** Evaluation of methods to measure differential ¹⁵N labeling of soil and root N pools for studies of root exudation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**:2415-2425.
- Hétier J.M., Andreux F., Schouller E., Marol C., 1986.** Organic matter inputs to soil growth of carbon-14-nitrogen-15 labelled maize. *Soil Biology and Biochemistry*, **4**:443-449.
- Hinsinger P., Betencourt E., Bernard L., Brauman A., Plassard C., Shen J., Tang X., Zhang F. 2011.** P for two, sharing a scarce resource–Soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant Physiology*, **156**:1078-1086.
- Hinsinger P., 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.
- Hocking P.J., Randall P.J., DeMarco D. 1997.** The response of dryland canola to nitrogen fertilizer: partitioning and mobilization of dry matter and nitrogen, and nitrogen effects on yield components. *Field Crops Research*, **54**:201-220.
- Hoffland E., Van den Boogaard R., Nelemans J., Findenegg G. 1992.** Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants, *New Phytologist*, **122**:675-680.
- Høgh-Jensen H. 2006.** The nitrogen transfer between plants: An important but difficult flux to quantify. *Plant and Soil*, **282**:1-5.
- Høgh-Jensen H., Schjoerring J.K., 2000.** Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by ¹⁵N leaf feeding compared with indirect dilution of soil ¹⁵N. *Plant and Soil*, **227**:171-183.
- Høgh-Jensen H., Schjoerring J.K. 1997.** Interactions between white clover and ryegrass under contrasting nitrogen availability: N₂ fixation, N fertilizer recovery, N transfer and water use efficiency. *Plant and Soil*, **197**:187-199.
- Høgh-Jensen H., Schjoerring J.K. 1994.** Measurement of biological dinitrogen fixation in grassland: comparison of the enriched ¹⁵N dilution and the natural ¹⁵N abundance methods at different nitrogen application rates and defoliation frequencies. *Plant and Soil*, **166**:153-163.
- Høgh-Jensen H., Schjoerring J.K. 2001.** Rhizodeposition of nitrogen by red clover, white clover and ryegrass leys. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**:439-448.
- Hopkins W.G., 2003.** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. Edition de boeck, 514 p.
- Horwith B. 1985.** A Role for Intercropping in Modern Agriculture. *Bioscience*, **35**:286-291.

Howieson J.G., Fillery I.R.P., Legocki A.B., Sikorski M.M., Stepkowski T., Minchin F.R., Dilworth M.J. 1998. Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. In: *Lupins as crop plants: biology, production and utilization*. S. Gladstones, C.A. Atkins and J. Hamblin (Edition) pp. 149-180. University Press. Cambridge.

- | -

Ikram A., Jensen E.S., Jakobsen I. 1994. No significant transfer of N and P from *Pueraria phaseoloides* to *Hevea brasiliensis* via hyphal links of arbuscular mycorrhiza. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**:1541-1547.

- J -

Jackson G.D. 2000. Effects of nitrogen and sulfur on canola yield and nutrient uptake. *Agronomy Journal*, **92**:644–649.

Jamont M., Crépellière S., Jaloux B. 2013b. Effect of extrafloral nectar provisioning on the performance of the adult parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Biological Control*, **65**:271-277.

Jamont M., Dubois-Pot C., Jaloux B., 2014. Nectar provisioning close to host patches increases parasitoid recruitment, retention and host parasitism. *Basic and Applied Ecology*, **15**:151-160.

Jamont M., Piva G., Fustec J., 2013a. Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? *Plant and Soil*, **371**:641-653.

Jannin L., Arkoun M., Etienne P., Laine P., Goux D., Garnica M., Fuentes M., Francisco S.S., Baigorri R., Cruz F., Houdusse F., Garcia-Mina J.-M., Yvin J.C., Ourry A. 2013. *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, **32**:31-52.

Jannin L., Arkoun M., Ourry A., Laine P., Goux D., Garnica M., Fuentes M., Francisco S.S., Baigorri R., Cruz F., Houdusse F., Garcia-Mina J.M., Yvin J.C., Etienne P. 2012. Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and Soil*, **359**:297-319.

Janzen H., Bettany J. 1984. Sulfur Nutrition of Rapeseed .1. Influence of Fertilizer Nitrogen and Sulfur Rates. *Soil Science Society of America Journal*, **48**:100-107.

Jayasundara H.P.S., Dennett M.D., Sangakkara U.R. 1997. Biological nitrogen fixation in *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala* and transfer of fixed nitrogen to an associated grass. *Tropical Grasslands*, **31**:529-537.

Jensen E.S. 1996a. Grain yield, symbiotic N₂ fixation and interspecific competition for inorganic N in pea barley intercrops. *Plant and Soil*, **182**:25-38.

Jensen E.S. 1996b. Barley uptake of N deposited in the rhizosphere of associated field pea. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**:159–168.

Jensen E.S. 1996c. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**:65-71.

Jensen E.S., Hauggaard-Nielsen H., 2003. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, **252**:177–186.

Johansen A., Jensen E.S. 1996. Transfer of N and P from intact or decomposing roots of pea to barley inter connected by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Soil Biology and Biochemistry*, **28**:73-81.

Jones D.L., Darrah P.R. 1994. Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **163**:1-12.

Jones D.L., Healey J.R., Willett V.B., Farrar J.F., Hodge A. 2005. Dissolved organic nitrogen uptake by plants an important N uptake pathway? *Soil Biology and Biochemistry*, **37**:413-423.

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.

Jørgensen F.V., Jensen E.S., Schjoerring J.K. 1999. Dinitrogen fixation in white clover grown in pure stand and mixture with ryegrass estimated by the immobilized ¹⁵N isotope dilution method. *Plant and Soil*, **208**:293-305.

Joshi N.L., Mali P.C., Saxena A. 1998. Effect of nitrogen and sulphur application on yield and fatty acid composition of mustard (*Brassica juncea* L.) Oil. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **180**:59-63.

Junk G., Svec H.J. 1958. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **14**:234-243.

- K -

Karmoker J.L., Clarkson D.T., Saker L.R., Rooney J.M., Purves J.V. 1991. Sulphate deprivation depresses the transport of nitrogen to the xylem and the hydraulic conductivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Planta*, **185**:269-278.

Keating B.A., Carberry P.S. 1993. Resource capture and use in intercropping – Solar radiation *Field Crops Research*, **34**:273-301.

Keddy P.A. 2001. Studying competition. Second Edition. *Kluwer Academic Publishers*, 59p.

Khan D.F., Peoples M.B., Chalk P.M., Herridge D.F. 2002b. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of ¹⁵N and non isotopic methods. *Plant and Soil*, **239**:277-289.

Khan D.F., Peoples M.B., Herridge D.F. 2002a. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. *Plant and Soil*, **245**:327-334.

Khan D.F., Peoples M.B., Schwenke G.D., Felton W.L., Chen D., Herridge D. 2003. Effects of below ground nitrogen on N balances of field-grown faba bean, chickpea, and barley. *Australian Journal of Agricultural Research*, **54**:333-340.

Kurppa M., Leblanc H.A., Nygren P. 2010. Detection of nitrogen transfer from N₂-fixing shade trees to cacao seedlings in ¹⁵N labelled soil: ecological and experimental considerations. *Agroforestry Systems*, **80**:223-239.

- Ladha J.K., Peoples M.B., Garrity D.P., Capuno V.T., Dart P.J. 1993.** Estimating dinitrogen fixation of hedgerow vegetation using the nitrogen-15 natural abundance method. *Soil Science Society of America Journal*, **57**:732-737.
- Laguerre G., Allard M.R., Revoy F., Amarger N. 1994.** Rapid Identification of Rhizobia by Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**:56-63.
- Laguerre G., Mazurier S.I., Amarger N. 1992.** Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiology Letters*, **101**:17-26.
- Laîné P. 1995.** Modalités et régulations de l'absorption du nitrate chez *Brassica napus* L. et *Lolium multiflorum* Lam. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen Normandie, France, 91p.
- Laîné P., Bigot J., Ourry A., Boucaud J. 1994.** Effects of low temperature on nitrate uptake, and xylem and phloem flows of nitrogen: in *Secale cereale* L. and *Brassica napus* L. *New Phytologist*, **127**:675-683.
- Laîné P., Ourry A., Macduff J., Boucaud J., Salette J. 1993.** Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. *Physiologia Plantarum*, **88**:85-92.
- Landé N., Sauzet G., Leterme P. 2013.** Is oilseed rape mixed cropping an efficient solution to reduce nitrogen fertilization, weed development, and damage caused by insects? GCIRC Technical Meeting, April 28th to May 1st 2013, Agroscope Changins ACW, Nyon.
- Lange A. 1998.** Influence of S supply on the biological nitrogen fixation of legumes. Ph.D. Thesis, University of Bonn, Germany.
- Larue T.A., Patterson T.G. 1981.** How much nitrogen do legumes fix? in: Brady, N.C. (ed.): *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 15-38.
- Ledgard S.F. 1991.** Transfer of fixed nitrogen from white clover to associated grasses in swards grazed by dairy cows, estimated using N dilution methods. *Plant and Soil*, **131**:215-223.
- Ledgard S.F., Freney J.R., Simpson J.R., 1985.** Assessing nitrogen transfer from legumes to associated grasses. *Soil Biology and Biochemistry*, **17**:575-577.
- Ledgard S.F., Steele K.W. 1992.** Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. *Plant and Soil*, **141**:137-153.
- Lesuffleur F., Paynel F., Bataille M.P., Le Deunff E., Cliquet J.B. 2007.** Root amino acid exudation: Measurement of high efflux rates of glycine and serine from six different plant species. *Plant and Soil*, **294**:235-246.
- Lesuffleur F., Salon C., Jeudy C., Cliquet J.B. 2013.** Use of a ¹⁵N₂ labelling technique to estimate exudation by white clover and transfer to companion ryegrass of symbiotically fixed N. *Plant and Soil*, **369**:187-197.

- Li C., He X., Zhu S., Zhou H., Wang Y., Li Y., Yang J., Fan J., Yang J., Wang G., Long Y., Xu J., Tang Y., Zhao G., Yang J., Liu L., Sun Y., Xie Y., Wang H. and Zhu Y. 2009. Crop diversity for yield increase. *PLoS One*, 4(11):e8049.
- 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 Academy Science of the USA*, 104:11192-11196.
- Liebman M., Dick E. 1993. Crop rotation and intercropping strategies for weed management. *Ecological Applications*, 3:92-122.
- Lithourgidis A.S., Dordas C.A., Damalas C.A., Vlachostergios D.N. 2011. Annual intercrops: An alternative pathway for sustainable agriculture. *Australian Journal Crop Science*, 5:396-410.
- Liu Y., Wu L., Baddeley J.A., Watson C., 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy of Sustainable Development*, 31:155-172.
- Loreau M., Hector A. 2001. Partitioning selection and complementarity in biodiversity experiments. *Nature*, 412:72-76.
- Lorin M., Jeuffroy M.H., Butier A., Valantin-Morison M. 2015. Undersowing winter oilseed rape with frost-sensitive living mulches in order to improve weed control. *European Journal of Agronomy*, 71:96-105.
- Lory J.A., Russelle M.P., Heichel G.H. 1992. Quantification of symbiotically fixed nitrogen in soil surrounding alfalfa roots and nodules. *Agronomy Journal*, 84:1033-1040.
- Louarn G., Corre-Hellou G., Fustec J., L -Pelzer E., Julier B., Litrico I., Hinsinger P., Lecomte C. 2010. D terminants écologiques et physiologiques de la productivité et de la stabilit  des associations graminées-légumineuses. *Innovations Agronomiques*, 11:79-99.
- Louarn G., Pereira-Lop s E., Fustec J., Mary B., Voisin A.S., de Faccio Carvalho P.C., Gastal F. 2015. The amounts and dynamics of nitrogen transfer to grasses differ in alfalfa and white cloverbased grass-legume mixtures as a result of rooting strategies and rhizodeposit quality. *Plant and Soil*, 389:289-305.
- Louvrier P., Laguerre G., Amarger N., 1995. Semiselective medium for isolation of *Rhizobium leguminosarum* from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27:919-924.
- Luci ski R., Polcyn W., Ratajczak L. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association rhizobium-legumes. *Acta Biochimica Polonica*, 49:537-546.
- Lynch J.M., Whipps T.M. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129:1-10.

- M -

- Macduff J.H., Jackson S.B. 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in italian ryegrass and white clover roots: Comparisons between effects of darkness and defoliation. *Journal of Experimental Botany*, 43:525-535.
- Macduff J.H., Jarvis S.C., Davidson I.A. 1996. Inhibition of N₂ fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) at low concentrations of NO₃⁻ in flowing solution culture. *Plant and Soil*, 180:287-295.

- Mahieu S., Fustec J., Faure M.L., Hellou G., Crozat Y., 2007.** Comparison of two ^{15}N labelling methods for assessing nitrogen rhizodeposition of pea. *Plant and Soil*, **295**:193-205.
- Maidl F.X., Haunz F.X., Panse A., Fischbeck G. 1996.** Transfer of grain legume nitrogen within a crop rotation containing winter wheat and winter barley. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **176**:47-57.
- Malagoli P., Lainé P., Le Deunff E., Rossato L., Ney B., Ourry A. 2004.** Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitot during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology*, **134**:388-400.
- Malagoli P., Laine P., Rossato L., Ourry A. 2005b.** Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. *Annals of Botany*, **95**:853-861.
- Malagoli P., Laine P., Rossato L., Ourry A. 2005a.** Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest. II. An ^{15}N -labelling-based simulation model of N partitioning between vegetative and reproductive tissues. *Annals of Botany*, **95**: 1187-1198.
- Malézieux E., Crozat Y., Laurans M., 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.
- Malhi S.S., Gan Y., Raney J.P. 2007.** Yield, seed quality, and sulfur uptake of Brassica oilseed crops in response to sulfur fertilization. *Agronomy Journal*, **99**:570-577.
- Maillard A. 2016.** Adaptations des végétaux à un environnement minéral fluctuant : mécanismes impliqués et interactions entre nutriments. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen Normandie, France, 165p.
- Mariotti A. 1983.** Atmospheric nitrogen is a reliable standard for ^{15}N natural abundance measurements. *Nature*, **303**:685-687.
- Mariotti A. 1984.** Natural ^{15}N abundance measurements and atmospheric nitrogen standard calibration. *Nature*, **311**:251-252.
- Mariotti A., Mariotti F., Amarger N., Pizelle G., Ngambi J.M., Champigny M.L., Moyse A. 1980.** Fractionnements isotopiques de l'azote lors des processus d'absorption des nitrates et de la fixation de l'azote atmosphérique par les plantes. *Physiologie Végétale*, **18**:163-181.
- Mariotti M., Masoni A., Ercoli L., Arduini L. 2015.** Nitrogen leaching and residual effect of barley/field bean intercropping. *Plant, Soil and Environment*, **61**:60-65.
- Marriot C., Haystead A. 1993.** Nitrogen fixation and transfer. In: A. Davies, R. D. Baker, S. A. Grant and A. Laidlaw (Edition). *Sward Measurement Handbook*. Reading, The British Grassland Society. pp 245- 264.
- Martensson A.M., Rydberg I., Vestberg M. 1998.** Potential to improve transfer of N in intercropped systems by optimizing host-endophyte combinations. *Plant and Soil*, **205**:57-66.

- Maskey S.L., Bhattarai S., Peoples M.B., Herridge D.F. 2001.** On-farm measurements of nitrogen fixation by winter and summer legumes in the Hill and Terai regions of Nepal. *Field Crops Research*, **70**:209-221.
- Mazurier S. 1989.** Diversité de populations naturelles nodulantes de *Rhizobium leguminosarum*. Thèse de Doctorat, Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon, France, 182p.
- Mayer J., Buegger F., Jensen E.S., Schloter M., Heß J. 2003.** Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a ^{15}N *in situ* stem labelling method. *Soil Biology and Biochemistry*, **35**:21-28.
- McGrath S.P., Zhao F.J. 1996.** Sulphur uptake, yield responses and the interactions between nitrogen and sulphur in winter oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science*, **126**:53-62.
- McNeill A.M., Fillery I.R.P. 2008.** Field measurement of lupin below-ground nitrogen accumulation and recovery in the subsequent cereal-soil system in a semi-arid Mediterranean-type climate. *Plant and Soil*, **302**:297-316.
- McNeill A.M., Hood R.C., Wood M. 1994.** Direct measurement of nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. and *Alnus glutinosa* L. using $^{15}\text{N}_2$. *Journal of Experimental Botany*, **45**:749-755.
- McNeill A.M., Wood M. 1990a.** ^{15}N estimates of nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens* L.) growing in a mixture with ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant and Soil*, **128**:265-273.
- McNeill A.M., Wood M. 1990b.** Fixation and transfer of nitrogen by white clover to ryegrass. *Soil Use and Management*, **6**:84-86.
- McNeill A.M., Zhu C., Fillery I.R.P. 1998.** A new approach to quantifying the N benefit from pasture legumes to succeeding wheat. *Crop and Pasture Science*, **49**:427-436.
- McNeill A.M., Zhu C., Fillery I.R.P. 1997.** Use of 'in situ' ^{15}N labelling to estimate the total below-ground N of pasture legumes in intact soil-plant systems. *Crop and Pasture Science*, **48**:295-304.
- Merrien A., Palleau J., Maisonneuve C. 1988.** Besoins en éléments minéraux du colza cultivé en France. In: *Physiologie et élaboration du rendement du colza*. Edition CETIOM-INRA, Paris. pp 34-46.
- Merrien A., Pouzet A. 1988.** Principaux facteurs limitant les rendements de colza d'hiver dans les conditions françaises *Physiologie et élaboration du rendement du colza d'hiver*. Paris: CETIOM-INRA, 16-22.
- Midmore D.J. 1993.** Agronomic modification of resource use and intercrop productivity. *Field Crops Research*, **34**:357-380.
- Mohler C.L., Liebman M. 1987.** Weed productivity and composition in sole crops and intercrops of barley and field pea. *Journal of Applied Ecology*, **24**:685-699.
- Monje O., Bugbee B. 1992.** Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *Horticultural Science*, **27**:69-71.
- Moyer-Henry K.A., Burton J.W., Israel D.W., Rufty T.W. 2006.** Nitrogen transfer between plants: a ^{15}N natural abundance study with crop and weed species. *Plant and Soil*, **282**:7-20.

- N -

- 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 N₂ fixation. *Field Crops Research*, **119**:2-11.
- Newman E.I., Eason W.R. 1989.** Cycling of nutrients from dying roots to living plants, including the role of mycorrhizas. *Plant and Soil*, **115**:211-215.
- Nguyen C. 2003.** Rhizodeposition of organic C by plant: mechanisms and controls. *Agronomie*, **23**:375-396.
- Nygren P., Leblanc H.A. 2009.** Natural abundance of ¹⁵N in two cacao plantations with legume and non-legume shade trees. *Agroforestry Systems*, **76**:303-315.
- Nygren P., Leblanc H.A. 2015.** Dinitrogen fixation by legume shade trees and direct transfer of fixed N to associated cacao in a tropical agroforestry system. *Tree Physiology*, **35**:134-137.
- Nyfelner D., Huguenin-Elie O., Suter M., Frossard E., Lüscher A. 2011.** Grass-legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **140**:155-163.

- O -

- Oberson A., Frossard E., Bühlmann C., Mayer J., Mäder P., Lüscher A. 2013.** Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant and Soil*, **371**:237-255.
- Oenema O., Postma R. 2003.** Managing sulphur in agroecosystems. Abrol YP, Ahmad A. Edition. *Sulphur in Plants*. Kluwer Academic Publishers, 45-70.
- Ofori F., Stern W.R. 1987.** Cereal-legume intercropping systems. *Advances in Agronomy*, **41**:41-90.
- Ofosu-Budu K.G., Fujita K., Ogata S. 1990.** Excretion of ureide and other nitrogenous compounds by the root system of soybean at different growth stages. *Plant and Soil*, **128**:135-142.
- Oldroyd G.E., Long S.R. 2003.** Identification and characterization of Nodulation-Signaling Pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod factor signaling. *Plant Physiology*, **131**:1027-1032.
- Ovalle C., del Pozo A., Peoples M.B., Lavin A. 2010.** Estimating the contribution of nitrogen from legume cover crops to the nitrogen nutrition of grapevines using a ¹⁵N dilution technique. *Plant and Soil*, **334**:247-259.
- Ovalle C., Gonzalez M.I., Hirzel J., Pino I., del Pozo A., Urquiaga S. 2008.** Contribution and transfer of nitrogen from cover crops to raspberry plant using isotopic techniques with ¹⁵N. *ISHS Acta Horticulturae*, **777**:465-471.

- P -

- Pacyna S. 2005.** Bedeutung des Schwefels für den Ferredoxin- und Leghämoglobin-Gehalt sowie die Energieversorgung in N₂-fixierenden Leguminosen. Ph.D. Thesis, University of Bonn, Germany.

- Pacyna S., Schulz M., Scherer H.W. 2006.** Influence of sulphur supply on glucose and ATP concentrations of inoculated broad beans (*Vicia faba minor* L.). *Biology and Fertility of Soils*, **42**:324-329.
- Parmar S., Buchner P., Hawkesford M.J. 2007.** Leaf developmental stage affects sulfate depletion and specific sulfate transporter expression during sulfur deprivation in *Brassica napus* L. *Plant Biology*, **9**:647-653.
- Paynel F., Cliquet J.B. 2003.** N transfer from white clover to perennial ryegrass, *via* exudation of nitrogenous compounds. *Agronomie* **23**:503-510.
- Paynel F., Murray P., Cliquet J. 2001.** Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. *Plant and Soil*, **229**:235-243.
- Pedersen C.A., Knudsen L., Schnug E. 1998.** Sulphur fertilisation. In: Schnug E, ed. *Sulphur in agrosystems*, First Edition. Dordrecht: Springer Science+Business Media, pp. 115-134.
- Pelzer E., Bazot M., Makowski D., Corre-Hellou G., Naudin C., Al Rifaï M., Baranger E., Bedoussac L., Biarnès V., Boucheny P., Carrouée B., Dorvillez D., Foissy D., Gaillard B., Guichard L., Mansard M.C., Omon B., Prieur L., Yvergniaux M., Justes E., Jeuffroy M.H. 2012.** Pea-wheat intercrops in low-input conditions combine high economic performances and low environmental impacts. *European Journal of Agronomy*, **40**:39-53.
- Peoples M.B. and Baldock J.A. 2001.** Nitrogen dynamics of pastures: nitrogen fixation inputs, the impact of legumes on soil nitrogen fertility, and the contributions of fixed nitrogen to Australian farming systems. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **41**:327-346.
- Peoples M.B., Brockwell J., Herridge D.F., Rochester I.J., 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.
- Peoples M.B., Chalk P.M., Unkovich M.J., Boddey R.M. 2015.** Can differences in ¹⁵N natural abundance be used to quantify the transfer of nitrogen from legumes to neighbouring non-legume plant species? *Soil Biology and Biochemistry*, **87**:97-109.
- Phillips D.A., Fox T.C., King M.D., Bhuvanewari T.V., Teuber L.R. 2004.** Microbial Products Trigger Amino Acid Exudation from Plant Roots. *Plant Physiology*, **136**:887-2894.
- Pirhofer-Walzl K., Rasmussen J., Høgh-Jensen H., Eriksen J., Sørensen K. 2012.** Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighbouring plants in a multi-species grassland. *Plant and Soil*, **350**:71-84.
- Poret M., Chandrasekard B., van der Hoorn R.A.L., Avice J.C. 2016.** Characterization of senescence-associated protease activities involved in the efficient protein remobilization during leaf senescence of winter oilseed rape. *Plant Science* **246**:139-153.
- Praveenkumar B.U. 1996.** Visual evidence of nitrate reductase exudation from plant roots. *Curr. Sci.* **71**:585-586.
- Purnamawati H., Schmidtke K. 2003.** Nitrogen transfer of two cultivar faba bean (*Vicia faba* L.) to oat (*Avena sativa* L.). *Indonesian Journal of Agronomy*, **31**:31-36.

- R -

- Rämert B. and Ekbohm B. 1996.** Intercropping as a management strategy against carrot rust fly (Diptera: Psilidae): a test of enemies and resource concentration hypothesis. *Environmental Entomology*, **25**:1092-1100.
- Rasmussen J., Eriksen J., Jensen E.S., Esbensen K.H., Høgh-Jensen H. 2007.** In situ carbon and nitrogen dynamics in ryegrass–clover mixtures: Transfers, deposition and leaching. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**:804-815.
- Rasmussen J., Soegaard K., Pirhofer-Walzl K., Eriksen J. 2012.** N₂-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. *European Journal of Agronomy*, **36**:66-74.
- Rathke G.W., Behrens T., Diepenbrock W. 2006.** Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): A review. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **117**:80-108.
- Rathke G.W., Christen O., Diepenbrock W. 2005.** Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown in different crop rotations. *Field Crops Research*, **94**:103-113.
- Rerkasem B., Rekasem K., Peoples M.B., Herridge D.F., Bergersen F.J. 1988.** Measurement of N₂ fixation in maize (*Zea mays* L.)-ricebean (*Vigna umbellata* [Thunb.] Ohwi and Ohashi) intercrops. *Plant and Soil*, **108**:125-135.
- Rochester I.J., Peoples M.B., Constable G.A., Gault R.R. 1998.** Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **38**: 253-260.
- Rossato L., Laîné P., Ourry A. 2001.** Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany*, **52**:1655-1663.
- Ross P.J., Martin A.E., Henzell E.F. 1964.** A gas-tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil : plant : atmosphere system. *Nature*, **204**:444-447.
- Rovira A.D., Foster R.C., Martin J.K. 1979.** Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. In Harley J L, Russell RS (Edition), *The Soil Root Interface*, Academic Press, London, 1979, pp 1-4.
- Ruschel A.P., Salati E., Vose P.B. 1979.** Nitrogen enrichment of soil and plant by *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Plant and Soil*, **51**:425-429.
- Russell C.A., Fillery I.R.P. 1996.** *In situ* ¹⁵N labelling of lupin below ground biomass. *Australian Journal of Agricultural Research*, **47**:1035-1046.
- Russelle M.P., Allan D.L., Gourley C.J.P. 1994.** Direct assessment of symbiotically fixed nitrogen in the rhizosphere of alfalfa. *Plant and Soil*, **159**:233-243.

- S -

- Sakai R.H., Ambrosano E.J., Negrini A.C.A., Trevelin P.C.O., Schammas E.A., de Mello P.C.T. 2011.** N transfer from green manures to lettuce in an intercropping cultivation system. *Acta Scientiarum Agronomy*, **33**:679-686.
- Sarda X., Diquelou S., Abdallah M., Nesi N., Cantat O., Le Gouee P., Avice J.C., Ourry A. 2014.** Assessment of sulphur deficiency in commercial oilseed rape crops from plant analysis. *Journal of Agricultural Science*, **152**:616-633.
- Sawatsky N., Soper R.J. 1991.** A quantitative measurement of the nitrogen loss from the root system of field peas (*Pisum avense* L.) grown in the soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **23**:255-259.
- Scherer H.W. 2001.** Sulphur in crop production. *European Journal of Agronomy*, **14**:81-111.
- Scherer H.W., Lange A. 1996.** N₂ fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biology and Fertility of Soils*, **23**:449-453.
- Scherer H.W., Pacyna S., Manthey N., Schulz M. 2006.** Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influences symbiotic N₂ fixation. *Plant Soil Environment*, **52**:72-77.
- Scherer H.W., Pacyna S., Spoth K.R., Schulz M. 2008.** Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biology and Fertility of Soils*, **44**:909-916.
- Schipanski M.E., Drinkwater L.E. 2012.** Nitrogen fixation in annual and perennial legume-grass mixtures across a fertility gradient. *Plant and Soil*, **357**:147-159.
- Schjoerring J.K., Bock J.G.H., Gammelvind L., Jensen C.R., Mogensen V.O. 1995.** Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. *Plant and Soil*, **177**:255-264.
- Schmidtke K. 2005a.** A model to predict the accuracy of measurements of legume N rhizodeposition using a split-root technique. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**:829-836.
- Schmidtke K. 2005b.** How to calculate nitrogen rhizodeposition: a case study in estimating N rhizodeposition in the pea (*Pisum sativum* L.) and grasspea (*Lathyrus sativus* L.) using a continuous 15N labelling split-root technique. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**:1893-1897.
- Schnug E. 1991.** Sulphur nutritional status of European crops and consequences for agriculture. *Sulphur in Agriculture*, **15**:7-12.
- Scholberg J.M.S., Dogliotti S., Leoni C., Cherr C.M., Zotarelli L., Rossing W.A.H. 2010.** Cover crops for sustainable agrosystems in the Americas. In: Lichtfouse, E. (Ed.), *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming*. Springer Netherlands, pp. 23-58.
- Schröder D., Köpke U. 2012.** Faba bean (*Vicia faba* L.) intercropped with oil crops – a strategy to enhance rooting density and to optimize nitrogen use and grain production? *Field Crops Research*, **135**:74-81.
- Seigler D.S. 1996.** Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal*, **88**:876-885.

- Serrano A., Chamber M. 1990.** Nitrate reduction in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) strains and its effects on their symbiosis with *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology*, **136**:240-246.
- Shearer G. and Kohl D.H. 1986.** N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian Journal of Plant Physiology*, **13**:699-756.
- Sierra J., Daudin D. 2010.** Limited ¹⁵N transfer from stem-labeled leguminous trees to associated grass in an agroforestry system. *European Journal of Agronomy*, **32**:240-242.
- Sierra J., Daudin D., Domenach A.M., Nygren P., Desfontaines L. 2007.** Nitrogen transfer from a legume tree to the associated grass estimated by the isotopic signature of tree root exudates: a comparison of the ¹⁵N leaf feeding and natural ¹⁵N abundance methods. *European Journal of Agronomy*, **27**:178-186.
- Sierra J., Nygren P. 2006.** Transfer of N fixed by a legume tree to the associated grass in a tropical silvopastoral system. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**:1893-1903.
- Silva C.F., Paredes D.S., Guimarães A.P., Araújo E.S., Urquiaga S., Alves B.J.R., Boddey R.M. 2010.** Comparação entre duas técnicas de marcação com ¹⁵N para avaliação do N residual subterrâneo da soja. In: Poster Presented at the Congress FERTBIO, Guarapari, Espírito Santo, Brazil, 13-17, September 2010.
- Sinclair A.G., Smith L.C., Morrison J.D., Dodds K.G. 1996.** Effects and interactions of phosphorus and sulphur on a mown white clover/ryegrass sward: 1. Herbage dry matter production and balanced nutrition. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **39**:421-433.
- Singh P., Raj B. 1988.** Sulphur fertilization in relation to yield and trend of production of leghemoglobin in the nodules of pea (*Pisum sativum* var. Arvense) *Annals of Agricultural Research*, **9**:13-19.
- Snoeck D., Zapata F., Domenach A.M. 2000.** Isotopic evidence of the transfer of nitrogen fixed by legumes to coffee trees. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **4**:95-100.
- Sorin E. 2016.** Identification d'indicateurs de la nutrition soufrée chez le colza (*Brassica napus* L.) : mécanismes physiologiques sous-jacents et validation en conditions de plein champ. Thèse de Doctorat de l'Université de Caen Normandie, France.
- Sorin E., Etienne P., Maillard A., Zamarreno A.M., Garcia-Mina J.M., Arkoun M., Jamois F., Cruz F., Yvin J.C., Ourry A. 2015.** Effect of sulphur deprivation on osmotic potential components and nitrogen metabolism in oilseed rape leaves: identification of a new early indicator. *Journal of Experimental Botany*, 1-15.
- Soussana J., Minchin F.R., Macduff J.H., Raistrick N., Abberton M.T., Michaelson-Yeates T.P.T. 2002.** A simple model of feedback regulation for nitrate uptake and N₂ fixation in contrasting phenotypes of white clover. *Annals of Botany*, **90**:139-147.
- Sprent J.I. and Parsons R. 2000.** Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research*, **65**:183-196.
- Steele K.W., Bonish P.M., Daniel R.M., Ohara G.W. 1983.** Effect of rhizobial and host plant on nitrogen isotopic fractionation in legumes. *Plant Physiology*, **72**:1001-1004.
- Stern W.R. 1993.** Nitrogen fixation and transfer in intercrop systems. *Field Crops Research*, **34**:335-356.

Studer R., Merrien A., Devineau J. 1987. Données nouvelles sur l'absorption du soufre Par le colza d'hiver en campagne berrichonne : Rapport INRA de Châteauroux 8P.

Sun Z., Ouyang Z., Li F., Wu L. 2012. Impact of cutting a clover crop on the nitrogen supplied to winter wheat in an intercropping system. *Journal of Resource Ecology*, **3**:73-79.

Svenningsson H., Sundin P., Liljenberg C. 1990. Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. *Plant, Cell and Environment*, **13**:155-162.

Szumigalski A.R., Van Acker R.C. 2006. Nitrogen yield and land use efficiency in annual sole crops and intercrops. *Agronomy Journal*, **98**:1030-1040.

- T -

Ta T.C., Faris M. 1987. Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant and Soil*, **98**:265-274.

Ta T.C., Faris M.A., Macdowall F.D.H. 1989. Evaluation of ¹⁵N methods to measure nitrogen transfer from alfalfa to companion timothy. *Plant and Soil*, **114**:243-247.

Ta T.C., Macdowall F.D.H., Faris M.A. 1986. Excretion of nitrogen assimilated from N₂ fixed by nodulated roots of alfalfa (*Medicago sativa*). *Canadian Journal of Botany*, **64**:2063-2067.

Tallec T., Diquélou S., Avice J.C., Lesuffleur F., Lemauviel-Lavenant S., Cliquet J.B., Ourry A. 2009. Availability of N and S affect nutrient acquisition efficiencies differently by *Trifolium repens* and *Lolium perenne* when grown in monoculture or in mixture. *Environmental and Experimental Botany*, **66**:309-316.

Tallec T., Diquélou S., Lemauviel S., Cliquet J.B., Lesuffleur F., Ourry A. 2008. Nitrogen:sulphur ratio alters competition between *Trifolium repens* and *Lolium perenne* under cutting: Production and competitive abilities. *European Journal of Agronomy*, **29**:94-101.

Thilakarathna R.M.M.S., Papadopoulos Y.A., Rodd A.V., Gunawardena A.N., Fillmore S.A.E., Prithivira B. 2012. Characterizing nitrogen transfer from red clover populations to companion bluegrass under field conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, **92**:1163-1173.

Thomas R.J. 1992. The role of the legume in the nitrogen cycle of productive and sustainable pastures. *Grass and Forage Science*, **47**:133-142.

Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R., Polasky S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, **418**:671-677.

Tilsner J., Kassner N., Struck C., Lohaus G. 2005. Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta*, **221**:328-338.

Tofinga M.P, Paolini R., Snaydon R.W. 1993. A study of root and shoot interactions between cereals and peas in mixtures. *Journal of Agricultural Science*, **120**:13-24.

Tomm G.O., Vankessel C., Slinkard A.E. 1994. Bi-directional transfer of nitrogen between alfalfa and bromegrass - short and long-term evidence. *Plant and Soil*, **164**:77-86.

Tomm G.O., Walley F.L., Vankessel C. and Slinkard A.E. 1995. Nitrogen cycling in an alfalfa and bromegrass sward via litterfall and harvest losses. *Agronomy Journal*, **87**:1078-1085.

Trannin W.S., Urquiaga S., Guerra G., Ibijbijen J., Cadisch G. 2000. Interspecies competition and N transfer in a tropical grass-legume mixture. *Biology and Fertility of Soils*, **32**:441-448.

Trenbath B.R. 1993. Intercropping for the management of pests and diseases. *Field Crops Research*, **34**:381-405.

Trenbath B.R. 1976. Plant interactions in mixed crop communities. In: Papendick RI, Sanchez PA, Triplett GB (Edition) Multiple cropping. ASA special publication no. 27. American Society of Agronomy, Madison, Wis., pp. 129-170.

Tsubo M., Walker S., Mukhala E., 2001. Comparisons of radiation use efficiency of mono-/intercropping systems with different row orientations. *Field Crops Res.* **71**, 17-29.

- U -

U N. 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Journal of Japanese Botany*, **7**:389-452.

Unkovich M.J. and Pate J. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, **65**:211-228.

Unkovich M.J., Sanford P., Pate J.S., Hyder M., 1998. Effects of grazing on plant and soil nitrogen relations of pasture-crop rotations. *Crop and Pasture Science*, **49**:475-485.

- V -

Valantin-Morison M., David C., Cadoux S., Lorin M., Celette F., Amosse C., Basset A., 2014. Association d'une culture de rente et espèces compagnes permettant la fourniture de services écosystémiques. *Innovations Agronomiques*, **40**:93-112.

Vallis I., Haydock K.P., Ross P.J., Henzell E.F. 1967. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. III. The uptake of small additions of ¹⁵N-labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville Lucerne. *Crop and Pasture Science*, **18**:865-877.

Vandermeer, J.H. 1989. The ecology of intercropping. Cambridge University Press, Cambridge.

Van Kessel C., Singleton P.W., Hoben H.J. 1985. Enhanced N-transfer from soybean to maize by vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. *Plant Physiology*, **79**:562-563.

Varin S., Cliquet J.B., Personeni E., Avice J.C., and Lemauiel-Lavenant S. 2010. How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)? *Journal of Experimental Botany* **61**:225-234.

Varin S., Lemauiel-Lavenant S., Cliquet J.B., Diquélou S., Michaelson-Yeates T.P.T. 2009. Functional plasticity of *Trifolium repens* L. in response to sulphur and nitrogen availability. *Plant and Soil*, **317**:189-200.

Viera-Vargas M.S., Souto C.M., Urquiaga S., Boddey R.M. 1995. Quantification of the contribution of N₂ fixation to tropical forage legumes and transfer to associated grass. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**:1193-1200.

Vincent J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 164p.

Voisin A.S., Salon C., Jeudy C., Warembourg F., 2003. Symbiotic N₂ fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology. *Journal of Experimental Botany*, **54**:2733-2744.

Voisin A.S., Salon C., Munier-Jolain N.G., Ney B. 2002. Quantitative effect of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant and Soil*, **243**:31-42.

Voisin A.S., Warembourg F.R., Jeudy C., Salon C. 2000. Construction d'une chambre phytotronique de marquage isotopique double C/N, pour l'étude du fonctionnement des légumineuses: description du dispositif. *Cahiers Techniques de l'INRA*, **45**:3-13.

- W -

Walker T.W., Adams A.F.R., Orchiston H.D. 1956. The effect of levels of calcium sulphate on the yield and composition of a grass and clover pasture. *Plant and Soil*, **7**:290-300.

Waterer J.G., Vessey J.K., Stobbe E.H., Soper R.J. 1994. Yield and symbiotic nitrogen fixation in a pea-mustard intercrop as influenced by N fertilizer addition. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**:447-453.

Walker T.S., Bais H.P., Grotewold E., Vivanco J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, **132**:44-51.

Wenyng Z., Kaikua W. 2012. Analysis of the relationship between SPAD reading and chlorophyll content in *Brassica napus* L. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, **28**:92-95.

Whipps J.M., Lynch J.M. 1985. Energy losses by the plant in rhizodeposition. *Annual proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, **26**:59-71.

Wichern F., Eberhardt E., Mayer J., Joergensen R.G., Müller T. 2008. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**:30-48.

Wichern F., Mayer J., Joergensen R.G., Müller T. 2007. Rhizodeposition of C and N in peas and oats after ¹³C-¹⁵N double labelling under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**:2527-2537.

Wiesler F., Behrens T., Horst W.J. 2001. The role of nitrogen-efficient cultivars in sustainable agriculture. In: Optimizing nitrogen management in food and energy production and environmental protection: *Proceedings of the 2nd International Nitrogen Conference on Science and Policy*, The Scientific World (1).

Willey R.W. 1979a. Intercropping: Its Importance and research needs. 1. Competition and yield advantages. *Field Crops Abstracts*, **32**:2-10.

Willey R. 1979b. Intercropping: Its importance and research needs. 2. Agronomy and research approaches. *Field Crops Abstracts*, **32**:73-81.

Willey R.W. 1990. Resource use in intercropping systems. *Agricultural Water Management*, **17**:215-231.

- X -

Xiao Y., Li L., Zhang F. 2004. Effect of root contact on interspecific competition and N transfer between wheat and faba bean using direct and indirect ¹⁵N techniques. *Plant and Soil*, **262**:45-54.

- Y -

Yahuza I. 2012. Effect of seed rate on the seed yields in wheat/faba bean intercropping system: estimates of intercrop performance using three different indices. *International Journal of Biosciences*, **2**:129-150.

Yoneyama T., Yamada N., Kojima H. and Yazaki J. 1984. Variation of natural ¹⁵N abundance in leguminous plants and nodule fractions. *Plant and Cell Physiology*, **25**:1561-1565.

- Z -

Zebarth B.J., Alder V., Sheard R.W. 1991. In situ labelling of legume residues with a foliar application of a ¹⁵N-enriched urea solution. Communications in *Soil Science and Plant Analysis*, **22**:437-447.

Zhang Q.Z., Kullmann A., Geisler G. 1991. Nitrogen transportation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant during flowering and early siliqua developing. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **167**: 229-235.

Zhang Q.Z., Xi H.F., Geisler G. 1993. Translocation of N in pods of oilseed rape during siliqua developing. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **171**:46-48.

Zhao F., Evans E.J., Bilsborrow P.E., Syers J.K. 1993. Influence of sulphur and nitrogen on seed yield and quality of low glucosinolate oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **63**:29-37.

Zhao F., Hawkesford M., McGrath S. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science*, **30**:1-17.

Zhao F.J., Bilsborrow P.E., Evans E.J., McGrath S.P. 1997. Nitrogen to sulphur ratio in rapeseed and in rapeseed protein and its use in diagnosing sulphur deficiency. *Journal of Plant Nutrition*, **20**:549-558.

Thaïs GENARD, 2016.

Potentiel agronomique et environnemental des associations Fabacées-colza.

Thèse de l'Université de Caen Normandie

Ecole Doctorale Normandie, Biologie Intégrative, Santé, Environnement

UMR INRA-UCN 950 EVA (Ecophysiologie végétale, agronomie et nutrition N, C, S)

Résumé : L'utilisation excessive des engrais azotés dans les systèmes agricoles intensifs modifie l'équilibre du cycle de l'azote (N), entraînant des impacts négatifs sur l'environnement. Il est donc important de développer de nouvelles pratiques culturales afin de limiter les apports d'intrants azotés. Cet enjeu est d'autant plus fort pour le colza d'hiver (*Brassica napus* L.) qui nécessite une fertilisation azotée importante du fait de sa faible efficacité d'utilisation de l'N. L'utilisation de Fabacées, plantes fixatrices d'N, au travers des associations de cultures est connue pour améliorer l'utilisation des ressources disponibles par les plantes compagnes. Elles peuvent également contribuer directement à la nutrition des plantes associées par transfert ou rhizodéposition de composés azotés. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact des Fabacées comme plantes compagnes du colza aux stades végétatif et reproducteur afin de réduire l'apport d'intrants azotés tout en maintenant un haut rendement grainier du colza. Le criblage de 7 Fabacées visant à sélectionner celles maintenant ou améliorant la croissance du colza en condition de faible disponibilité azotée a conduit à retenir 3 espèces : le lupin (*Lupinus albus* L.), le trèfle (*Trifolium incarnatum* L.) et la vesce (*Vicia sativa* L.). L'impact de ces trois Fabacées sur les performances de l'association (biomasse, nutrition azotée et soufrée, fixation d'N) a été évalué en conditions contrôlées. Les résultats obtenus montrent que la capacité de fixation de l'N atmosphérique des Fabacées cultivées en association est augmentée (respectivement de 34, 140 et 290 % pour le lupin, le trèfle et la vesce). Par ailleurs, il a été montré que le trèfle et le lupin permettent la préservation du pool azoté du sol. La quantification de la capacité de transfert d'N de ces 3 Fabacées vers le colza a été réalisée en utilisant un dispositif « split-root » couplé à un marquage au ¹⁵N : le lupin et le trèfle sont les deux Fabacées qui présentent les plus fortes capacités de transfert. Enfin, l'association colza-trèfle a été retenue pour évaluer l'impact de la fertilisation soufrée (30 et 60 kg S.ha⁻¹) sur la nutrition azotée et soufrée des deux plantes, et sur le rendement et la qualité grainière du colza cultivé en cases lysimétriques et en condition de faible disponibilité en N (100 kg N.ha⁻¹). L'ensemble des résultats montre que la croissance et la qualité des graines de colza cultivé en association sont similaires à celles observées en culture pure et qu'une fertilisation de 30 kg S.ha⁻¹ en association est suffisante à l'obtention d'un rendement optimal du colza.

Mots clés : *Brassica napus* L., culture associée, fixation de l'N, *Lupinus albus* L., nutrition azotée et soufrée, *Trifolium incarnatum* L., *Vicia sativa* L.

Thaïs GENARD, 2016.

Agronomic and environmental potential of the Fabaceae-rapeseed mixtures.

Abstract : Excessive use of nitrogen (N) fertilizers in intensive agricultural systems has affected the balance of the global N cycle, resulting in negative environmental impacts. Therefore, it is necessary to develop new cultural practices to limit N inputs. This issue is particularly important for winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) which required high N fertilization level due to a low N use efficiency. The use of N fixing legumes (Fabaceae) grown in mixture is known to improve the use of available resources by the companion plants. Legumes can contribute to N nutrition by transfer or N rhizodeposition. The objective of this work was to estimate the impact of legumes as companion plants of oilseed rape at vegetative and reproductive stages to reduce N inputs while maintaining yield rapeseed. A screening of 7 legumes was performed to select 3 species maintaining or improving the growth of rapeseed under low N input : lupine (*Lupinus albus* L.), clover (*Trifolium incarnatum* L.) and vetch (*Vicia sativa* L.). An experiment was performed to evaluate the impact of these 3 species on performances of mixture (biomass, N and S nutrition and biological N fixation) under controlled conditions. The results show that the proportion of N derived from the atmosphere was increased by 34, 140 and 290% in lupine, clover and vetch, respectively. Moreover, clover and lupine maintained the soil N pool. The quantification of N transfer from legumes to rapeseed was performed using the split-root ¹⁵N-labelling method: lupin and clover had a higher capacity of transfer. The clover-rapeseed intercrop was more particularly studied to evaluate the impact of S fertilizer (30 et 60 kg S.ha⁻¹) on N and S nutrition of both plants, and yield and grain quality of rapeseed grown in lysimeter under low N input (100 kg N.ha⁻¹). Overall, the results show that growth and grain quality of rapeseed grown in mixture were similar with monoculture and that a 30 kg S.ha⁻¹ of fertilization was optimal for maintaining yield of rapeseed in mixture.

Keywords : *Brassica napus* L., plant mixture, N fixation, *Lupinus albus* L., N and S nutrition, *Trifolium incarnatum* L., *Vicia sativa* L.