



**HAL**  
open science

# Quantification des flux d'azote induits par les cultures de légumineuses et étude de leurs déterminants : comparaison de 10 espèces de légumineuses à graines

Maé Guinet

## ► To cite this version:

Maé Guinet. Quantification des flux d'azote induits par les cultures de légumineuses et étude de leurs déterminants : comparaison de 10 espèces de légumineuses à graines. Agronomie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCK011 . tel-02132342

**HAL Id: tel-02132342**

**<https://institut-agro-dijon.hal.science/tel-02132342>**

Submitted on 17 May 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE COMTE  
UFR Science de la Vie, de la Terre et de l'Environnement

# THESE

En vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
Ecole Doctorale Environnement et Santé  
Spécialité : Sciences agronomiques

Par **Maé GUINET**

**Quantification des flux d'azote induits par les cultures de  
légumineuses et étude de leurs déterminants**

-

**Comparaison de 10 espèces de légumineuses à graines**

UMR 1347 Agroécologie, Dijon

Directeur de thèse : **Bernard Nicolardot**

Encadrante de thèse : **Anne-Sophie Voisin**

Soutenue le 19 mars 2019 devant le jury composé de :

<b>Nathalie Leborgne-Castel</b>	Professeur, Université Bourgogne	Présidente
<b>Thierry Doré</b>	Professeur, AgroParisTech	Rapporteur
<b>Guénaëlle Corre-Hellou</b>	Enseignant-Chercheur, LEVA ESA Angers	Rapporteur
<b>Julie Constantin</b>	Chargée de Recherche, INRA Toulouse	Examineur
<b>Xavier Pinochet</b>	Ingénieur, Terres Inovia	Invité
<b>Bernard Nicolardot</b>	Professeur, AgroSup Dijon	Directeur de thèse
<b>Anne-Sophie Voisin</b>	Chargée de Recherche, INRA Dijon	Co-encadrante de thèse

# Remerciements

*Au cours des différentes expérimentations menées dans le cadre de cette thèse, pas moins de 1792 microparcelles ont été semées, suivies, récoltées pendant 4 ans, 2814 carottages de sol ont été réalisés ainsi que 6520 pesées, 3249 broyages et analyses d'azote. Ce sont également 148 385 nodosités qui ont été comptées et « dénodulées » ainsi que 6,246 km de racines mesurés. Vous l'aurez compris ce travail de thèse n'aurait pu se faire sans l'aide technique, scientifique et financière ainsi que le soutien d'un grand nombre de personnes que je souhaite remercier dans ces quelques pages.*

*Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de thèse Bernard Nicolardot et ma co-encadrante Anne-Sophie Voisin. Leurs expertises complémentaires dans les domaines de l'écophysiologie des légumineuses, du cycle de l'azote et de l'agronomie, leur rigueur scientifique et leur bienveillance m'ont été d'une aide précieuse pour l'aboutissement de cette thèse. Je les remercie pour leur disponibilité, la qualité de nos échanges scientifiques, ainsi que pour leurs nombreux conseils et commentaires, qui à certains moments m'ont semblé trop exigeant mais qui m'ont finalement permis d'approfondir le sujet et d'aller plus loin dans la réflexion scientifique. Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont accordée et pour leurs encouragements. Ils ont fait en sorte que je puisse avoir à ma disposition tous les moyens nécessaires pour mener à bien les différentes expérimentations et tous deux n'ont pas hésité à me prêter main forte lorsque nécessaire. Ils m'ont également permis d'assister à de nombreux congrès extrêmement enrichissants et je leur en suis très reconnaissante. Enfin je les remercie pour m'avoir introduit au monde merveilleux des légumineuses.*

*Mes remerciements s'adressent aux financeurs de ces travaux : Le métaprogramme ECOSERV de l'INRA, Le Ministère de l'Agriculture, Le projet ANR LEGITIMES (ANR-13-AGRO-0004), la Région Bourgogne Franche-Comté au travers du PSDR ProSys, Terres Inovia, le projet de recherche européen LEGATO « LEGumes for the Agriculture of TOMorrow » (FP7-613551) et le programme européen Horizon 2020 pour la recherche et l'innovation (727247 projet SolACE).*

*Je tiens à remercier Philippe Lemanceau, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de l'UMR Agroécologie de Dijon, dont il est le directeur*

*Je tiens également à remercier chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs : Guénaëlle Corre-Hellou et Thierry Doré, ou examinateurs : Julie Constantin, Nathalie Leborgne-Castel et Xavier Pinochet.*

*Marie Hélène Jeuffroy, Eric Justes, Anne Schneider, Gaëtan Louarn, Simon Boudsocq et Emmanuelle Personeni, ont accepté de faire partie de mon comité de pilotage et ont été d'une grande aide, notamment pour mieux redéfinir les limites du sujet. Je tiens à les remercier.*

*J'ai eu la chance de faire cette thèse au sein de l'équipe Ecophysiologie des légumineuses, que l'on peut décrire par la bonne ambiance qu'il y règne, l'entraide, la générosité, et où tout évènement est bon à fêter. Je garderai toujours un très bon souvenir des pauses café, des journées passées au labo à « dénoduler », mesurer, démêler, scanner des racines toujours dans la bonne humeur ou presque, ou encore des journées au champ qui se soldaient régulièrement par des pique-niques au bord du canal. Je souhaite tout particulièrement remercier Vincent Durey dont la contribution à cette étude est considérable. Il a été un pilier pour la réalisation des essais menés dans le cadre de cette thèse. Ce fut un immense plaisir de travailler avec lui de par sa bonne humeur, son implication sans faille, et sa curiosité. Je tiens également à remercier Sylvie Girodet, pour son extrême gentillesse et son aide précieuse au cours des différents essais ainsi que pour les analyses d'azote. Je remercie également Christian Jeudy pour son appui technique lors de l'essai en rhizotron dont il est un véritable expert. Sa connaissance sur les solutions nutritives me fut également grandement utile.*

*Les nombreuses expérimentations mis en place dans le cadre de cette thèse ont nécessité la mobilisation de nombreuses autres petites mains que je souhaite remercier.*

*Ce travail de thèse repose en partie sur un dispositif expérimental au champ qu'il m'aurait été impossible de réaliser sans le concours de l'équipe de l'unité expérimental de Bretenière. Je souhaite remercier tout particulièrement Laurent Falchetto qui a assuré la mise en place et le suivi agronomique de ce dispositif. Il s'est toujours montré arrangeant et ouvert à l'innovation malgré le challenge technique que représente l'étude d'une grande diversité d'espèce de légumineuses. Je remercie également Juliette Martin, Jean-Michel Carteret, Rodolphe Hugard, Pascal Farcy, Philippe Chamoix, Benjamin Pouilly, Valerie Dufayet, Guillaume Poussou et Loïc Dumont pour leur aide notamment au moment du semis et des récoltes. Leur implication a également permis d'effectuer des carottages racinaires grâce à la mise au point d'une méthode des plus ingénieuses.*

*C'est grâce à l'équipe d'AgroSup que les nombreux carottages de sol ont été réalisés sous toutes les conditions climatiques possibles. Je remercie donc Eric Pinet, Florian Bizouard, Frédéric Lombard, Arnaud Coffin, et Chantal Ducourthieux.*

*Je remercie grandement l'équipe des serres dans son intégralité pour leur contribution technique dans la mise en place et le suivie des expérimentations en serre: Céline Bernard, Karine Palavioux, Frank Zenk, Julien Martinet, Damien Gironde, Nouredine El-Mjiyad.*

*Je souhaite remercier l'ensemble des stagiaires et des mains œuvres pour leur sérieux et avec qui j'ai eu plaisir à travailler et à échanger. Merci à Juliana, Lorène, Sandy, Baptiste, Morgane, Julie.*

*Merci également à Delphine Moreau, Fabrice Dessain, Mickaël Lamboeuf, Mathieu Chanis, Christophe Lecomte, Marion Prudent, et Annabelle Larmure, avec qui j'ai eu l'occasion d'interagir au cours de ces trois ans et qui m'ont apporté leur aide en écophysiologie, en écologie fonctionnelle, pour le traitement des données ou encore pour l'analyse d'image. Je n'oublie pas également Cécile Revellin qui a fait un gros travail de sélection des souches d'inoculum et Anne-Lise Santoni pour les milliers d'analyses d'azote.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Georg Carlsson et Erik Steen Jensen pour m'avoir offert l'opportunité de partir 3 mois en Suède durant cette thèse en m'accueillant au sein de leur laboratoire de recherche à Alnarp. Ce séjour fut un moment charnière dans la thèse puisqu'il m'a permis une transition en douceur entre la période très intense d'expérimentation et le début de l'analyse des données et de la rédaction. Il m'a également permis de prendre du recul sur le sujet de thèse grâce aux échanges que j'ai pu avoir avec les différentes personnes du laboratoire. Ce fut une expérience professionnelle et humaine dont je garde de très bons souvenirs.*

*Dans un registre plus personnel, je remercie l'ensemble des collègues thésards, chercheurs, techniciens, CDD des différents pôles de recherche pour les repas et verres partagés à la cantine, lors des nombreux pots ou encore lors du fameux rassemblement du vendredi soir. Je tiens également à remercier mes amis de Dijon et d'ailleurs pour leur soutien tout au long de la thèse. Les soirées escalade avec la Team Climb up et ses éclopés (J'MJAPKLM), les après-midi jeux de sociétés ainsi que les weekends d'escapade ont été de véritables échappatoires.*

*Merci à ma famille et tout particulièrement mes parents pour leur soutien inconditionnel. A plusieurs reprises ils étaient prêts à traverser la France quand ils percevaient un coup de fatigue dans les moments les plus intenses de la thèse. Les séjours dans le Poitou Charente et au ski en leur compagnie ont été de véritables bouffés d'oxygène.*

*Enfin j'adresse mes remerciements à toi, Guillaume, qui a été à mes côtés tout au long de cette aventure. Je te remercie pour ton soutien infaillible, ta compréhension, et tes nombreux conseils. Je te dois beaucoup et j'espère en faire autant quand ton tour viendra.*

## Articles dans des revues internationales avec comité de lecture

---

- Guinet M., Nicolardot B., Revellin C., Durey V., Carlsson G., and Voisin A.-S. (2018). Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. *Plant Soil*. 432 (1-2), 207-227. **[Publié]**

## Articles dans des revues nationales

---

- Guinet, M., Nicolardot B., Durey V., Revellin C., Lombard E., Pimet E., Bizouard F., Voisin A.-S. Fixation symbiotique de l'azote et effet précédent : toutes les légumineuses à graines se valent-elles ?. *Innovations Agronomiques*. 74, **[A paraître]**
- Guinet M., Nicolardot B., et Voisin A.-S. Comparaison de la multifonctionnalité relative aux flux azotés induits par dix cultures de légumineuses. **[Soumis pour publication à Agronomie, Environnement & Sociétés]**

## Rapports de programmes et d'expertises nationaux ou régionaux

---

- Guinet M., Nicolardot B., Voisin A.-S. (2018). Toutes les légumineuses se valent-elles pour l'azote ?. In Bilan du projet LEGITIMES "Legumes Insertion in Territories to Induce Main Ecosystem Services". Construction et évaluation de scénarios territoriaux d'insertion de légumineuses p. 23-24.

## Communications orales

---

- Guinet M., Voisin A.-S., Nicolardot B. (2016). Quantification des flux d'azote induits par des cultures de légumineuses et études des traits explicatifs. « RFL1 Rencontres Francophones Légumineuses ». Dijon, France, 31 mai - 1er juin 2016.
- Guinet M., Voisin A.-S., Nicolardot B. (2016). Quantification of nitrogen fluxes and explanatory plant traits during a two year legume-cereal rotation. « Second International Legume Society Conference - legumes for a sustainable world ». Lisbonne, Portugal, 11-14 octobre 2016.
- Guinet M., Voisin A.-S., Nicolardot B. (2016). Etude de l'effet précédent de 10 espèces de légumineuses. « Atelier prospectif recherches légumineuses avec présentation des thèses en cours - Académie de l'Agriculture », Paris, France, 10 novembre 2016
- Guinet M., Nicolardot B., Voisin A.-S. (2018). Fixation symbiotique et effet précédent : toutes les légumineuses ne se valent pas. « Colloque de restitution projet ANR LEGITIMES ». Paris, France, 10 juillet 2018
- Guinet M., Nicolardot B., Durey V., Revellin C., Lombard E., Pimet E., Bizouard F., Voisin A.-S. Comparaison de l'effet de la fertilisation azotée sur la croissance et la fixation symbiotique de dix espèces de légumineuses. « RFL2 Rencontres Francophones Légumineuses ». Toulouse, France, 17-18 octobre 2018

## Posters

---

- Nicolardot B., Bizouard F., Coffin A., Guinet M., Hénault F., Lombard F., Pauthenet G., Pimet E., Voisin A.-S. N<sub>2</sub>O emissions during and after legume crops cultivation « 20th Nitrogen Workshop. Coupling C-N-P-S cycles ». Rennes, France, 25-27 juin 2018
- Guinet M., Nicolardot B., Durey V., Revellin C., Lombard E., Pimet E., Bizouard F., Voisin A.-S. Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops. « 20th Nitrogen Workshop. Coupling C-N-P-S cycles ». Rennes, France, 25-27 juin 2018
- Guinet M., Voisin A.-S., Durey V., Pimet E., Lombard F., Bizouard F., Nicolardot B. Effets précédents des légumineuses : fournitures et pertes d'azote liées à leurs résidus de culture et impacts sur le rendement du blé suivant. « RFL2 Rencontres Francophones Légumineuses ». Toulouse, France, 17-18 octobre 2018

# Table des matières

Introduction générale .....	1
-----------------------------	---

<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>5</b>
--------------------------------------	----------

<b>1. Introduction des légumineuses à graines pour la fourniture de services écosystémiques .</b>	<b>6</b>
1.1. Diversité des légumineuses à graines en culture de rente .....	6
1.2. Services écosystémiques fournis par les légumineuses à graines.....	6
<b>2. Régulation de la fixation symbiotique selon une boucle de rétroaction carbone – azote au sein de la plante.....</b>	<b>9</b>
2.1. Un coût carboné supplémentaire de la fixation symbiotique .....	9
2.2. Initiation de la fixation symbiotique suite à une carence azotée .....	10
2.3. Ajustement de la fixation symbiotique à la croissance de la plante .....	10
2.4. Régulation systémique selon les besoins azotés des légumineuses .....	11
<b>3. La nutrition azotée des légumineuses repose sur la complémentarité entre deux sources d'azote.....</b>	<b>12</b>
3.1. Effet de l'azote minéral sur la fixation symbiotique et sur le système racinaire .....	12
3.2. Une nutrition azotée optimale nécessite des mécanismes de régulation du prélèvement d'azote minéral et atmosphérique.....	14
3.3. Capacité de la fixation symbiotique à répondre aux besoins azotés des légumineuses ..	16
3.4. Variabilité de l'inhibition de la fixation symbiotique par l'azote minéral .....	20
<b>4. Effet des précédents légumineuses sur les cultures de céréales qui suivent .....</b>	<b>25</b>
4.1. Augmentation des performances des céréales précédées par des légumineuses .....	25
4.2. Facteurs azotés explicatifs de l'effet positif des légumineuses sur les cultures suivantes	26
4.3. Solde azoté apparent après les cultures de légumineuses .....	30
4.4. Facteurs exogènes au cycle de l'azote explicatifs de l'effet positif des légumineuses sur les cultures suivantes .....	33
4.5. Grande variabilité de l'effet précédent des légumineuses .....	34
<b>5. Caractérisation d'une diversité d'espèce par leurs traits.....</b>	<b>35</b>

<b>Questions de recherche et démarche .....</b>	<b>37</b>
---	-----------

<b>1. Objectifs et questions de recherche .....</b>	<b>38</b>
<b>2. Démarche expérimentale adoptée .....</b>	<b>43</b>
2.1. Choix des espèces de légumineuses.....	43
2.2. Expérimentations mises en place.....	45
<b>3. Organisation du manuscrit .....</b>	<b>49</b>

## **Chapitre 1 : Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species**

..... **51**

<b>1. Introduction</b> .....	53
<b>2. Materials and Methods</b> .....	55
2.1. Field experiment.....	55
2.2. Greenhouse experiment.....	61
2.3. Data analysis.....	62
<b>3. Results</b> .....	62
3.1. Effects of legume species and inorganic N fertilisation on shoot growth and N accumulation in the field.....	63
3.2. Variations in N uptake relative to plant N requirements from growth over time and with different inorganic N input.....	64
3.3. Effect of inorganic N available at sowing on symbiotic nitrogen fixation.....	66
3.4. Legume species had different ability to retrieve inorganic N from the soil and fertiliser	68
3.5. Variations in root soil exploration among species and as influenced by N fertilisation ...	69
3.6. Correlation between N uptake efficiency of the fertiliser (NUEf) and root soil exploration rates	70
<b>4. Discussion</b> .....	71
4.1. Plant growth and N nutrition were affected by climatic conditions .....	71
4.2. N fertilisation did not increase the amount of shoot N for most legume species .....	72
4.3. SNF inhibition by inorganic N varies according to plant growth and plant inorganic N uptake ability.....	73
4.4. Inorganic N uptake efficiency and root elongation rates.....	75
<b>5. Conclusion</b> .....	77

## **Chapitre 2: Shoot and root residue-N mineralisation of ten legumes and two cereals as a function of their biochemical characteristics** .....

**79**

<b>1. Introduction</b> .....	81
<b>2. Materials and Methods</b> .....	83
2.1. Field experiments .....	83
2.2. Outer pot experiment .....	85
2.3. Processing of shoot and root residues from the field and outer pot experiments.....	85
2.4. Calculation of the amount of N potentially mineralised from shoot and root residues in field conditions.....	87
2.5. Data analysis.....	88
<b>3. Results</b> .....	89

3.1.	Shoot residue dry matter at harvest in the field experiments.....	89
3.2.	Dry matter and N distribution between shoot and root residues .....	90
3.3.	Biochemical characteristics of shoot and root residues.....	92
3.4.	Shoot and root residues-N mineralisation dynamics .....	94
3.5.	Shoot and root residue-N mineralisation related to their C:N ratio .....	94
3.6.	Nitrogen mineralisation related to the biochemical profile of shoot and root residues..	96
3.7.	Amount of N potentially mineralised from shoot and root residues.....	97
<b>4.</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>98</b>
4.1.	Amounts of inorganic-N left by shoot and root residues.....	98
4.2.	Shoot and root residue-N mineralisation according to their biochemical characteristics	100
4.3.	Residue-N potentially available for the following crop.....	101
<b>5.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>102</b>

### **Chapitre 3 : Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling .....105**

<b>1.</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>107</b>
<b>2.</b>	<b>Materials and Methods</b> .....	<b>109</b>
2.1.	Field experiments .....	109
2.2.	Estimation of N fluxes using STICS model .....	113
2.3.	Data analysis.....	115
<b>3.</b>	<b>Results</b> .....	<b>116</b>
3.1.	Effect of pre-crop treatments and year on unfertilised wheat performances .....	116
3.2.	Effect of N fertilisation on wheat performances.....	118
3.3.	Estimation of residue and soil N fluxes between pre-crop harvest and wheat harvest .	118
3.4.	Relationships between wheat performances, pre-crop characteristics, and pedoclimatic conditions.....	123
<b>4.</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>126</b>
4.1.	Response of wheat performances to pre-crops and N fertilisation.....	126
4.2.	N fluxes simulated by the STICS model .....	127
4.3.	Link between N fluxes and wheat shoot-N .....	128
<b>5.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>129</b>

### **Chapitre 4 : Comparaison de la multifonctionnalité relative aux flux azotés induits par dix espèces de légumineuses à graines .....133**

<b>1.</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>136</b>
-----------	---------------------------	------------

<b>2. Matériels et Méthodes</b> .....	139
2.1. Expérimentations mobilisées .....	139
2.2. Flux azotés mobilisés .....	140
2.3. Traits de plantes et propriétés du couvert associés aux flux d'azote .....	142
2.4. Calcul de la multifonctionnalité.....	145
2.5. Calcul du solde azoté apparent .....	147
2.6. Analyses statistiques .....	148
<b>3. Résultats</b> .....	148
3.1. Caractérisation et corrélations entre les traits de plantes et propriétés du couvert ....	148
3.2. Synergies et antagonismes entre les flux azotés et étude des traits explicatifs .....	150
3.3. Multifonctionnalité des espèces .....	152
3.4. Apport d'azote symbiotique au système de culture .....	156
<b>4. Discussion</b> .....	158
4.1. Synergie entre la production de graines et la fixation symbiotique .....	158
4.2. Compromis entre production de graines et fourniture d'azote au sol .....	159
4.3. Antagonisme entre les quantités d'azote minéral prélevées pendant le cycle des légumineuses et les quantités d'azote lixiviées après leur récolte .....	160
4.4. Relation entre la quantité d'azote du blé suivant et les autres des flux azotés .....	161
4.5. Multifonctionnalité associée aux flux azotés induits par les légumineuses.....	163
<b>5. Conclusion</b> .....	165

## **Discussion générale et perspectives .....167**

<b>1. Retour sur les principaux résultats de thèse</b> .....	168
1.1. Acquisition de l'azote atmosphérique et de l'azote minéral du sol au cours du cycle des légumineuses.....	168
1.2. Devenir de l'azote après la culture des légumineuses .....	172
1.3. Multifonctionnalité des espèces de légumineuses .....	174
<b>2. Démarches et cadres mobilisés</b> .....	176
2.1. Recours à l'expérimentation au champ, en conditions contrôlées, et à la modélisation	176
2.2. Mobilisation de l'approche traits - fonctions- services écosystémiques .....	179
<b>3. Favoriser la réintroduction des légumineuses à graines comme culture de diversification dans les systèmes de culture</b> .....	180
3.1. Apporter des références techniques nécessaires à la réintroduction des légumineuses à graines	180
3.2. L'introduction des légumineuses nécessite une gestion de l'azote à l'échelle des systèmes de culture.....	182

<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>185</b>
--	------------

<b>Annexes.....</b>	<b>207</b>
---------------------	------------

ANNEXE 1 : Effet de l'inoculation sur le rendement des légumineuses.....	208
ANNEXE 2 : Rendements en graines des légumineuses en 2014 et 2016.....	209
ANNEXE 3 : Effet de la fertilisation azotée sur la biomasse et la teneur en azote des pailles et des graines des légumineuses .....	210
ANNEXE 4 : Architecture racinaire en rhizotron .....	211
ANNEXE 5 : Dynamique de la biomasse et des quantités d'azote prélevées par les légumineuses .....	214
ANNEXE 6 : Estimation des quantités d'azote des résidus aériens en 2014 à partir des incubations et des simulations avec STICS .....	217
ANNEXE 7 : Reliquats azotés post récolte des légumineuses et des céréales .....	219
ANNEXE 8 : Exemple des dynamiques de quantités d'eau et d'azote du sol observées et simulées par STICS pour le précédent pois chiche .....	220
ANNEXE 9 : Flux azotés induits par les précédents légumineuses et céréales .....	221
ANNEXE 8 : Article Innovations Agronomiques.....	223





# Introduction générale

L'intensification de l'agriculture, amorcée dans les années 1950, a conduit à une augmentation de la production agricole, principalement associée à un accroissement des rendements, permis par l'utilisation massive de fertilisants, d'eau et de pesticides (Tilman et al., 2002). Depuis plusieurs décades, l'agriculture intensive est cependant remise en cause de par les externalités négatives engendrées sur l'environnement et la santé (Stoate et al., 2001). Une part des effets négatifs est associée à l'azote dont la moitié est perdue dans l'environnement et contribue à la pollution de l'eau, du sol, de l'air, au changement climatique et à l'érosion de la biodiversité (Sutton et al., 2011).

Dans ce contexte, l'agroécologie et l'intensification écologique sont mises en avant pour répondre aux exigences de réduction des intrants de synthèse en favorisant au maximum les services écosystémiques, c'est-à-dire les avantages issus du fonctionnement des écosystèmes dont l'homme peut tirer profit, afin d'assurer la production des biens agricoles (Altieri, 1989; Bommarco et al., 2013; Doré et al., 2011; Wezel et al., 2014). L'augmentation de la biodiversité dans les systèmes agricoles semble un levier essentiel permettant une complémentarité des fonctions délivrées par les espèces et à l'origine d'un grand nombre de services écosystémiques (Le Roux et al., 2008; Quijas et al., 2010). En ce sens, la réintroduction des légumineuses dans les systèmes de culture a un rôle majeur à jouer du fait de fonctions uniques ou complémentaires à celles des céréales, et sur lesquelles reposent plusieurs services écosystémiques. En effet, les légumineuses fourragères ou à graines constituent une source de protéines végétales avec une bonne valeur nutritionnelle pour l'alimentation humaine et animale (Curran, 2012; Jezierny et al., 2010). D'autre part, elles permettent de réduire le recours aux intrants azotés pendant leur culture grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via la mise en place d'une symbiose avec les bactéries du sol, ainsi qu'après leur culture via la minéralisation de leurs résidus riches en azote permettant l'apport d'azote à la culture suivante. De ce fait, elles permettent également de réduire la consommation d'énergie et l'émission de gaz à effet de serre ( $\text{CO}_2$  et  $\text{N}_2\text{O}$ ) associées à la production, au transport et à l'épandage des fertilisants azotés de synthèse (Nemecek et al., 2008; Peoples et al., 2009b). Enfin les légumineuses jouent un rôle de diversification dans les systèmes de culture principalement constitués de céréales ou d'oléagineux, et contribuent à la rupture du cycle des ravageurs (Ratnadass et al., 2012). Celles-ci peuvent-être cultivées comme cultures de rente en peuplement monospécifique ou plurispécifique pour la production de graines ou de fourrages. Elles peuvent également être cultivées comme cultures non récoltées en tant que cultures intermédiaires entre deux cultures de rente ou en tant que plantes compagnes associées à une culture de rente.

Malgré la diversité des modes d'insertion des légumineuses dans les systèmes de culture et leurs nombreux intérêts environnementaux et nutritionnels, les légumineuses ne représentent qu'une très faible part de la surface agricole utile en Europe et en France (Voisin et al., 2014). Au lendemain de la Seconde Guerre mondiale, l'effet combiné du soutien des politiques européennes aux productions de

céréales et d'oléagineux et la substitution des légumineuses prairiales par le maïs ensilage associée à l'importation massive de soja pour l'alimentation des élevages, a conduit à la spécialisation des systèmes de culture avec des rotations culturales de plus en plus courtes basées sur des céréales fertilisées et par conséquent à une réduction drastique des surfaces de légumineuses à graines et fourragères (Schott et al., 2010; Voisin et al., 2014). Par la suite, les légumineuses n'ont bénéficié que d'un faible investissement en termes de sélection variétale et de recherche par rapport aux céréales. Ce désintéressement vis-à-vis des légumineuses a participé à leur déficit de rentabilité à cause de rendements relativement faibles et souvent variables selon les situations pédo-climatiques, ainsi qu'à un manque de références pour la réintroduction d'une diversité de légumineuses (Cernay et al., 2015; Duc et al., 2010; Meynard et al., 2013). Peu de références sont notamment disponibles sur une diversité de légumineuses à graines puisque la majorité des études ont jusqu'à présent porté sur le pois protéagineux, ou sur la comparaison de plusieurs espèces de légumineuses implantées en tant que plantes de service (Cernay et al., 2016; Lorin et al., 2016; Lorin et al., 2015; Tribouillois et al., 2015a). Aujourd'hui, une meilleure connaissance sur les caractéristiques qui déterminent les performances des légumineuses à graines en lien avec les facteurs environnementaux, permettrait de maximiser les bénéfices des légumineuses encore trop peu valorisés dans les systèmes de culture, et de réduire les potentiels impacts négatifs associés à ces cultures. En effet, suite à la récolte des légumineuses les reliquats azotés sont souvent plus importants par rapports à ceux mesurés après une culture de céréale et peuvent engendrer des plus grandes pertes d'azote par lixiviation (Plaza-Bonilla et al., 2015).

Ainsi, cette thèse se propose de comparer dix espèces de légumineuses à graines, sur la base de la quantification des flux azotés induits par ces cultures et de l'étude des déterminants de ces flux, au cours d'une succession culturale de deux ans (légumineuse – blé). L'étude porte en particulier sur la fixation symbiotique, sur la production de graines riches en azote et également sur la minéralisation des résidus de culture et l'effet des légumineuses sur la culture suivante, en considérant les pertes d'azote par lixiviation.



## Synthèse bibliographique

# 1. Introduction des légumineuses à graines pour la fourniture de services écosystémiques

## 1.1. Diversité des légumineuses à graines en culture de rente

**D'un point de vue botanique**, les légumineuses à graines appartiennent à la famille des fabacées. Elles sont également caractérisées par leur **mode d'insertion dans les systèmes de culture et leur utilisation**. Il s'agit de cultures de rente cultivées en couvert monospécifique ou plurispécifique et dont les graines riches en protéines sont récoltées pour être valorisées pour l'alimentation humaine ou animale. Au sein des légumineuses à graines sont définis plusieurs groupes selon le débouché des graines. Il s'agit des « protéagineux » dont la définition est propre à la réglementation européenne et désigne le pois, la féverole et le lupin doux principalement cultivés pour l'alimentation animale (CEE 1765/92). Le soja qui appartient au groupe des oléo-protéagineux et dont les graines sont utilisées pour la fabrication d'huile et de leurs co-produits riches en protéines (tourteaux), est également considéré comme une légumineuse à graines. Enfin, les légumes secs correspondent aux légumineuses à graines récoltées à maturité, et à destination de l'alimentation humaine. Il s'agit de la lentille, du fenugrec, du pois chiche, du haricot. Le pois, le lupin et la féverole peuvent aussi appartenir au groupe des légumes secs lorsque leurs graines sont récoltées pour l'alimentation humaine.

En France, malgré la diversité des espèces adaptées à des conditions pédoclimatiques variées, les cultures de protéagineux (299 000 ha), de soja (141 000 ha) et de légumes secs (53 000 ha) représentaient seulement 1,7 % de la surface agricole utile en 2017 (Agreste, 2018).

## 1.2. Services écosystémiques fournis par les légumineuses à graines

### 1.2.1. Définitions et généralités autour des services écosystémiques

Les **services écosystémiques** ont été définis par le Millennium Ecosystem Assessment (2005) comme « les avantages que les hommes peuvent tirer des écosystèmes ». Plusieurs autres définitions ont été proposées afin de formaliser le lien entre nature et bien être de l'homme en soulignant l'importance de la mise en **relation entre fonctions, services écosystémiques et avantages**. C'est notamment le choix fait dans le projet EFES (2017) dans lequel les services écosystémiques ont été définis comme : « les avantages socio-économiques retirés par l'homme de son utilisation durable des fonctions écologiques des écosystèmes ». Les services écosystémiques font ainsi la connexion entre l'écosystème et le système socio-économique (Haines-Young and Potschin, 2010; Lescourret et al., 2015; MAES, 2013; Tibi and Therond, 2017). La fourniture de services écosystémiques repose sur des fonctions écologiques, elles-mêmes dépendantes de la structure de l'écosystème, c'est-à-dire l'ensemble des entités biotiques ou abiotiques qui le composent et les relations entre ces entités. De

l'autre côté, le système socio-économique retire des avantages à partir des services écosystémiques qui participent au bien-être de l'homme.

L'un des enjeux de l'agriculture est de réduire la dépendance aux intrants de synthèse en cherchant à maximiser la fourniture de services écosystémiques par les écosystèmes agricoles. Certaines pratiques agricoles associées à la gestion des cultures (choix des cultures, agencement des cultures, travail du sol, choix de la fertilisation,...) ou à la gestion des éléments du paysage (intégration de zones semi-naturelles) (Wezel et al., 2014), peuvent venir moduler la fourniture de services écosystémiques. Ces pratiques peuvent viser à favoriser la fourniture de **services écosystémiques de régulation** des stress abiotiques et biotiques, également appelés « **services intrants** » afin d'assurer une grande partie des productions agricoles (Le Roux et al., 2008; Zhang et al., 2007).

### *1.2.2. Légumineuses à graines, quels services écosystémiques attendus ?*

La réintroduction de la diversité planifiée dans les écosystèmes agricoles (Gaba et al., 2015; Médiène et al., 2011), est l'une des pratiques identifiées afin de favoriser les services écosystémiques.

La réintroduction des légumineuses à graines dans les écosystèmes agricoles est motivée en partie par la recherche d'une diversité de services écosystémiques et notamment « les services intrants » sur lesquels repose la production agricole. **Les services de régulation des stress abiotiques** qui fournissent les conditions propices à la croissance et limitent les déficits hydriques et les carences en nutriments, sont particulièrement d'intérêt (Tibi and Therond, 2017). La singularité des légumineuses à fixer l'azote de l'air permet de ne pas recourir aux fertilisants azotés pendant leur culture. D'autre part, les résidus laissés au sol après la récolte des graines de légumineuses participent à la fertilité des sols en augmentant la disponibilité en azote pouvant bénéficier à la culture suivante (Angus et al., 2015; Kaul, 2004). Les systèmes racinaires pivotants des légumineuses peuvent également contribuer à la structuration du sol (Köpke and Nemecek, 2010).

Les **services de régulation des stress biotiques** peuvent également être recherchés lors de l'introduction des légumineuses à graines dans les rotations de culture en réduisant l'impact des bioagresseurs des cultures principales (Yunusa and Rashid, 2007). Ce service n'est pas propre aux légumineuses mais est caractéristique des cultures de diversification, qui par leur introduction dans les systèmes de culture majoritairement constitués de céréales et d'oléagineux, permettent de rallonger le cycle de retour des cultures dominantes sur une même parcelle et de diminuer ainsi la pression des maladies et des insectes ravageurs par la rupture de leur cycle (Angus et al., 2015).

D'autre part, des services écosystémiques de régulation autres que les « services intrants » peuvent découler de l'insertion des légumineuses à graines dans les systèmes de culture. Le non recours aux intrants azotés de synthèse pendant la culture des légumineuses et la réduction de la dose de fertilisation azotée sur la culture suivante permet de **réduire les émissions de gaz à effet de serre** (CO<sub>2</sub>

et N<sub>2</sub>O) à l'échelle de la rotation (Carroué et al., 2012; Reckling et al., 2016). Les légumineuses sont également classées comme cultures attractives pour les pollinisateurs et participent ainsi au **service écosystémique de pollinisation** (Decourtye et al., 2007).

Il est cependant important de noter que certains **impacts négatifs** sont engendrés lors de l'insertion des légumineuses dans les systèmes de cultures et qu'il est nécessaire de quantifier leurs effets. Plusieurs études ont mis en avant de plus grands risques de lixiviation pendant ou après la culture de légumineuse par rapport à une céréale, souvent expliqués par un plus faible prélèvement d'azote minéral du fait d'un système racinaire moins développé (Carroué et al., 2012; Urbatzka et al., 2009). Malgré leur potentiel rôle de culture de rupture des cycles des ravageurs lors de leur insertion dans les rotations, les légumineuses sont généralement sensibles à de nombreux pathogènes et restent peu compétitives vis-à-vis des adventices (Corre-Hellou and Crozat, 2005). En effet, leur développement aérien et racinaire souvent lent en début de cycle, confère aux légumineuses une faible aptitude à être compétitives pour les ressources aériennes (la lumière) et souterraines (prélèvement des nutriments et de l'eau).

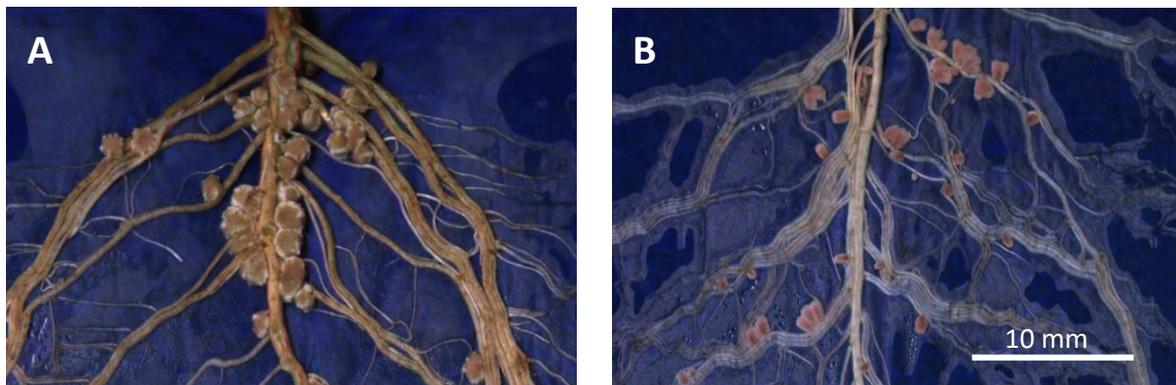
Ainsi, les services écosystémiques potentiellement délivrés par les légumineuses à graines sont nombreux mais sont actuellement encore trop peu valorisés en raison notamment de leur forte variabilité selon les espèces, les pratiques culturales et les conditions pédo-climatiques. Par ailleurs, la fourniture simultanée des différents services écosystémiques n'est pas toujours possible compte tenu de l'existence de nombreuses **interactions aussi bien positives (synergies) que négatives (antagonismes) entre les différents services** (Lescourret et al., 2015). La maximisation d'un service écosystémique peut donc se faire au détriment d'un autre ou peut engendrer un impact négatif non désiré (Bennett et al., 2009; Gaba et al., 2014). La recherche d'un **compromis entre les différents services** est alors obligatoire. Certaines pratiques agricoles peuvent cependant moduler les relations entre les services pour chercher à maximiser les synergies entre services et/ou limiter les impacts négatifs. Compte tenu de la diversité des légumineuses à graines mobilisable, il est nécessaire d'identifier les synergies et antagonismes entre les services potentiellement délivrés afin d'aider au choix des espèces les plus à même de délivrer le ou les services recherchés.

Dans les parties suivantes un focus est fait sur deux principaux flux azotés induits par les cultures de légumineuses et particulièrement importants pour la fourniture de services écosystémiques relatifs à l'azote. Il s'agit de la fixation symbiotique et de l'apport d'azote à la culture suivante via la minéralisation des résidus de culture des légumineuses. Les caractéristiques des plantes potentiellement déterminantes dans l'obtention de ces flux azotés seront également mises en avant.

## 2. Régulation de la fixation symbiotique selon une boucle de rétroaction carbone – azote au sein de la plante

### 2.1. Un coût carboné supplémentaire de la fixation symbiotique

Une des spécificités des légumineuses est leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via la mise en place d'une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium* au sein d'organes spécifiques : les nodosités (Figure 1). L'azote minéral du sol est également prélevé par les racines. Une fois prélevé par les racines ou les nodosités, l'azote est exporté par le xylème vers les parties aériennes afin de subvenir aux besoins azotés de la plante. En contrepartie les parties aériennes allouent une partie du carbone issu de la photosynthèse aux parties souterraines, afin d'assurer la mise en place, le maintien et le fonctionnement des racines et des nodosités.



**Figure 1** : Nodosités sur des racines de *Glycine max* (A) et de *Pisum sativum* (B) cultivés en rhizotron (Source personnelle).

Des différences en termes de coûts carbonés entre les deux voies d'acquisition de l'azote ont été mises en évidence. Plusieurs travaux suggèrent un coût carboné de l'acquisition d'azote par la fixation symbiotique plus élevé que le prélèvement d'azote minéral par les racines (Jensen, 1997b; Moreau et al., 2008; Pate et al., 1979). Cette interprétation repose d'une part sur le fait qu'une plus grande proportion de carbone issu de la photosynthèse était respirée par les racines nodulées par rapport aux racines non nodulées. Par ailleurs, une relation négative a été obtenue entre le rapport de biomasse produite par quantité d'azote absorbée et le pourcentage d'azote de la plante dérivé de la fixation symbiotique (% Ndfa) (Jensen, 1997b). Cette relation indique que les légumineuses reposant en grande partie sur la fixation symbiotique ont tendance à produire moins de biomasse par unité d'azote absorbée, suggérant un coût carboné de la fixation symbiotique supérieur au prélèvement d'azote minéral.

Toutefois, des calculs théoriques ont conduit à des coûts carbonés similaires entre l'activité fixatrice et l'assimilation des nitrates par les racines (Andrews et al., 2009; Munier-Jolain and Salon, 2005). Les

potentiels surcoûts carbonés associés à la fixation symbiotique pourraient être liés à la formation de nodosités, organes supplémentaires par rapport aux plantes dont la nutrition azotée repose exclusivement sur l'assimilation d'azote minéral.

## 2.2. Initiation de la fixation symbiotique suite à une carence azotée

La nodulation est initiée juste après le début d'une diminution rapide de la teneur en azote dans les parties aériennes indiquant une situation de carence azotée (Voisin et al., 2010). La carence azotée apparaît plus ou moins tôt dans le cycle des légumineuses selon les ressources azotées de la semence et de la disponibilité en azote minéral du sol qui sont les ressources azotées prioritairement utilisées par les légumineuses.

En **l'absence d'azote minéral dans le milieu**, l'épuisement des ressources azotées de la semence engendre une carence azotée au niveau des parties aériennes des légumineuses. En réponse, la plante alloue une partie du carbone issu de la photosynthèse afin d'assurer la mise en place des nodosités. La date de perception de la carence azotée et donc l'initiation de la nodulation dépend à la fois de la taille de la semence, qui détermine les ressources initiales en azote, et de la vitesse de croissance de la plante, qui définit la vitesse d'épuisement de l'azote de la semence. Néanmoins, ces deux facteurs sont corrélés puisque la taille de la semence semble influencer la vitesse de croissance des plantes. Une relation positive entre la biomasse initiale de la semence et les biomasses racinaires et aériennes, 35 jours après le semis sur 5 géotypes de haricot de Lima, a pu être mise en évidence (Dobert and Blevins, 1993). Une même relation a été rapportée sur neuf espèces de légumineuses (Dayoub et al., 2017). Ainsi, une espèce avec une semence de petite taille aura peu de ressources azotées en début de cycle. Cependant, les besoins azotés seront aussi relativement faibles du fait d'une croissance plus lente par rapport à une espèce avec de plus grosses semences.

En **présence d'azote minéral dans le milieu**, les légumineuses mettent en place des nodosités seulement lorsque les ressources de la semence et du sol ne permettent plus de répondre aux besoins azotés de la plante. Chez *M. truncatula* une régulation systémique de la formation des nodosités par le statut azoté de la plante a pu être mise en évidence (Jeudy et al., 2010). L'épuisement progressif de l'azote minéral du sol suite au prélèvement par les racines engendre à terme une carence azotée qui déclenche la mise en place de la nodulation. Ainsi, plus la quantité d'azote minéral dans le sol au moment du semis est importante, plus l'initiation de la fixation symbiotique est retardée dans le cycle des légumineuses (Voisin et al., 2002b).

## 2.3. Ajustement de la fixation symbiotique à la croissance de la plante

En **l'absence d'azote minéral**, le nombre et la biomasse des nodosités sont positivement corrélés à la biomasse aérienne pendant la phase végétative (Dobert and Blevins, 1993; Voisin et al., 2010). Une

légumineuse dont la croissance aérienne est limitée par un faible rayonnement ou de faibles températures présente moins de nodosités par rapport à une plante cultivée dans des conditions environnementales optimales. En effet, dans des conditions limitant la croissance de la plante, les besoins azotés associés sont plus faibles. La vitesse de la fixation symbiotique est dans un premier temps fonction de la mise en place progressive de la nodulation puis devient fonction de la vitesse de croissance de la plante et donc des besoins azotés associés (Voisin et al., 2002b).

Des différences de vitesse de croissance entre espèces de légumineuses peuvent engendrer des différences de dynamique d'acquisition de l'azote par la fixation symbiotique. Chez le pois, les vitesses de croissance et de fixation symbiotique augmentent jusqu'à floraison puis diminuent légèrement. Pendant la période de mise en place des gousses, la forte demande en azote entraîne un deuxième pic d'augmentation de la vitesse de fixation symbiotique (Voisin et al., 2002b). Des différences de dynamique d'accumulation d'azote ont pu être mises évidence en comparant le soja avec le haricot ou la féverole (George and Singleton, 1992; Zapata et al., 1987a, b). Le soja accumule seulement 28 % de l'azote total mesuré à maturité pendant la phase végétative, tandis que le haricot accumule 50 % de l'azote total mesuré à maturité pendant cette même période. Chez le soja, 63 % de la biomasse aérienne est accumulée entre les stades R1 (début floraison) et R5 (début remplissage), période qui correspond aux plus grandes vitesses de fixation symbiotique. Au contraire, chez la féverole, la vitesse de croissance aérienne augmente dès le milieu de la phase végétative et engendre une augmentation de la vitesse de la fixation symbiotique très tôt dans le cycle.

#### 2.4. Régulation systémique selon les besoins azotés des légumineuses

Par un ajustement de la fixation symbiotique aux besoins azotés de la plante, le nombre et la croissance des nodosités sont contrôlés, limitant ainsi les coûts carbonés associés. Des essais en split-root ont mis en évidence une réponse systémique du prélèvement d'azote par la fixation symbiotique lors d'une limitation locale en azote atmosphérique (Jeudy et al., 2010). Chez *M. truncatula*, une privation locale du système racinaire en azote atmosphérique, engendre une augmentation de 70 % de l'acquisition d'azote par la partie du système racinaire non privé par rapport à la plante dont l'ensemble du système racinaire est en contact avec du N<sub>2</sub> (plante témoin) (Jeudy et al., 2010). Cette réponse suggère une régulation systémique induite par le statut azoté de la plante. Cependant, l'augmentation de l'acquisition de N<sub>2</sub> n'est pas associée à une augmentation de l'activité spécifique de la fixation symbiotique mais à une croissance des nodosités existantes dans un premier temps, puis à la mise en place de nouvelles nodosités lorsque la limitation persiste (Ruffel et al., 2008). Le développement des nodosités a été permis par une allocation en carbone plus grande vers le système non privé en N<sub>2</sub>. Ces réponses adaptatives permettent partiellement de compenser le déficit local en N<sub>2</sub>. Néanmoins, une diminution de la biomasse et de la teneur en azote par rapport aux plantes témoins a tout de même

été observée (Jeudy et al., 2010), indiquant une carence azotée temporaire liée au délai de la mise en place des nodosités fonctionnelles pour répondre aux besoins azotés de la plante.

En résumé, les légumineuses mettent en place des nodosités suite à une carence azotée lorsque qu'aucune autre source d'azote n'est disponible pour satisfaire les besoins azotés (Mohd-Radzman et al., 2013). En effet, en présence d'azote minéral, les légumineuses vont prioritairement absorber cet azote via les racines, organes déjà développés pour remplir d'autres fonctions telles que le prélèvement d'eau et des éléments minéraux, l'ancrage et l'interaction avec les microorganismes du sol. Au contraire la fixation symbiotique nécessite la mise en place d'organes supplémentaires qui engendrent un coût carboné pour la plante. Les légumineuses semblent donc maximiser l'activité des nodosités déjà formées, limitant ainsi le coût carboné tout en assurant une absorption azotée suffisante pour répondre aux besoins azotés associés à la croissance de la plante. Ainsi, une fois les nodosités développées, l'activité fixatrice des nodosités est maximale. Il existe ainsi une étroite co-régulation entre les voies d'assimilation du carbone et de l'azote.

### 3. La nutrition azotée des légumineuses repose sur la complémentarité entre deux sources d'azote

#### 3.1. Effet de l'azote minéral sur la fixation symbiotique et sur le système racinaire

##### *3.1.1. Inhibition de la fixation symbiotique par l'azote minéral*

**Au semis**, la présence d'azote minéral au contact des racines entraîne un retard de la mise en place de la nodulation (Moreau et al., 2008) et de la fixation symbiotique (Voisin et al., 2002b). Le décalage de la nodulation par la présence d'azote minéral engendre de plus faibles biomasses nodulaires par rapport à une plante cultivée en l'absence d'azote minéral. Ce phénomène a été observé chez de nombreuses espèces de légumineuses (Dayoub et al., 2017; Imsande, 1986). Chez le pois, cultivé au champ, la fixation symbiotique se met en place à partir du moment où la quantité d'azote minéral dans le sol devient inférieure à  $60 \text{ kg N ha}^{-1}$ . C'est seulement lorsque le prélèvement d'azote minéral par les racines engendre une quantité d'azote minéral du sol en dessous de ce seuil que l'inhibition est levée (Voisin et al., 2002b).

**Une fois la nodulation initiée**, la fixation symbiotique permet l'accumulation d'azote dans les légumineuses. L'assimilation d'azote minéral reste par contre possible (Zapata et al., 1987b) si celui-ci est disponible et si le système racinaire des légumineuses permet son prélèvement. La croissance des racines au cours du cycle permet d'augmenter la surface d'exploration racinaire dans le sol et de rendre accessible de l'azote minéral initialement indisponible. De plus, les fluctuations de l'azote minéral dues à la minéralisation de l'azote organique et sa grande hétérogénéité de répartition spatiale dans le sol,

peuvent moduler la fixation symbiotique au cours du cycle des légumineuses. La présence d'azote minéral peut avoir des effets variables sur la croissance des nodosités et l'activité fixatrice, selon le stade physiologique des légumineuses. Naudin et al. (2011) ont montré que l'exposition du système racinaire de pois à de l'azote nitrique pendant une semaine engendre une diminution de l'activité spécifique des nodosités, quel que soit le stade physiologique considéré (début du stade végétatif, floraison et remplissage des graines). Néanmoins, pendant le stade végétatif le taux d'apparition et la vitesse de croissance des nodosités est simplement réduit par rapport aux plantes de pois témoins non exposées à l'azote nitrique. Au contraire aux stades floraison et remplissage des graines, la présence d'azote nitrique cause des dommages aux nodosités existantes en réduisant très fortement leur biomasse. Une fois cet azote nitrique retiré de la solution nutritive, le processus de récupération des nodosités et l'activité fixatrice varie selon le stade physiologique. Au stade végétatif, les nodosités existantes croissent à nouveau et de nouvelles nodosités se développent en parallèle. L'activité spécifique des nodosités est rapidement équivalente à celle des plantes témoins. Au contraire à floraison, à la fin de l'exposition à l'azote nitrique la majorité des nodosités ne sont plus fonctionnelles (couleur verte). L'augmentation partielle de l'activité spécifique des nodosités est associée à la mise en place d'une nouvelle vague de nodosités. Au moment du remplissage des graines, la compétition du carbone avec les organes reproducteurs (Jeuffroy and Warembourg, 1991), ne permet pas le rétablissement des nodosités et donc la restauration de l'activité fixatrice. Ainsi, la capacité des légumineuses à passer rapidement de la fixation symbiotique au prélèvement d'azote minéral et *vice versa* varie fortement selon le stade physiologique. La nutrition azotée du pois est plus modulable en début de cycle par rapport aux stades plus tardifs, notamment du fait d'une plus grande attribution du carbone aux parties souterraines en début de cycle (Voisin et al., 2003b).

### *3.1.2. La présence d'azote minéral augmente la croissance racinaire*

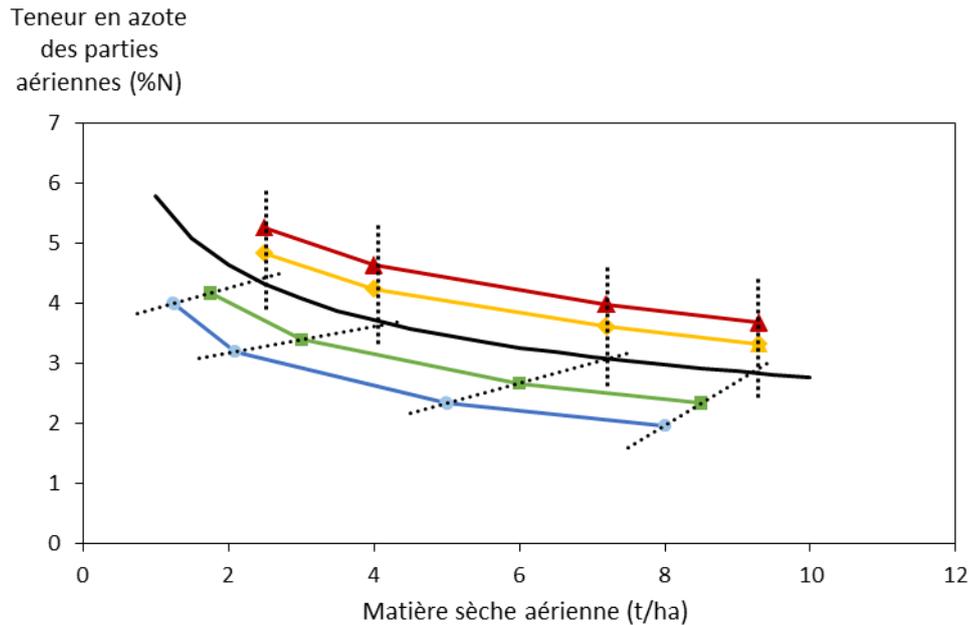
Les légumineuses dont la nutrition azotée repose en grande partie sur le prélèvement d'azote minéral présentent un système racinaire plus développé surtout dans les 20 premiers centimètres du sol (Jensen, 1986; Voisin et al., 2002a). L'augmentation de la biomasse racinaire pourrait être liée à un effet local des nitrates présents dans le sol qui favorise la prolifération des racines (Robinson et al., 1999) et/ou à un effet systémique associé à une plus grande disponibilité de composés carbonés pour les racines du fait de l'inhibition de la nodulation par l'azote minéral. En effet, Voisin et al. (2003b) n'ont observé aucune différence d'allocation de carbone en proportion de la photosynthèse nette, entre les racines de pois nodulées et celles non nodulées.

## 3.2. Une nutrition azotée optimale nécessite des mécanismes de régulation du prélèvement d'azote minéral et atmosphérique

### 3.2.1. Diagnostic de la nutrition azotée grâce à la courbe de dilution de l'azote

Afin de déterminer si les besoins azotés des légumineuses sont assurés quelle que soit l'origine de l'azote il est possible de faire un diagnostic de la nutrition azotée. Celui-ci est basé sur la courbe de dilution de l'azote dans la biomasse au cours de la croissance. Une relation négative entre la biomasse aérienne produite et la teneur en azote a été établie pour différentes cultures telles que le blé (Justes et al., 1994), le maïs (Plénet and Cruz, 1997) ou le pois (Vocanson et al., 2005). Au cours du cycle de ces espèces, la biomasse aérienne augmente tandis que la teneur en azote diminue. Ce phénomène de dilution de l'azote semble en partie lié à une remobilisation de l'azote des feuilles ombrées vers les étages apparus plus tard dans le cycle tandis que la plante continue sa croissance. D'autre part, au cours du cycle, la proportion des tissus métaboliques riches en azote tels que les feuilles, a tendance à diminuer par rapport aux tissus de soutien tels que les tiges. Chez le pois la teneur en azote augmente en tout début de cycle, jusqu'à ce que la biomasse aérienne atteigne une biomasse de  $1 \text{ t ha}^{-1}$ , puis diminue jusqu'à l'apparition des gousses. La teneur en azote reste constante en fin de cycle du fait d'une compensation entre la diminution de la teneur en azote dans les organes végétatifs et l'accumulation d'azote dans les organes reproducteurs (Vocanson et al., 2005).

De cette relation a été définie une courbe critique de dilution de l'azote par rapport à la biomasse, à partir de la réponse de la croissance aérienne à différents niveaux de fertilisation (Figure 2). La teneur en azote critique correspond à la teneur azotée au-dessus de laquelle une augmentation de la fertilisation azotée n'engendre pas d'augmentation de la biomasse (Justes et al., 1994). Cette courbe permet de faire un diagnostic de la nutrition azotée pour une biomasse donnée en calculant l'indice de nutrition azotée (INN), comme étant le rapport entre la teneur en azote mesurée et la teneur en azote critique. Une plante avec une valeur d'INN proche de 1 présente une nutrition azotée optimale. Au contraire, en dessous de la courbe critique de dilution ( $\text{INN} < 1$ ) la plante présente une carence azotée (Figure 2, courbes verte et bleue).



**Figure 2 :** Teneur en azote en fonction de la biomasse accumulée dans les parties aériennes. Les courbes bleue, verte, jaune et rouge représentent les courbes de dilution de l'azote mesurées pour 4 niveaux de fertilisation azotée croissants (N1, N2, N3, N4 respectivement). La courbe noire correspond à la courbe de dilution de l'azote critique déduite à partir des points de mesures à différentes dates pour les 4 niveaux de fertilisation.

### 3.2.2. Régulation du prélèvement d'azote par le statut azoté de la plante

Il existe des mécanismes de régulation du prélèvement d'azote chez les légumineuses, permettant d'assurer une nutrition azotée optimale pour la croissance (INN proche de 1).

**En l'absence d'azote minéral dans le sol,** les légumineuses ajustent la fixation symbiotique aux besoins azotés en augmentant la taille des nodosités existantes puis en mettant en place de nouvelles nodosités plus tardivement. L'activité fixatrice des nodosités existantes n'est par contre pas augmentée, celle-ci étant déjà maximale (voir paragraphe 2.4).

**En présence d'azote minéral,** son prélèvement est également régulé par rapport à la croissance. Sur des plantes de *M. truncatula* dont l'ensemble du système racinaire était initialement en contact avec de l'azote nitrique, des essais en split-root ont été réalisés. Ces essais ont permis de mettre en évidence une réponse systémique d'ajustement du prélèvement d'azote lors d'une limitation locale en azote nitrique (Jeudy et al., 2010). Afin de compenser le déficit en azote nitrique, la plante met en place une réponse adaptative rapide en augmentant le taux de prélèvement d'azote minéral par unité de biomasse racinaire des racines non privées d'azote (Ruffel et al., 2008). Sur le plus long terme, les racines non soumises au déficit azoté présentaient une plus grande biomasse par rapport aux racines des plantes témoins. Ces résultats sont concordants avec les nombreux travaux ayant mis en évidence une prolifération des racines en présence d'une forte concentration locale en azote minéral (Kraiser et al., 2011; Ruffel et al., 2011). La plante exploite prioritairement les zones avec de plus fortes

concentrations en azote minéral et investit le minimum d'énergie au niveau des racines soumises à de plus faibles concentrations. Ces mécanismes adaptatifs n'engendrent pas de différence de biomasse et de teneur en azote par rapport à une plante dont l'ensemble du système racinaire est en contact avec de l'azote nitrique (plante témoin), permettant le maintien d'une nutrition azotée optimale.

Au contraire, en présence d'une forte concentration locale en azote minéral dans le sol, le prélèvement d'azote est réduit. Des molécules azotées produites par les parties aériennes, agissent en rétro-inhibition sur le prélèvement d'azote par les racines et les nodosités, ont été mises en évidence (Muller and Touraine, 1992; Neo and Layzell, 1997; Sulieman et al., 2010). Malgré une régulation du prélèvement d'azote par le statut azoté des plantes il est possible de mesurer des valeurs d'INN supérieures à 1 (Figure 2, courbes jaune et rouge) chez les céréales mais aussi chez les légumineuses (Vocanson et al., 2005). En présence de forts niveaux en azote minéral dans le sol, les cultures sont capables de prélever plus d'azote que les quantités définies par la simple demande. Il s'agit d'une consommation de luxe, c'est à dire une augmentation de la teneur en azote qui ne s'accompagne pas d'une augmentation de la biomasse. Lorsque la valeur d'INN est supérieure à 1, la modulation de l'absorption d'azote dépend à la fois de la croissance de la plante, et donc des besoins azotés associés, mais aussi de la disponibilité en azote minéral en termes de quantités et de distribution dans le profil de sol (Devienne-Barret et al., 2000).

### 3.3. Capacité de la fixation symbiotique à répondre aux besoins azotés des légumineuses

Malgré la complémentarité entre les deux sources azotées et l'existence de mécanismes de régulation du prélèvement de l'azote, il est possible d'observer des carences azotées qui ont des répercussions sur la croissance des légumineuses (Voisin and Gastal, 2015). Une carence azotée peut en effet engendrer une réduction importante de biomasse. Il est donc intéressant de déterminer si la croissance des légumineuses varie selon l'origine de l'azote (atmosphérique ou minéral) et s'il existe des différences entre les espèces de légumineuses.

#### 3.3.1. Effet du niveau de fertilisation azotée sur la croissance aérienne des légumineuses

De nombreuses études menées au champ ont montré que des légumineuses cultivées en absence de fertilisation azotée présentaient des développements aériens similaires à des plantes fertilisées. Voisin et al. (2002a) ont mesuré au champ chez le pois à maturité des biomasses et des teneurs en azote dans les parties aériennes très proches des plantes fertilisées avec 0, 100, 200 ou 400 kg N ha<sup>-1</sup>. Une méta-analyse regroupant 67 études menées entre 1966 et 2006 sur le soja montre que la fertilisation azotée engendre une augmentation de rendement dans seulement 20 % des cas. En moyenne l'augmentation de rendement est de 0,5 t ha<sup>-1</sup> et l'ampleur de la réponse ne diffère pas significativement entre les

différentes catégories de fertilisation azotée (Salvagiotti et al., 2008). En d'autres termes, dans les cas où la fertilisation azotée engendre une réponse positive sur le rendement, les faibles doses de fertilisation ont le même effet que les plus fortes doses notamment lorsqu'elles sont appliquées après l'initiation des premières gousses (qui correspond au pic de demande azotée du soja). Par ailleurs, aucune différence de biomasse ou de quantité d'azote dans les parties aériennes selon le niveau de fertilisation azotée n'a été mise en évidence sur la féverole (Hardarson et al., 1991; Li et al., 2009) ou le lupin (Evans et al., 1987a). De même, sur le pois chiche aucune différence de rendement n'a été observée lorsque 0, 50 et 100 kg N ha<sup>-1</sup> ont été apportés 6 semaines avant le semis (Turpin et al., 2002). Dans ces situations, la fixation symbiotique satisfait la demande en azote des légumineuses pour la croissance.

Cependant dans certains cas, la fixation symbiotique ne permet pas de répondre entièrement aux besoins azotés des légumineuses. Le haricot est par exemple une culture qui réagit très fortement à la fertilisation azotée. L'apport de 150 kg N ha<sup>-1</sup> au champ peut entraîner une augmentation de la quantité d'azote dans les parties aériennes et de rendement de 200 et 100 %, respectivement (Herridge and Redden, 2000). Il est d'ailleurs souvent recommandé de fertiliser le haricot en début de cycle. De même, dans des essais en serre, des plantes de *Medicago truncatula* non fertilisées et prélevées 1000 degré-jours après le semis ont une quantité d'azote dans la plante entière au moins 10 fois plus faible que des plantes fertilisées avec une solution azotée de 10 mmol L<sup>-1</sup>. Les plantes reposant seulement sur la fixation symbiotique présentent une valeur d'INN très largement inférieure à 1 (Moreau et al., 2008). D'autre part, pour des plantes de pois conduites en pot, une légère fertilisation azotée lors du remplissage des graines augmente de 30 % le rendement en graines, la biomasse et la quantité d'azote des parties aériennes par rapport à des plantes témoins non fertilisées (Jensen, 1986). Dans cet essai les plantes de pois témoins étaient conduites en l'absence totale d'azote minéral et reposaient entièrement sur la fixation symbiotique et avaient probablement subi une carence azotée en début de cycle lors de la mise en place de la fixation symbiotique.

En l'état actuel des connaissances, très peu de références sont disponibles sur plusieurs autres espèces de légumineuses à graines. D'autre part, il est assez difficile de comparer les différentes espèces de légumineuses quant à l'effet du niveau de fertilisation sur leur croissance. En effet, les essais ont été menés dans des conditions pédoclimatiques contrastées. Les légumineuses peuvent aussi avoir subi des stress abiotiques et biotiques variables dans les différents essais. L'ensemble de ces facteurs peuvent potentiellement limiter la fixation symbiotique, et donc une croissance optimale des légumineuses non fertilisées.

### 3.3.2. La fixation symbiotique permet-elle toujours de répondre aux besoins azotés des légumineuses en conditions non fertilisées ?

#### Les facteurs biotiques influençant directement la fixation symbiotique

La fixation symbiotique repose sur **une symbiose entre la légumineuse et une bactérie du genre *Rhizobium***, avec une spécificité d'hôte plus ou moins importante. Dans les sols agricoles français, les souches de rhizobium, capables d'établir une symbiose avec les légumineuses de climats tempérés, sont très souvent présentes. En général, la culture de ces légumineuses ne nécessite donc pas d'inoculation. Par contre, pour les espèces d'origine tropicale comme le soja, l'inoculation est nécessaire au moment du semis si la culture est implantée sur la parcelle pour la première fois. De plus, l'efficacité de la fixation symbiotique peut varier selon la souche de rhizobium et le génotype de la légumineuse. Une étude menée sur du pois inoculé avec six souches de rhizobium a pu mettre en évidence de très grandes différences d'efficacité de fixation ; les rapports de quantités d'azote accumulées dans les parties aériennes par unité de biomasse nodulaire variant d'un facteur 20 selon la souche bactérienne (Laguerre et al., 2007). Par ailleurs, chez le haricot, les faibles rendements mesurés en l'absence d'azote minéral peuvent en partie être expliqués par les conditions de sélection variétale. Ainsi, le haricot semble avoir été essentiellement sélectionné comme une culture légumière en condition non limitante en azote dans lesquelles la fixation symbiotique est devenue superflue (Herridge and Redden, 2000). Les génotypes de haricot n'ont donc pas été sélectionnés pour leur faculté à mettre en place une symbiose avec des bactéries fixatrices.

Même en présence de *Rhizobium* dans le sol certains facteurs biotiques et abiotiques peuvent affecter directement la fixation symbiotique. Les quantités d'azote fixées sont fortement réduites lors d'un stress hydrique (Streeter, 2003), avec un effet direct du manque d'eau sur l'activité des nodosités. Les nodosités sont généralement mises en place sur les 20 à 30 premiers centimètres du système racinaire et cette localisation superficielle rend le système nodulaire d'autant plus sensible aux stress hydriques. Un excès d'eau risque aussi d'affecter l'activité fixatrice en soumettant les nodosités à des conditions d'anaérobiose qui limitent fortement l'activité des bactéries symbiotiques. Chaudhary et al. (2008) ont par ailleurs mis en évidence une diminution de la biomasse nodulaire ainsi que de l'activité fixatrice chez le soja et le haricot mungo lors d'une limitation en phosphore, indispensable au fonctionnement des nodosités. Enfin, la plupart des légumineuses requiert un pH du sol neutre ou légèrement acide pour assurer la nodulation et la fixation symbiotique (Bordeleau and Prévost, 1994) et un sol très acide affecte la survie des bactéries symbiotiques. Des facteurs biotiques peuvent également limiter de manière directe la fixation symbiotique. Les larves de sitones sont par exemple des ravageurs qui s'attaquent aux nodosités (Corre-Hellou and Crozat, 2005). Le pathogène *Aphanomyces euteiches*

entraîne une pourriture progressive du système racinaire et donc des nodosités chez certaines espèces comme le pois, la vesce commune ou la lentille (Gaulin et al., 2007).

Ainsi, des plantes soumises à des stress environnementaux qui impactent directement la fixation symbiotique, peuvent présenter des carences azotées. Dans la méta-analyse menée par Salvagiotti et al. (2008), une fertilisation azotée avait un effet positif sur le rendement du soja par rapport au contrôle non fertilisé, principalement lorsque les cultures étaient soumises à des stress biotiques et abiotiques, affectant directement la fixation symbiotique (faibles pH, sécheresses, absence de souche de *Rhizobium* efficace). Malgré la complémentarité entre les deux sources azotées, il est possible d'observer des carences azotées ( $INN < 1$ ) chez les légumineuses. Il s'agit de conditions dans lesquelles les besoins azotés de la plante ne peuvent pas être compensés par le prélèvement d'azote minéral, en cas d'absence d'azote minéral dans le sol ou quand le développement racinaire est réduit par une structure du sol dégradée ou par le développement de maladies racinaires. Cependant, dans la majorité des cas la fixation symbiotique est le facteur limitant car ce processus est souvent plus sensible aux stress biotiques et abiotiques que le prélèvement d'azote minéral (Sprent et al., 1988). D'autre part, le prélèvement d'azote minéral a principalement lieu en début de cycle lorsque les stress environnementaux sont beaucoup moins fréquents.

#### Les facteurs abiotiques et biotiques influençant indirectement la fixation symbiotique via la réduction de la croissance de la plante

L'activité spécifique des nodosités ainsi que les quantités d'azote fixées peuvent être réduites de façon indirecte via l'ajustement systémique de la fixation symbiotique à la croissance de la plante. Certaines conditions environnementales qui réduisent le développement de la plante engendrent des besoins azotés plus faibles et donc par conséquent de plus faibles quantités d'azote fixées. Il s'agit notamment de situations de fortes températures, de déficit hydrique ou encore de faible rayonnement et de gel qui affectent l'activité photosynthétique. Lorsque les facteurs environnementaux n'affectent que la croissance et non la fixation symbiotique, la plante ne présente pas de carence azotée.

#### Limitation de la fixation symbiotique relative à l'évolution des sources et des puits dans la plante

**En début de cycle**, la croissance et le développement des légumineuses reposent sur les ressources carbonées et azotées de la semence. C'est à partir de la semence que les premiers organes sont formés. En **absence d'azote minéral** dans le sol, une carence azotée peut apparaître lors du passage de la phase d'hétérotrophie (quand la plante repose sur les ressources azotées de la semence) à la phase d'autotrophie (mise en place de la fixation symbiotique). L'intensité de la carence azotée est alors variable selon la capacité de la plante à allouer rapidement les ressources carbonées pour mettre en place des nodosités. L'apparition d'une carence lors de la mise en place de la fixation peut avoir des répercussions plus tard dans le cycle, sur le statut azoté des légumineuses, si celle-ci n'est pas

compensée par la suite (Moreau et al., 2008). Certains auteurs ont mis en évidence l'effet positif sur le développement des légumineuses lorsque qu'une fertilisation azotée à faible dose est effectuée au moment du semis. C'est ce qu'on appelle l'effet « starter ». Cependant, en conditions agricoles le reliquat azoté au semis des légumineuses est souvent suffisant pour limiter la carence azotée en début de cycle (Van Kessel and Hartley, 2000).

**En fin de cycle**, l'activité fixatrice diminue fortement et est associée à une sénescence des nodosités (Voisin et al., 2002b). En effet, le nombre de nodosités atteint un maximum vers la fin de la floraison puis décroît en fin de cycle (Lawn and Brun, 1974). Cette sénescence est attribuée au vieillissement des nodosités et peut-être accélérée par une compétition pour les assimilats carbonés avec les organes reproducteurs. Lors du remplissage des graines, la proportion de carbone issu de la photosynthèse qui est allouée aux nodosités diminue fortement par rapport au stades végétatifs et floraison (Voisin et al., 2003b). Pendant la phase de remplissage des graines, la demande en azote des graines est forte et engendre souvent une sénescence des feuilles et des parties souterraines en fin de cycle. La sénescence de ces organes permet une remobilisation de l'azote vers les organes reproducteurs. Cet azote contribue jusqu'à 70 % de l'azote total des graines chez le pois. Le reste de l'azote est acquis par le système nodulaire et racinaire chez le pois (Schiltz et al., 2005). Ainsi, en l'absence d'azote minéral dans le sol et lors d'une sénescence précoce des nodosités, une réduction de rendement peut être observée par rapport à des plantes auxquelles une faible fertilisation azotée est appliquée en fin de cycle.

### 3.4. Variabilité de l'inhibition de la fixation symbiotique par l'azote minéral

#### 3.4.1. Des différences d'inhibition selon les espèces

Chez le pois, une relation linéaire décroissante a été observée entre la proportion d'azote provenant de la fixation symbiotique (% Ndfa) sur l'ensemble du cycle (mesurée à maturité) et la quantité d'azote minéral présente dans le sol au semis. Chez cette espèce, le % Ndfa est égal à 50 % lorsque 160 kg N minéral ha<sup>-1</sup> sont présents au moment du semis (Voisin et al., 2002b). Des relations similaires ont été obtenues chez le pois chiche et la féverole (Schwenke et al., 1998). Les valeurs de % Ndfa de 50 % chez le pois chiche et la féverole ont été mesurées lorsque 28 et 61 kg N minéral ha<sup>-1</sup> étaient présents dans la zone d'exploration racinaire (0-90 cm) au moment du semis. Pour le soja une relation exponentielle négative entre la quantité d'azote fixée (QNdfa) maximale mesurée à maturité et la quantité d'azote apportée par fertilisation a été déterminée (Salvagiotti et al., 2008). Du fait de cette relation, les valeurs de QNdfa maximales mesurées étaient de 337, 129 et 17 kg N ha<sup>-1</sup> lorsque respectivement 0, 100 et 300 kg N ha<sup>-1</sup> étaient apportés par fertilisation.

Il est cependant assez difficile de comparer les différentes espèces entre elles et de nombreuses références manquent pour une grande diversité de légumineuses. En effet, les pools d'azote minéral

pris en compte ne sont pas toujours les mêmes dans les différentes relations. Certaines études ont intégré les reliquats azotés au semis, la fertilisation azotée et la minéralisation du sol au cours du cycle des légumineuses (Voisin et al., 2002b). Tandis que dans d'autres études, la minéralisation du sol ou encore les reliquats azotés au semis n'ont pas toujours été mesurés (Salvagiotti et al., 2008; Schwenke et al., 1998). D'une situation à une autre le type de sol, le climat, ou bien encore le précédent cultural peuvent grandement influencer les reliquats azotés au semis des légumineuses ou encore la minéralisation de l'azote organique du sol au cours du cycle des cultures.

Malgré le fait que de nombreux essais ont été conduits dans des conditions pédoclimatiques contrastées, des différences de valeurs moyennes de % Ndfa ont été obtenues entre différentes espèces de légumineuses (Herridge et al., 2008). Certaines espèces semblent reposer en plus grande proportion sur la fixation symbiotique et présentent en moyenne des valeurs de % Ndfa assez élevées. Il s'agit par exemple de la féverole suivie par le soja, dont les valeurs de % Ndfa moyennes sont respectivement 75 et 68 %. La lentille, le pois et le pois chiche présentent des valeurs de % Ndfa moyennes intermédiaires (63 %) tandis que le haricot repose seulement à 40 % sur la fixation symbiotique. Toutefois, aucune explication n'a été donnée pour justifier ces différences entre espèces.

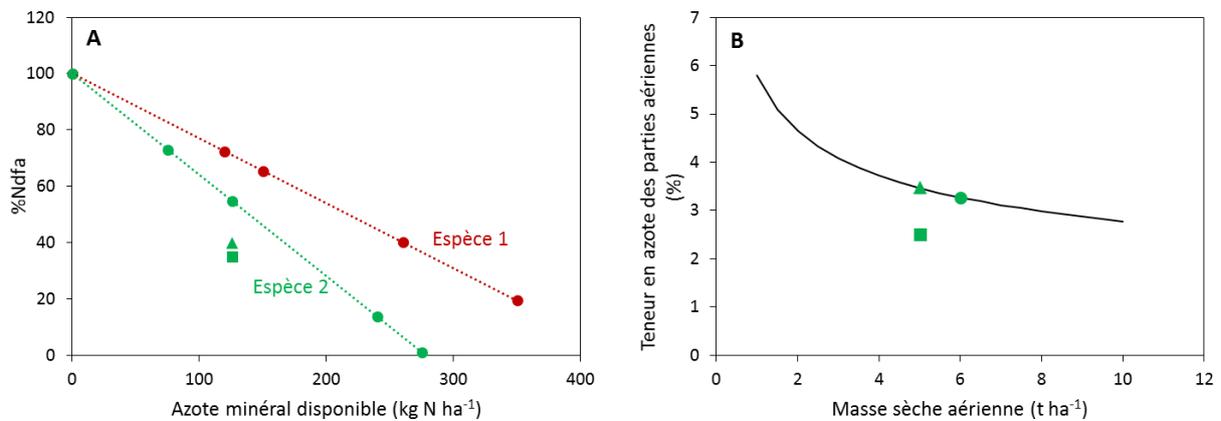
#### *3.4.2. Des différences d'inhibition selon les conditions pédoclimatiques et la croissance des légumineuses*

Les différences de fixation symbiotique entre les espèces de légumineuses pourraient en parties être expliquées par le potentiel de croissance des espèces (Figure 3A). En effet, une légumineuse avec une plus forte croissance aura tendance à fixer plus d'azote atmosphérique (Anglade et al., 2015; Peoples et al., 2001). Pour une même quantité d'azote minéral dans le sol, les espèces de légumineuses prélèveront prioritairement cet azote disponible. Par la suite, les espèces avec des besoins azotés plus grands fixent l'azote atmosphérique en quantités supérieures par rapport aux espèces avec de plus faibles besoins.

En conditions agricoles, il n'est pas rare d'obtenir des rendements inférieurs au potentiel. Certains facteurs environnementaux peuvent affecter la croissance de la plante, de manière directe (section 3.3.2) (faible rayonnement, sécheresse, maladie ou ravageurs,...). Les besoins en azote étant plus faibles, la fixation symbiotique est alors ajustée (% Ndfa réduit). Dans cette situation, l'ajustement de la fixation symbiotique est une simple conséquence de la réduction de la croissance aérienne et n'engendre à priori pas de carence azotée (INN proche de 1) (Figure 3A et B : triangle vert).

D'autres facteurs abiotiques et biotiques peuvent affecter indirectement la croissance de la plante en limitant directement la fixation symbiotique (section 3.3.2.). Dans ces situations où la fixation symbiotique est limitée, les quantités d'azote fixées ne permettent pas de combler les besoins azotés

de la plante qui subit alors une carence azotée ( $INN < 1$ ). En cas de carence azotée trop grande, la croissance de la plante est par la suite réduite et le rendement affecté. (Figure 3A et B : carré vert).



**Figure 3 : A :** Valeurs de % Ndfa selon le niveau d'azote minéral du sol disponible pour les cultures de légumineuses pour différentes conditions pédoclimatiques. L'azote minéral disponible comprend les reliquats azotés au moment du semis, la fertilisation azotée et la minéralisation de l'azote organique du sol au cours du cycle des légumineuses. Les droites rouge et verte représentent les valeurs de % Ndfa maximales pouvant être mesurées selon le niveau d'azote minéral disponible pour l'espèce 1 (rouge) et 2 (verte) respectivement. L'espèce 2 présente des besoins azotés plus faibles que l'espèce 1. **B :** Représentation du statut azoté de l'espèce 2 à partir de la courbe de dilution de l'azote, pour un niveau d'azote minéral du sol ( $125 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). ● : situation de croissance et de fixation symbiotique optimale ; ▲ : situation où la croissance est directement limitée ; ■ : situation où la croissance est indirectement limitée par limitation de la fixation symbiotique.

### 3.4.3. Des différences d'inhibition de la fixation symbiotique selon la capacité à prélever l'azote minéral du sol?

Les différences d'effet de l'azote minéral sur la fixation symbiotique entre les espèces de légumineuses sont peut-être également associées à des différences de capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol. Pour une même quantité d'azote minéral disponible dans le sol, seule une partie de cet azote est accessible pour la légumineuse et peut être prélevé par ses racines. Plusieurs observations vont en ce sens.

Une étude menée par Schwenke et al. (1998), montre que la féverole maintient une valeur de % Ndfa plus élevée que le pois chiche pour une même quantité d'azote minéral au semis. Dans ces travaux, la plus forte proportion d'azote fixée par la féverole était en partie liée à la croissance de la plante qui requérait des besoins azotés supérieurs au pois chiche. Cependant 40 % de la différence de valeurs de % Ndfa entre ces deux espèces n'était pas expliquée par les plus forts besoins en azote de la féverole. De même, dans une expérimentation en serre, une plus forte diminution de la valeur de % Ndfa selon le niveau d'azote minéral a été notée sur le haricot par rapport au soja (George and Singleton, 1992). Pourtant, le haricot présentait de plus grands besoins en azote par rapport au soja. Dans le premier

cas, les auteurs ont interprété le maintien de la fixation symbiotique par la féverole comme une plus forte tolérance de la symbiose à l'azote minéral. Cependant, dans une autre étude menée au champ, Turpin et al. (2002) ont pu mettre en évidence de plus faibles prélèvements d'azote minéral par la féverole en comparaison au pois chiche, notamment en début de cycle. Les différences de fixation symbiotique entre la féverole et le pois chiche pourraient ainsi être associées à des différences de prélèvement d'azote minéral par les racines. De même, dans des expérimentations menées au champ, l'efficacité d'utilisation du fertilisant azoté par le haricot était deux fois plus importante que le soja à floraison. De plus, le haricot présentait une plus forte capacité de prélèvement d'azote minéral par unité de biomasse racinaire (George and Singleton, 1992). Les différences de fixation symbiotique entre le haricot et le soja pourraient également être associées à des différences d'absorption d'azote minéral.

Finalement, la nutrition azotée des légumineuses avec une grande capacité d'absorption d'azote minéral reposerait moins sur la fixation symbiotique par rapport à des espèces avec une moins grande efficacité de prélèvement d'azote minéral. Cependant aucune relation directe entre réponse la fixation symbiotique à l'azote minéral du sol pour différentes espèces de légumineuses et leur capacité de prélèvement d'azote minéral n'a été établie.

#### *3.4.4. Capacité de prélèvement de l'azote minéral selon l'architecture racinaire ?*

Les différences de prélèvement d'azote minéral entre les espèces de légumineuses pourraient être fonction de l'architecture racinaire qui détermine la capacité d'exploration du profil de sol et donc l'efficacité d'utilisation de l'azote minéral du sol disponible.

Les connaissances sur l'architecture racinaire des plantes sont souvent limitées par rapport aux parties aériennes, notamment du fait de la difficulté d'accessibilité du compartiment racinaire dans le sol (Zhu et al., 2011). Pourtant, une meilleure connaissance des traits racinaires favorisant l'absorption des ressources du sol pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de prélèvement des principaux nutriments par les cultures (Den Herder et al., 2010). L'azote étant un élément mobile dans le sol, la morphologie des racines a souvent été considérée comme moins importante par rapport à l'acquisition de nutriments moins mobiles. Cependant, certains traits racinaires favorisent le prélèvement de l'azote minéral notamment dans des sols assez pauvres en azote. D'autre part, la croissance racinaire et la répartition des racines dans le profil de sol peuvent limiter les pertes d'azote par lixiviation (Liao et al., 2006).

Des plantes avec une rapide capacité d'exploration racinaire du sol peuvent augmenter le volume de sol exploré et donc les quantités d'azote minéral prélevées. Une étude menée en rhizotron pendant une période de 40 jours sur neuf espèces de légumineuses a pu mettre en évidence une corrélation

positive entre les vitesses de croissance racinaire en largeur et en profondeur et les quantités d'azote minéral du sol prélevées (Dayoub et al., 2017).

La densité de longueur racinaire (Root Length Density (RLD)) peut aussi jouer un rôle dans le prélèvement d'azote minéral. Il s'agit de la longueur racinaire par unité de volume de sol, qui détermine la surface de contact entre les racines et le sol. Ainsi, des plantes avec une grande RLD ont une plus grande capacité d'acquisition de l'azote minéral (Garnett et al., 2009). Dans un essai mené au champ, des différences de RLD ont pu être observées entre trois espèces de légumineuses sur des profils racinaires réalisés à partir de carottages de sol (Liu et al., 2011a). Sur les premiers 20 cm de profondeur, le pois chiche présentait la plus faible RLD en comparaison à la lentille et au pois.

La RLD est souvent fortement corrélée au diamètre des racines. Un système racinaire avec de nombreuses racines et de petits diamètres permet d'augmenter la surface de contact avec le sol sans engendrer de coût carboné supplémentaire, par rapport à un système racinaire caractérisé par un faible nombre de racines avec de larges diamètres. Des différences de diamètre de racines ont pu être mises en évidence sur trois espèces de légumineuses cultivées dans les mêmes conditions pédoclimatiques (Benjamin and Nielsen, 2006; Liu et al., 2011a).

La colonisation du sol par les racines, aussi bien spatialement que temporellement peut donc favoriser le prélèvement d'azote minéral et ainsi limiter la lixiviation. Des simulations du système racinaire de sept génotypes de lupin associées au prélèvement d'azote minéral ont été réalisées en faisant varier la densité racinaire et la répartition des racines selon la profondeur, à volume racinaire identique (Dunbabin et al., 2003). Les diamètres et donc les surfaces de contact étaient différents entre les systèmes racinaires étudiés. Les systèmes racinaires avec une forte densité racinaire dans les horizons de surface en début de cycle, et une croissance vigoureuse en profondeur plus tard dans le cycle permettent de maximiser le prélèvement d'azote minéral dans des conditions climatiques méditerranéennes. En début de cycle un système racinaire ramifié dans les horizons plus superficiels permet l'absorption de l'azote dans la zone de minéralisation tout en limitant la lixiviation vers les horizons plus profonds. La colonisation des horizons plus profonds plus tard dans le cycle permet de maximiser l'absorption de l'azote minéral entraîné en profondeur par lixiviation.

Une meilleure connaissance des systèmes racinaires des légumineuses permettrait d'analyser si l'architecture racinaire des légumineuses peut engendrer des différences de prélèvement de l'azote minéral du sol.

En résumé, les besoins azotés des légumineuses sont assurés par une complémentarité entre la fixation symbiotique et le prélèvement d'azote minéral du sol. Cependant, dans certaines situations la fixation symbiotique est directement limitée par des facteurs biotiques et abiotiques, ou par compétition pour les ressources carbonées avec les autres organes de la plante. Dans ces situations,

les légumineuses reposant exclusivement sur la fixation symbiotique peuvent présenter des carences azotées et une croissance limitée par rapport à des légumineuses dont la nutrition azotée repose exclusivement sur le prélèvement d'azote minéral. D'autre part, il est largement démontré que la présence d'azote minéral dans le sol inhibe la fixation symbiotique. Cependant, l'intensité de la réponse de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral du sol semble varier selon les espèces de légumineuses. La croissance de la plante (qui détermine les besoins en azote de la plante) ainsi que la capacité de prélèvement d'azote minéral (qui détermine la source d'azote minéral et donc la quantité d'azote à fixer pour compléter les besoins azotés de la plante) sont deux facteurs potentiellement explicatifs des différences de réponse de la fixation symbiotique à la présence d'azote minéral. Pourtant aucune étude n'a cherché à décorrélér ces deux facteurs pour expliquer les différences d'inhibition de la fixation symbiotique pour une grande diversité de légumineuses.

## 4. Effet des précédents légumineuses sur les cultures de céréales qui suivent

Outre la capacité des légumineuses à fixer l'azote atmosphérique, leur introduction dans les successions culturales peut modifier l'état du milieu suite à leur culture et par conséquent les performances des cultures suivant les légumineuses. Ce processus est communément appelé « effet précédent » ou « arrière effet ». Fréquemment, les céréales ou oléagineux cultivés après des légumineuses présentent de plus grands rendements ou/et une meilleure qualité des produits récoltés par rapport à des céréales ou oléagineux cultivés après des céréales. L'effet positif des légumineuses sur les cultures suivantes, peut-être associé à des effets sur le milieu impliquant des facteurs endogènes ou exogènes au cycle de l'azote.

### 4.1. Augmentation des performances des céréales précédées par des légumineuses

De manière générale, les cultures ont un meilleur rendement lorsque celles-ci sont précédées d'une espèce de famille botanique différente. A partir de la synthèse de différents essais menés entre 1985 et 2005 dans différentes régions du globe, Kirkegaard et al. (2008) ont comparé la production de blé précédé d'une culture différente, par rapport à un blé cultivé après un blé. Des augmentations moyennes de rendement de 33 % en Australie du Sud, 24 % en Europe du Nord, et 14 % en Amérique du Nord ont été rapportées. Les légumineuses sont particulièrement connues pour être de bons précédents culturaux pour les céréales par rapport à des précédents céréales ou oléagineux (Preissel et al., 2015). Angus et al. (2015) ont mis en évidence une augmentation moyenne du rendement de blé précédé d'une culture de légumineuse, de colza ou d'avoine de 0,92, 0,80 et 0,53 t ha<sup>-1</sup>

respectivement, par rapport à un précédent blé. Les résultats d'une méta-analyse réalisée sur 1181 rendements de céréales en fonction du précédent cultural, cultivés dans 15 pays différents, ont aussi montré une augmentation moyenne du rendement des céréales précédées par de légumineuses par rapport à une succession céréale-céréale de 29 % contre 14 % pour un précédent colza (Cernay et al., 2017). De même, une compilation de données issues de plusieurs expérimentations menées en conditions tropicales et subtropicales a mis en avant une augmentation moyenne de 37 % du rendement du blé précédé de légumineuses (Peoples and Craswell, 1992).

Certaines études ont par ailleurs mesuré de plus grandes teneurs en azote des céréales précédées par des légumineuses par rapport à une céréale cultivée après une céréale (Biederbeck et al., 1996; Gan et al., 2003). Cet effet n'est cependant pas généralisable. En effet, Williams et al. (2014) n'ont pas mis en évidence une amélioration systématique de la teneur en protéine des céréales précédées par des légumineuses.

## 4.2. Facteurs azotés explicatifs de l'effet positif des légumineuses sur les cultures suivantes

L'effet positif des précédents légumineuses sur les performances des céréales peut notamment être expliqué par des effets azotés spécifiques aux cultures de légumineuses qui induisent de plus grandes quantités d'azote disponibles pour la culture suivante par rapport à un précédent céréale. L'azote minéral disponible pour la culture suivante découle i) de la quantité d'azote minéral non prélevée durant le cycle des légumineuses et laissée au sol après leur récolte et ii) de la quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus de culture (aériens et souterrains) des légumineuses par les microorganismes du sol. L'azote minéral du sol disponible peut être prélevé par la culture suivante ou perdu en dehors du système de culture par lixiviation, en cas de fortes précipitations couplées à une désynchronisation entre la disponibilité en azote minéral et les besoins en azote de la culture suivante.

### 4.2.1. Reliquats azotés supérieurs après les cultures de légumineuses

Après la récolte des légumineuses, les reliquats azotés sont fréquemment supérieurs à ceux mesurés après des cultures de céréales. Plusieurs études ont mis en évidence des concentrations en azote minéral du sol plus importantes après la récolte du pois, pois chiche et du lupin par rapport à du blé ou de l'orge (Evans et al., 1987b; Herridge et al., 1995; Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003). Angus et al. (2015) ont par ailleurs établi, à partir de plusieurs essais expérimentaux australiens, une relation positive entre les reliquats azotés post-récolte de différents précédents culturaux et le rendement du blé mesuré l'année suivante. Les légumineuses présentaient systématiquement des reliquats azotés post-récolte supérieurs aux cultures de céréales et d'oléagineux. Les légumineuses sont souvent caractérisées par un système racinaire relativement superficiel par rapport aux céréales, pouvant

limiter le prélèvement d'azote minéral dans les horizons profonds du sol durant leur cycle (Hauggaard-Nielsen et al., 2001; Jensen et al., 2010).

#### *4.2.2. Quantités d'azote laissées par les résidus des précédents culturaux*

La quantité d'azote contenue dans les résidus aériens (paille et cosses) et souterrains (racines, nodosités et rhizodéposition) des légumineuses à graines est un premier indicateur de l'azote potentiellement disponible pour la culture suivante puisqu'il s'agit de la quantité d'azote maximale laissé par les résidus. Cet azote sous forme organique n'est cependant pas directement disponible pour la culture suivante.

Les quantités d'azote accumulées par les légumineuses varient grandement en fonction de l'espèce, de la biomasse, et de l'état de la nutrition azotée ; les deux derniers facteurs étant influencés par les conditions pédoclimatiques et les pratiques culturales. Sur la totalité de l'azote accumulé, seule une proportion de cet azote est laissée au sol. Le reste est exporté lors de la récolte des graines. Fréquemment, seul l'azote des résidus aériens est mesuré car il est facilement accessible.

De nombreuses études ont pourtant souligné l'importance de prendre en compte les parties souterraines afin de ne pas sous-estimer les quantités d'azote laissées par les résidus de culture (Khan et al., 2003; Peoples et al., 2001). Cependant, la mesure des quantités d'azote contenues dans les racines et exsudées par la rhizodéposition au cours du cycle de la culture est délicate, notamment au champ (Fustec et al., 2010; Zhu et al., 2011). De plus, les valeurs varient grandement entre les études, reflétant des différences entre espèces et conditions pédoclimatiques, mais elles sont aussi partiellement liées à des biais techniques. En effet, il est difficile de récupérer l'ensemble du système racinaire surtout en profondeur car une partie des racines sont trop fines pour être collectées manuellement. D'autre part, la quantification de la rhizodéposition est d'autant plus complexe que les composés ne sont pas contenus dans une structure bien définie mais sont exsudés dans le sol. Leur quantification fait appel à des techniques de marquage isotopique. Anglade et al. (2015) ont synthétisé des études ayant estimé la proportion d'azote dans les parties souterraines par rapport à l'azote total de la plante chez plusieurs espèces de légumineuses. Pour la féverole, les valeurs étaient comprises entre 24 % (Khan et al., 2003) (Rochester et al., 1998) et 41 % (Khan et al., 2003) dans des essais conduits au champ avec une valeur moyenne de 31 %. Pour le pois, les valeurs étaient comprises entre 30 % (Mahieu et al., 2007) et 39 % (Wichern et al., 2007) dans des essais conduits au champ avec une valeur moyenne de 35 %. Pour le pois chiche (Khan et al., 2003) et le soja (Rochester et al., 1998), respectivement 77 et 38 % de l'azote total a été mesuré dans les parties souterraines. Chez le lupin, la lentille et la vesce commune seules les quantités d'azote dans les parties racinaires ont été mesurées en pot à mi-floraison, sans prendre en compte la rhizodéposition. Dans ce cas, l'azote des racines représentait respectivement 42, 36 et 32 % de l'azote total de la plante (Unkovich and Pate, 2000).

Dans l'ensemble de ces études il s'agit de mesures ponctuelles, rendant difficile l'intégration de ces mesures dans le temps. La biomasse racinaire varie pourtant selon le stade physiologique de la plante et de nombreuses questions persistent quant à la dynamique de la rhizodéposition.

Compte tenu de la variabilité des valeurs selon la méthode de mesure et du manque de données pour un grand nombre d'espèces de légumineuses, des valeurs moyennes de proportion d'azote dans les parties souterraines ont été proposées. Afin de tenir compte de l'azote dans les parties souterraines, Herridge et al. (2008) ont suggéré de multiplier la quantité d'azote des parties aériennes par un facteur multiplicateur de 2 pour le pois chiche (en considérant ainsi que 50 % de l'azote total se situe dans les parties souterraines), 1,5 pour le soja (33 % de l'azote total) et 1,4 pour les autres espèces de légumineuses à graines (30 % de l'azote total). Cette dernière valeur est proche du facteur multiplicateur de 1,3 proposé par Anglade et al. (2015) pour le pois, la féverole et la lentille. Peoples et al. (2001) ont utilisé un même coefficient multiplicateur de 1,5 pour l'ensemble des légumineuses à graines.

Peu de données sont actuellement disponibles sur les quantités d'azote contenues dans les parties racinaires des légumineuses et de nombreuses questions persistent quant aux différences entre espèces de légumineuses.

#### *4.2.3. Proportion d'azote des résidus de culture minéralisé suite à leur incorporation dans le sol*

L'azote apporté au sol par les résidus de culture est sous forme organique. Seule une partie de cet azote est rendu disponible pour la culture suivante suite au processus de minéralisation. La minéralisation correspond à la dégradation des résidus de culture par les microorganismes du sol. Une part de l'azote issu de la minéralisation des résidus est assimilée par la flore microbienne (organisation) afin de couvrir ses besoins azotés. Le reste de l'azote est laissé dans le sol (minéralisation) et contribue à augmenter le pool d'azote minéral du sol.

En utilisant la méthode de litter bag, qui consiste à enfouir dans le sol des sachets en tissu contenant des résidus de culture, Lupwayi et al. (2006) ont mesuré des proportions d'azote minéralisé par les résidus aériens de pois comprises entre 23 et 30 % après 52 semaines. Les quantités d'azote minéralisées correspondantes étaient comprises entre 4 et 18 kg N ha<sup>-1</sup> selon la quantité d'azote initialement contenue dans les résidus de pois. Dans cette même étude, 22 % de l'azote des résidus aériens du blé était minéralisé, correspondant à 2 kg N ha<sup>-1</sup> du fait de la faible quantité d'azote initialement contenue dans les résidus de blé. Lupwayi and Soon (2009) ont mesuré des proportions de minéralisation azotée légèrement plus faibles pour le pois (entre 19 et 24 %). Pour le lupin préalablement marqué au <sup>15</sup>N, entre 9 et 34 % de l'azote des tiges était minéralisé 10 mois après avoir été incorporées dans le sol et entre 19 et 49 % de l'azote des résidus de feuilles était minéralisé après cette même période (Russell and Fillery, 1999). Dans une autre étude, 27 % de l'azote des résidus

racinaires du lupin était minéralisé (Russell and Fillery, 1996). Certaines études ont par ailleurs mis en évidence une plus grande proportion d'azote minéralisé par les feuilles par rapport aux tiges ou aux résidus racinaires, avec des différences selon le diamètre des racines (Abiven et al., 2005; Chaves et al., 2004).

Le pourcentage de minéralisation azotée des résidus de culture semble donc varier selon les espèces mais aussi selon le type de résidu. Cependant très peu de données de minéralisation azotée des résidus de culture sont disponibles pour une diversité d'espèces légumineuses, notamment pour les résidus racinaires. Une analyse plus fine de la qualité des résidus selon les espèces et le type d'organe permettrait notamment une meilleure compréhension des différences de minéralisation azotée des résidus.

#### *4.2.4. La qualité biochimique des résidus module la proportion d'azote minéralisé*

La proportion d'azote des résidus de culture minéralisés est fortement dépendante de leur composition biochimique. L'apport d'azote par minéralisation des résidus de culture est affecté par le rapport C/N, la teneur en azote, mais également par les proportions de lignine, de cellulose, et de composés solubles qui correspondent à des fractions de la biomasse plus ou moins facilement minéralisables (Fox et al., 1990; Justes et al., 2009; Trinsoutrot et al., 2000). Les résidus de culture avec un faible rapport C/N se décomposent rapidement et induisent une minéralisation nette de l'azote (Nicolardot et al., 2001). En effet, l'azote des résidus est suffisant pour combler les besoins azotés de la flore microbienne du sol. Au contraire si le rapport C/N est élevé, l'azote contenu dans les résidus n'est pas toujours suffisant pour répondre aux besoins azotés de la flore microbienne et la décomposition est plus lente. Dans ce cas, une diminution de l'azote minéral du sol est alors observée, suite au processus d'organisation nette de l'azote minéral du sol par la flore microbienne.

Le rapport C/N des organes végétatifs a tendance à augmenter avec l'âge de la plante. En fin de cycle, l'azote dans les pailles est souvent sous la forme de pools d'azote structural, suite à la remobilisation de l'azote des organes végétatifs vers les graines. Ainsi, les résidus avec des rapports C/N élevés contiennent davantage de polymères complexes (lignines, polyphénols) plus difficilement décomposables (Lupwayi et al., 2006), et induisent souvent une organisation nette de l'azote minéral du sol durant les premiers mois après leur incorporation (Jensen, 1994b). La phase d'organisation de l'azote minéral du sol est par contre très variable en durée et en intensité selon la qualité biochimique des résidus de culture et la disponibilité en azote minéral du sol. Les résidus de légumineuses à graines présentent souvent des rapports C/N inférieurs à ceux des céréales et limitent ainsi le processus d'organisation (Jensen, 1996).

#### 4.2.5. Valorisation de l'azote par la culture suivante

Le reliquat azoté à la récolte des légumineuses ainsi que l'azote issu de la minéralisation des résidus de légumineuses correspondent au bénéfice azoté maximal pour la culture suivante. En effet, dans de nombreuses situations seule une partie de l'azote issu de minéralisation des résidus est valorisée par la culture suivante. Plusieurs études, menées sur différents précédents légumineuses, ont mesuré des taux de recouvrement de l'azote total des résidus dans les parties aériennes de la culture suivante compris entre 7 et 26 % (Jensen, 1994a; Müller and Sundman, 1988; Norman et al., 1990; Russell and Fillery, 1999). D'après ces mêmes auteurs, en moyenne seul 50 à 70 % de l'azote issu de la minéralisation des résidus de légumineuses est prélevé par la culture suivante.

La différence entre la quantité d'azote des résidus minéralisée et la quantité réellement prélevée par la culture suivante, résulte souvent d'un manque de synchronisation entre la période de minéralisation des résidus et la demande en azote de la culture suivante. La synchronisation des deux processus est en partie déterminée par les conditions climatiques et les caractéristiques du sol qui influencent grandement sur la dynamique de minéralisation des résidus de culture. En effet, des températures et des humidités élevées favorisent la minéralisation des résidus de culture (Abera et al., 2012). D'autre part, le délai entre l'incorporation des résidus de légumineuses et le semis de la culture suivante peut jouer sur la synchronisation des deux processus. En cas de longue période de sol nu et de fortes précipitations, des pertes par lixiviation pendant la période automnale peuvent avoir lieu. Outre les pertes par lixiviation avant l'implantation de la culture suivante, certaines maladies racinaires ainsi qu'une faible croissance de la culture suivante en début de cycle qui peut être accentuée par des conditions environnementales défavorables à la croissance, peuvent également limiter le prélèvement d'azote par la culture suivante. Par conséquent des pertes d'azote par lixiviations peuvent également avoir lieu pendant le cycle de culture suivante.

Plusieurs études ont mis en avant des pertes azotées par lixiviation souvent plus élevées lors de l'intégration d'un plus grand nombre de cultures de légumineuses dans les successions culturales (Beaudoin et al., 2005; Plaza-Bonilla et al., 2015).

#### 4.3. Solde azoté apparent après les cultures de légumineuses

Le solde azoté apparent renseigne sur la contribution des légumineuses à l'enrichissement du pool azoté du sol par voie symbiotique. Il est calculé comme la différence entre les entrées d'azote, par la quantité d'azote fixée au cours du cycle des légumineuses, et les sorties d'azote qui correspondent à la quantité d'azote exportée par les graines à la récolte (Evans et al., 2001). Hormis les légumineuses capables de fixer l'azote atmosphériques, les autres cultures non fertilisées engendrent obligatoirement un solde azoté apparent négatif.

Le solde azoté apparent varie grandement selon les conditions climatiques et les espèces de légumineuse. Le tableau 1 synthétise le solde azoté apparent mesuré dans différents essais, sur plusieurs espèces de légumineuses. Les valeurs varient entre -68 et +266 kg N ha<sup>-1</sup> avec une valeur moyenne de 84 kg N ha<sup>-1</sup>. Dans la majorité des cas, les légumineuses contribuent à l'enrichissement du pool azoté du sol. Les soldes azotés apparents négatifs sont mesurés lorsque la nutrition azotée des légumineuses repose faiblement sur la fixation symbiotique (faible % Ndfa), tandis qu'une grande part de l'azote est exportée par les graines, comme indiqué par un grand indice de récolte azoté (NHI : rapport entre l'azote contenu dans les graines et l'azote contenu dans les parties aériennes de la plante à maturité). En d'autres termes, à quantité d'azote aérien égale, si le NHI est supérieur au % Ndfa, le solde azoté apparent est négatif. La grande variabilité des valeurs de soldes azotés apparents reflète la diversité des conditions pédoclimatiques qui influencent les entrées d'azote via la fixation symbiotique et les sorties d'azote via la répartition de l'azote entre les grains et les résidus de culture. Les quantités d'azote fixées sont notamment fortement dépendantes des quantités d'azote minéral du sol ayant un effet inhibiteur sur la fixation symbiotique. Le NHI est quant à lui modulé par les conditions environnementales qui influencent le processus d'accumulation d'azote par les graines. A partir d'une synthèse d'essais expérimentaux conduits en Australie (Evans et al., 2001) ou en Amérique du Nord (Walley et al., 2007), une relation positive entre le solde azoté apparent et la proportion d'azote issue de la fixation symbiotique a été établie. Evans et al. 2001 ont montré des soldes azotés apparents positifs lorsque que l'azote issu de la fixation symbiotique représentait au moins 43 % de l'azote total de la plante à maturité (% Ndfa = 43 %). Cette valeur est légèrement inférieure à la valeur moyenne de 48 % reportée par Walley et al. (2007). Les différences de valeurs estimées par les deux études découlent de différences de NHI, souvent plus faibles dans les essais australiens.

**Tableau 1** Synthèse des quantités d'azote des cultures, % Ndfa, NHI, quantités d'azote exportées par les graines et solde azoté apparent (QNdfa-QN graines) mesurés à la récolte pour six espèces de légumineuses étudiées dans différentes expérimentations. QN plante et QNdfa prennent en compte l'azote des parties souterraines lorsque celles-ci sont intégrées.

Espèces	QN plante (kg N ha <sup>-1</sup> )	% Ndfa	NHI (QN graines / QN aérien)	QN graines (kg N ha <sup>-1</sup> )	QNdfa-QN graines (kg N ha <sup>-1</sup> )	parties souterraines intégrées	Références
Soja	602	81	0,68	245	+243	oui	<i>a</i>
	500	87	0,55	169	+266	oui	<i>a</i>
	272 (55 - 601)	52 (0 - 98)	0,73 (0,38 - 0,97)	155 (41 - 353)	-4 (-279, +204)	oui	<i>b</i>
	219 (44 - 485)	52 (0 - 98)	0,73 (0,38 - 0,97)	155 (41 - 353)	-40 (-279, +110)	non	<i>b</i>
Pois chiche	86	51	0,5	43	+1	non	<i>c</i>
	183	51	0,5	43	+94	oui	<i>c</i>
	74	54	0,42	31	+9	non	<i>d</i>
	113	54	0,42	31	+29	oui	<i>d</i>
	89 (19 - 146)	22 (0 - 50)	0,64 (0,51 - 0,77)	46 (22 - 64)	-4 (-10, +20)	non	<i>e</i>
	252	85	0,30	79	+135	oui	<i>f</i>
Féverole	168	72	0,73	123	-2	non	<i>c</i>
	221	72	0,73	123	+36	oui	<i>c</i>
	119	74	0,51	61	+27	non	<i>d</i>
	178	74	0,51	61	+71	oui	<i>d</i>
	153	89	0,38	35	+101	oui	<i>a</i>
	136 (46 -300)	53 (40 -75)	0,45 (0,39 - 0,52)	43 (21 - 60)	+38 (+12, +82)	non	<i>e</i>
	284	88	0,45	114	+136	oui	<i>f</i>
	145	37	0,85	123	-68	non	<i>g</i>
Lupin	257	62	0,49	127	+32	oui	<i>h</i>
	597	89	0,51	305	+227	oui	<i>h</i>
	191	64	0,30	58	+64	non	<i>i</i>
	306	84	0,39	120	+138	non	<i>i</i>
	179	84	0,55	99	+51	non	<i>d</i>
	268	84	0,55	99	+126	oui	<i>d</i>
	148	35	0,78	111	-57	non	<i>g</i>
	Pois	302	84	0,26	78	+176	oui
305		79	0,45	139	+102	oui	<i>h</i>
173		89	0,77	133	+21	non	<i>d</i>
260		89	0,77	133	+98	oui	<i>d</i>
213		75	0,69	148	+12	non	<i>d</i>
320		75	0,69	148	+92	oui	<i>d</i>
104		56	0,55	57	+1	non	<i>d</i>
155		56	0,55	57	+30	oui	<i>d</i>
141		35	0,79	115	-60	non	<i>g</i>

*a* : Rochester et al. (2001), *b* : Salvagiotti et al. (2008), *c* : Khan et al. (2003), *d* : Peoples et al. (2001), *e* : Schwenke et al. (1998), *f* : Turpin et al. (2002), *g* : Williams et al. (2014), *h* : Espinoza et al. (2012), *i* : Evans et al. (1987a)

Par ailleurs, l'intégration des parties souterraines (racines et rhizodéposition) dans le calcul des quantités d'azote fixées influence positivement les valeurs de soldes azotés apparents (Tableau 1). En effet, la prise en compte des parties souterraines engendre une augmentation des quantités d'azote fixées, tandis que les quantités d'azote exportées par les graines sont inchangées. De nombreux auteurs soulignent la nécessité de prendre en compte les parties souterraines dans le calcul du solde azoté apparent afin de ne pas sous-estimer la contribution des légumineuses dans le pool azoté du sol (Evans et al., 2001; Khan et al., 2003; Peoples et al., 2001; Rochester et al., 2001; Turpin et al., 2002; Walley et al., 2007). Cependant la mesure de l'azote dans les parties souterraines est difficile. Le recours à un certain nombre d'hypothèses est alors nécessaire lorsque les quantités d'azote dans les racines ne sont pas directement mesurées. Dans un premier temps, la quantité d'azote totale est calculée en multipliant la quantité d'azote mesurée dans les parties aériennes par un facteur multiplicateur (voir section 4.2.2.). Le % Ndfa est par ailleurs supposé identique entre les parties aériennes et souterraines. Ces hypothèses peuvent en contrepartie conduire à une surestimation du solde azoté apparent. En effet, la proportion d'azote rhizodéposé qui est recyclée au cours du cycle des cultures de légumineuses est encore inconnue. D'autre part, certaines mesures de biomasses racinaires ont été effectuées au pic de la biomasse aérienne (souvent au stade de fin floraison). Or, une partie de l'azote des racines est remobilisée par les parties aériennes lors du remplissage des graines (Schiltz et al., 2005).

#### 4.4. Facteurs exogènes au cycle de l'azote explicatifs de l'effet positif des légumineuses sur les cultures suivantes

L'introduction de légumineuses peut moduler les quantités d'eau du sol disponibles pour la culture suivante. De même que pour l'azote, le système racinaire superficiel des légumineuses limite le prélèvement d'eau du sol en profondeur par rapport à des céréales. En moyenne sur des essais conduits pendant dix ans, Larney and Lindwall (1995) ont mis en évidence une plus grande quantité d'eau résiduelle après une culture de lentille en comparaison à une culture de blé ou de colza. De même, Miller et al. (2002) ont expliqué une part des meilleurs rendements du blé précédé par des légumineuses par une plus grande disponibilité en eau après des cultures de pois et de haricot par rapport à des précédents blé, notamment pour les horizons profonds du sol. Les effets sur la culture suivante sont d'autant plus importants en conditions limitantes en eau.

Outre l'augmentation de la disponibilité des ressources azotées et hydriques pour la culture suivante, les légumineuses peuvent avoir des effets indirects positifs tels que l'augmentation de l'efficacité de prélèvement de ces ressources par la culture suivante. De plus faibles concentrations d'azote minéral du sol ont été mesurées après une céréale précédée par une légumineuse par rapport à une céréale

précédée par une céréale (Jeuffroy et al., 2015). De même, en conditions sèches, Angus and Van Herwaarden (2001) ont mesuré une meilleure efficacité de prélèvement de l'eau par un blé précédé d'une « culture de rupture » en comparaison à un blé précédé d'un blé. Les causes de cette meilleure efficacité ne sont pas clairement connues mais peuvent être associées aux effets bénéfiques des successions culturales diversifiées sur la réduction d'infestation des bioagresseurs et sur les propriétés chimiques, physiques et biologiques du sol (Bennett et al., 2012; Kirkegaard et al., 2008). En effet, l'amélioration des rendements de céréale après des légumineuses est en partie associée à l'effet de diversification des systèmes de culture, non spécifique aux cultures de légumineuses. Les légumineuses peuvent avoir un rôle de « culture de rupture » dans des rotations majoritairement à base de céréales. Le terme de « culture de rupture » fait notamment référence à la rupture des cycles des pathogènes d'une culture hôte, via l'introduction d'une culture non hôte (Kirkegaard et al., 2008). Ainsi, la diversification des systèmes céréaliers par l'introduction de légumineuses peut limiter le développement de certaines maladies racinaires (Felton et al., 1998; Reckling et al., 2016) et aériennes (Stevenson and Van Kessel, 1996) des céréales. Des successions répétitives d'un même type de culture peuvent également favoriser le développement d'adventices nuisibles. Au contraire l'introduction d'espèces de diversification dont la phénologie est défavorable au développement des adventices peut constituer un levier de gestion de la flore adventice.

#### 4.5. Grande variabilité de l'effet précédent des légumineuses

L'effet des précédents légumineuses sur les céréales qui suivent sont extrêmement variables. La méta-analyse réalisée par Preissel et al. (2015) a mis en évidence des écarts de rendement de céréales entre des précédents légumineuses et céréales, compris entre +0,45 et +2,76 t ha<sup>-1</sup>. Dans cette étude les espèces de légumineuses utilisées comme précédents culturaux n'ont pas été différenciées. D'autres études ont pu mettre en évidence des différences de rendement moyen des céréales suivantes selon plusieurs précédents de légumineuses. Cernay et al. (2017) ont ainsi calculé des augmentations moyennes des rendements de céréales compris entre +21 % (Pois chiche) et + 40 % (Lupin à feuilles étroites) par rapport à un précédent céréale.

Cependant, pour une même espèce de légumineuse utilisée comme précédent cultural, l'augmentation du rendement de blé par rapport à un précédent céréale peut aussi fortement varier selon les conditions pédoclimatiques (Cernay et al., 2017; Espinoza et al., 2012; Williams et al., 2014). En effet, celles-ci peuvent moduler la biomasse totale accumulée, l'état de nutrition azotée de la culture ainsi que la répartition de l'azote entre les graines et les pailles des légumineuses. Les quantités d'azote laissées au sol par les résidus de culture sont par conséquent impactées. D'autre part, les conditions climatiques ont une conséquence directe sur les potentiels de rendement des cultures suivantes. En conditions de faibles potentiels de rendement, les précédents légumineuses peuvent

engendrer des performances de la culture suivante très similaires à celle d'un précédent céréale (Kirkegaard et al., 2008). En conditions sèches, l'apport supplémentaire d'azote par les résidus de légumineuses par rapport aux résidus de céréales n'est pas forcément valorisé par la culture suivante (Abera et al., 2012).

Par ailleurs, l'effet précédent des légumineuses est extrêmement variable selon le niveau de fertilisation appliquée sur la culture suivante. La fertilisation azotée engendre une diminution de gain de rendement des céréales précédées par des légumineuses en comparaison à des précédents céréales (Jensen et al., 2004; Preissel et al., 2015). Des relations quantitatives entre le gain de rendement de céréales selon un précédent légumineuse par rapport à un précédent céréale et le niveau de fertilisation azotée de la céréale suivante ont pu être établies (Cernay et al., 2017). Ces relations ont montré que lorsque la fertilisation azotée des cultures suivantes de céréales dépassait  $150 \text{ kg N ha}^{-1}$  l'effet des légumineuses en tant que précédent devenait négligeable.

**En résumé**, les conditions pédoclimatiques et les niveaux de fertilisation azotée apportés sur la culture suivante sont très contrastés dans les différents essais, et engendrent **une très forte variabilité de l'effet précédent des légumineuses**. La comparaison de l'effet précédent d'une diversité d'espèce de légumineuses entre essais est par conséquent complexe. L'étude d'un grand nombre d'espèces de légumineuses pour leur effet précédent dans un même lieu permet de s'affranchir de l'effet des conditions pédoclimatiques et ainsi de mieux identifier les facteurs azotés propres aux précédents culturaux à l'origine des différences d'effet précédent. En effet, les **reliquats azotés à la récolte** des légumineuses pourraient fortement varier selon la capacité des légumineuses à prélever l'azote minéral durant leur cycle. De même, les **quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus** sont fortement influencées par la quantité d'azote laissée par les résidus de légumineuses ainsi que par leurs propriétés biochimiques. Cependant, la très grande majorité des expérimentations porte sur un nombre restreint de précédents légumineuses cultivées en un même lieu (Armstrong et al., 1997; Espinoza et al., 2012; Jensen et al., 2004; Miller and Holmes, 2005; Strydhorst et al., 2008; Williams et al., 2014) et rend la comparaison entre espèces difficile.

## 5. Caractérisation d'une diversité d'espèce par leurs traits

Une caractérisation taxonomique des espèces est souvent limitée puisqu'elle ne fournit que très peu d'information sur leur fonctionnement. D'autre part, les processus engendrés par les espèces constitutives des écosystèmes agricoles sont très dépendants des conditions pédoclimatiques et des pratiques agricoles. Une **approche par les traits** est alors intéressante puisqu'elle consiste à caractériser les espèces par des « traits » relatifs à leur fonctionnement et à leur interaction avec leur environnement (Garnier and Navas, 2012; Violle et al., 2009). Suite à la définition de Violle et al. (2007)

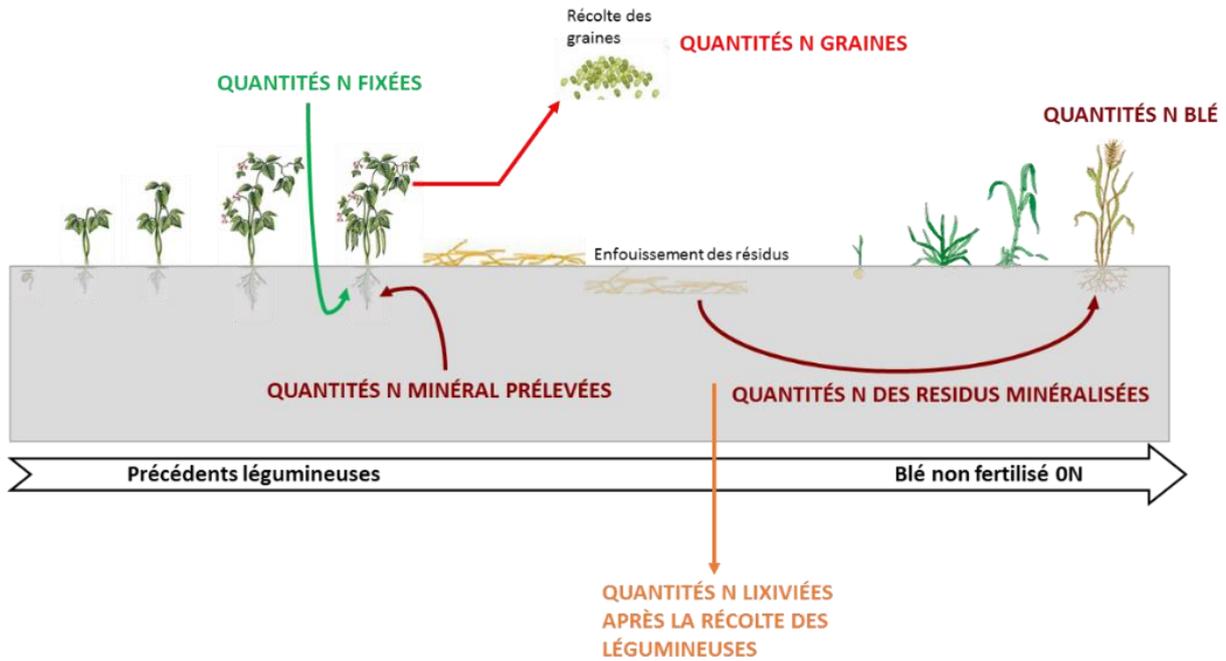
il est communément admis qu'un trait est défini comme « une caractéristique morphologique, physiologique ou phénologique mesurable à l'échelle de l'individu, de la cellule à l'organisme entier, sans référence à l'environnement ou tout autre niveau d'organisation ». Les espèces peuvent donc être caractérisées par une combinaison d'attributs de traits (valeurs prises pour chaque trait mesuré dans un environnement et à un temps donné), utilisés comme des prédicteurs du fonctionnement des espèces. Sur la base de combinaison d'attributs de traits similaires (syndrome de traits), les espèces peuvent être classées par groupe fonctionnel selon leur réponse commune à l'environnement et/ou leur effet commun sur les processus de l'écosystème (et donc leur aptitude à fournir un ou plusieurs services écosystémiques) (Lavorel and Garnier, 2002). L'approche par les traits permettant le regroupement des espèces par groupe fonctionnel est depuis longtemps utilisée en écologie comparative (de Bello et al., 2010; Lavorel et al., 2011). Récemment cette approche est de plus en plus mobilisée en agronomie afin de comparer un grand nombre d'espèces et notamment pour les caractériser selon leur aptitude à affecter des fonctions sur lesquelles reposent un certain nombre de services écosystémiques. Jusqu'à présent la majorité des études mobilisant l'approche par les traits en agronomie ont porté sur les prairies (Al Haj Khaled et al., 2006; Cruz et al., 2002; Pontes et al., 2007) et sur des plantes de service cultivées en interculture (Tribouillois et al., 2015b) ou en plante compagne (Damour et al., 2015; Lorin, 2015; Tardy et al., 2017; Tardy et al., 2015). Cette approche n'a cependant jamais été utilisée pour caractériser et comparer une diversité d'espèces utilisées comme culture de rente, telles que les légumineuses à graines pourtant susceptibles de délivrer des services écosystémiques.

## Questions de recherche et démarche

## 1. Objectifs et questions de recherche

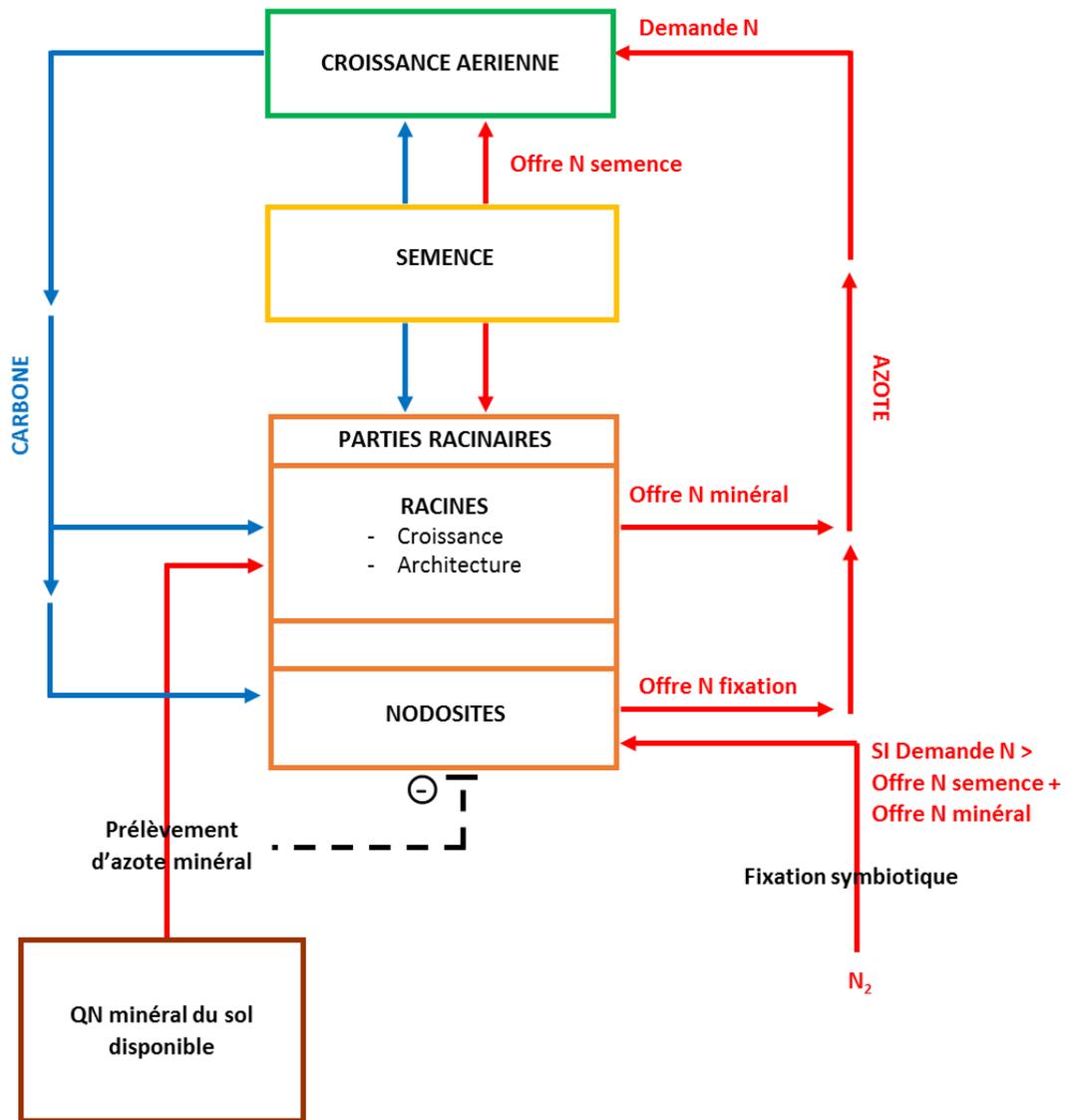
Face à la nécessité de reconcevoir des systèmes de culture plus respectueux de l'environnement en limitant le recours aux intrants de synthèse, les légumineuses à graines ont un rôle majeur à jouer grâce à leur capacité à fournir un certain nombre de services écosystémiques, notamment associés à l'azote. Plusieurs études antérieures ont mis en avant leurs intérêts dans le cycle de l'azote. Leur culture réduit le recours aux fertilisants azotés pendant et après leur culture par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique et par la minéralisation de leurs résidus de culture riches en azote, source d'azote aux cultures suivantes. Cependant, la fixation symbiotique et l'effet précédent des légumineuses sont des processus extrêmement variables d'une situation à une autre. De plus, très peu d'études ont caractérisé une diversité d'espèce de légumineuses à graines, notamment dans les conditions pédoclimatiques européennes pour lesquelles les recherches ont été largement focalisées sur le pois. Chercher à diversifier les systèmes de cultures nécessite une meilleure compréhension des déterminants des flux azotés, et de leur variabilité selon les espèces de légumineuses et les conditions climatiques, afin d'assurer une gestion optimale de l'azote au sein des systèmes de culture intégrant des légumineuses. Dans le cadre de cette thèse nos objectifs consistent à :

- i) quantifier les flux d'azote induits par dix espèces de légumineuses à graines lors d'une succession culturale de deux ans (légumineuses – blé), à l'origine de services écosystémiques ou d'impacts négatifs (Figure. 4).
- ii) identifier les caractéristiques des plantes (traits) explicatives des différences entre espèces en termes de flux azotés engendrés.
- iii) établir le profil fonctionnel des dix espèces de légumineuses à graines.
- iv) aider à la valorisation des services écosystémiques relatifs à l'azote fournis par les légumineuses en identifiant l'effet des conditions climatiques et les leviers agronomiques modulant leur valorisation.



**Figure 4** : Représentation des différents flux azotés étudiés lors de la succession culturale légumineuse - blé.

**Durant le cycle des légumineuses**, la nutrition des légumineuses repose à la fois sur le prélèvement d'azote minéral du sol par les racines et sur la fixation symbiotique, lorsque l'azote minéral du sol n'est plus suffisant pour répondre aux besoins azotés des légumineuses (Figure 5). Le prélèvement d'azote par les parties souterraines (racines et nodosités) assure les besoins azotés des parties aériennes. En contrepartie, la fourniture de carbone issu de la photosynthèse par les parties aériennes assure la mise en place et le fonctionnement des parties souterraines (Figure 5). En condition de faible disponibilité ou en l'absence d'azote minéral dans le milieu, la mise en place des nodosités peut se faire au détriment de la croissance des parties aériennes, en cas de désynchronisation entre l'offre d'azote par la fixation symbiotique et les besoins en azote pour la croissance aérienne de la plante. Une carence azotée temporaire en début de cycle, associée à la mise en place de la fixation symbiotique, peut avoir des répercussions sur la croissance aérienne plus tard dans le cycle. Cet effet a plusieurs fois été observé pour Médicago (Moreau et al., 2008) et le pois (Voisin et al., 2003).



**Figure 5 :** Fonctionnement de la nutrition azotée des légumineuses.

Ainsi la première question de thèse est la suivante :

**QUESTION 1 :** La fixation symbiotique permet-elle de répondre aux besoins azotés de toutes les espèces de légumineuses en comparaison à une nutrition azotée reposant sur le prélèvement d'azote minéral ?

Hypothèse 1 : En condition au champ, la fixation symbiotique permet de subvenir aux besoins azotés des différentes espèces de légumineuses, grâce à la présence d'un reliquat d'azote minéral au moment du semis des légumineuses assurant la mise en place de la fixation symbiotique sans carence azotée en début de cycle.

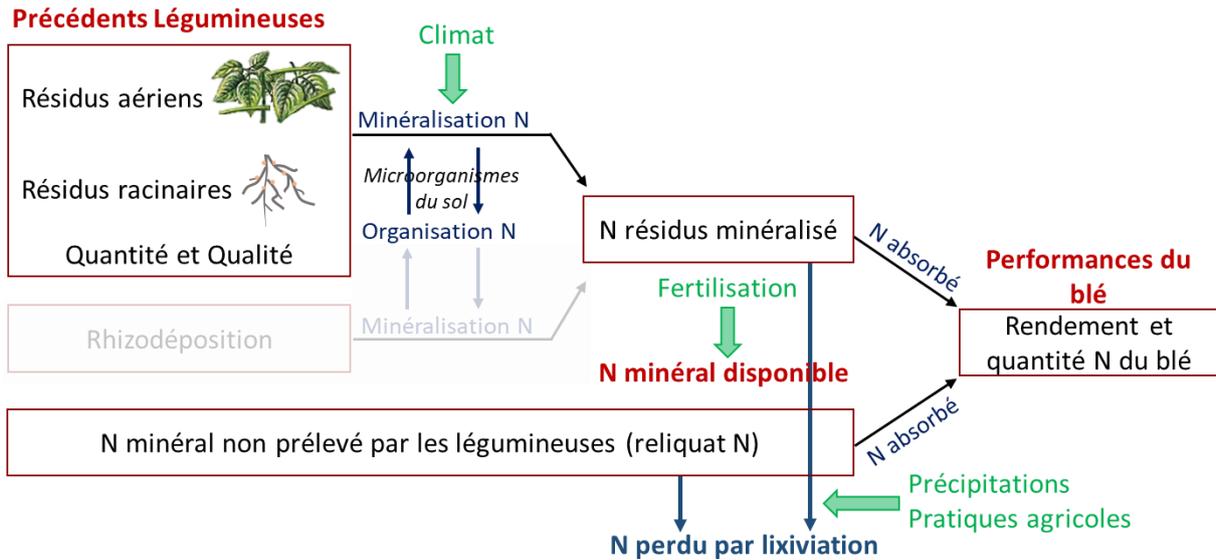
Un grand nombre d'études ont mis en évidence la **diminution de la fixation symbiotique en présence d'azote minéral dans le sol**. Cependant la réponse de la fixation symbiotique à la présence d'azote minéral peut varier entre les espèces de légumineuses selon deux facteurs majeurs que sont (i) les besoins en azote de la plante qui déterminent la taille du « puits » en azote et ii) l'efficacité de prélèvement de l'azote minéral disponible dans le sol, qui module la taille du pool d'azote minéral directement disponible pour la plante (en tant que source d'azote), et par conséquent la quantité d'azote restant à fixer pour satisfaire les besoins en azote de la plante. Ainsi la deuxième question de thèse est la suivante :

**QUESTION 2 : Existe-t-il des différences de réponse de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral dans le sol, pour une diversité d'espèces de légumineuses et quels en sont les facteurs explicatifs ?**

Hypothèse 2 : La croissance de la plante varie entre les espèces de légumineuses et engendre des besoins azotés différents selon les espèces.

Hypothèse 3 : Des différences en termes d'architecture racinaire entre les espèces de légumineuses peuvent être à l'origine de différence d'efficacité de prélèvement de l'azote minéral du sol.

Une fois les graines des légumineuses récoltées, l'azote minéral laissé au sol à la récolte des légumineuses ou issu de la minéralisation des résidus de légumineuses enfouis dans le sol rend potentiellement disponible de l'azote minéral pour la culture suivante. Cet azote peut soit être valorisé par la culture suivante, soit être perdu par lixiviation en cas de désynchronisation entre la disponibilité en azote minéral et la demande en azote de la culture suivante (Figure 6). Différentes questions de recherche relatives à l'effet précédent azoté des légumineuses peuvent être formulées :



**Figure 6 :** Processus azotés à l'origine de l'effet précédent azoté des légumineuses sur la culture suivante. Dans le cadre de cette thèse la rhizodéposition n'a pas été mesurée.

**QUESTION 3 :** Les différentes espèces de légumineuses engendrent-elles les mêmes effets positifs sur le du blé suivant?

Hypothèse 4 : Les différences de minéralisation des résidus aériens et racinaires de légumineuses selon leurs caractéristiques biochimiques ainsi les différences de reliquats azotés à la récolte des légumineuses selon la capacité de prélèvement de l'azote minérale des légumineuses modulent les quantités d'azote dans le blé suivant.

**QUESTION 4 :** Est-ce que l'ensemble de l'azote fourni par les précédents légumineuses est valorisé par le blé suivant?

Hypothèse 5 : Une part de l'azote minéral du sol est perdue par lixiviation pendant l'interculture. La quantité d'azote lixiviée varie selon les espèces de légumineuses en fonction de la quantité d'azote minéral laissée dans le sol après leur récolte et selon leur date de récolte, qui définit la durée de l'interculture.

La caractérisation des espèces selon la valeur de leurs traits préalablement identifiés comme déterminants dans l'obtention des flux d'azote, permettrait de dresser un profil fonctionnel des espèces (caractérisation des espèces selon les fonctions qu'elles induisent) et d'identifier les synergies ou antagonismes entre les flux azotés et les services écosystémiques fournis.

**QUESTION 5 : Peut-on identifier différents profils fonctionnels associés aux flux d'azote entre les espèces de légumineuses à graines?**

Hypothèse 6 : Les espèces de légumineuses sont caractérisées par différentes combinaisons de valeurs de traits, à l'origine de différents profils fonctionnels entre les espèces.

Hypothèse 7 : L'établissement du profil fonctionnel de chaque espèce de légumineuse peut apporter une aide pour le choix des espèces selon les services écosystémiques recherchés dans un environnement donné.

## 2. Démarche expérimentale adoptée

### 2.1 Choix des espèces de légumineuses

Dans le cadre de cette étude, **dix espèces de légumineuses à graines** ont été sélectionnées. Dans un premier temps, le choix des espèces s'est fait de manière à intégrer les espèces les plus cultivées en France. Ainsi, **le pois, la féverole et le soja** qui représentent les plus grandes surfaces en France ont été choisis (Tableau 2). Quatre autres espèces de légumineuses à graines également cultivées en France mais avec des surfaces bien plus faibles et souvent destinées à des marchés de niche, ont aussi été sélectionnées : **lentille, lupin, pois chiche, et haricot sec** (Tableau 2). Afin de compléter le panel d'espèces, **la vesce commune, la vesce de Narbonne, et le fenugrec** ont été retenus. Ces trois dernières espèces sont essentiellement utilisées en France comme plantes de couvert ou comme cultures fourragères pour les ruminants mais peuvent aussi être cultivées pour leurs graines à destination de l'alimentation animale ou humaine (utilisation des graines de fenugrec pour la fabrication d'épices).

Ces dix espèces présentaient des caractéristiques morphologiques aériennes et racinaires à priori contrastées. A partir des connaissances d'experts ou de synthèses bibliographiques basées sur une ou plusieurs de ces espèces, une classification qualitative sur différents critères a pu être établie (Tableau 2). Pour des raisons techniques une seule variété par espèce a été retenue en faisant l'hypothèse que la variabilité interspécifique est plus grande que la variabilité intraspécifique. Parmi les variétés disponibles dans le catalogue du GEVES (2017), parfois en très faible nombre pour certaines espèces, la variété la plus cultivée en France et/ou adaptée aux conditions climatiques de Bourgogne a été sélectionnée (Tableau 2).

**Tableau 2** Production, surface cultivée et caractéristiques des espèces de légumineuses à graines sélectionnées dans le cadre de la thèse.

	Pois	Féverole	Soja	Lupin	Lentille	Haricot commun	Pois chiche	Fenugrec	Vesce commune	Vesce de Narbonne
<b>Surface en France (ha)</b>	216 000 <sup>(1)</sup>	77 000 <sup>(1)</sup>	141 000 <sup>(1)</sup>	5 000 <sup>(1)</sup>	18 000 <sup>(2)</sup>	4 000 <sup>(2)</sup>	9 000 <sup>(3)</sup>			
<b>Production française (t)</b>	771 000 <sup>(1)</sup>	199 000 <sup>(1)</sup>	415 000 <sup>(1)</sup>	13 000 <sup>(1)</sup>	24 000 <sup>(2)</sup>	14 000 <sup>(2)</sup>				
<b>Rendement moyen en 2014 en France (q ha<sup>-1</sup>)</b>	37 <sup>(2)</sup>	37 <sup>(2)</sup>	30 <sup>(1)</sup>	29 <sup>(2)</sup>	14 <sup>(2)</sup>	25 <sup>(2)</sup>				
<b>Surface en Bourgogne (ha)</b>	19 000 <sup>(1)</sup>	3 000 <sup>(1)</sup>	32 000 <sup>(1)</sup>	100 <sup>(1)</sup>						
<b>Production bourguignonne (t)</b>	69 000 <sup>(1)</sup>	6 500 <sup>(1)</sup>	96 000 <sup>(1)</sup>	300 <sup>(1)</sup>	1 500 <sup>(3)</sup>		750 <sup>(3)</sup>			
<b>Type de germination</b>	hypogée	hypogée	épigée	épigée	hypogée	épigée	hypogée	épigée	hypogée	hypogée
<b>Port aérien</b>	buissonnant	érigé	érigé	érigé	buissonnant	érigé	érigé	érigé	rampant	érigé
<b>Fixation symbiotique (% Ndfa) <sup>(4)</sup></b>	+	++	+	++	+	-	+			
<b>Diamètres pivots</b>	+	++	+	++	-	+	+			
<b>Température de base (°C)</b>	1,1 <sup>(6)</sup>	0 <sup>(6)</sup>	5,8 <sup>(7)</sup>	3 <sup>(8)</sup>	0,2 <sup>(9)</sup>	8,5 <sup>(10)</sup>	0 <sup>(9)</sup>	4,2 <sup>(6)</sup>	4,1 <sup>(6)</sup>	
<b>Période de semis en Bourgogne</b>	octobre/mars	octobre/mars	mai	octobre/mars	mars	mai	mars/avril	mars/mai	mars	mai
<b>Production de biomasse</b>	+	++	+	+	-	-	+	-	-	-
<b>Nombre de variétés du catalogue GEVES <sup>(5)</sup></b>	24 (hiver) 40 (ptps)	8 (hiver) 14 (ptps)	57	3 (hiver) 4 (ptps)	5	218	7	3	14	
<b>Variété choisie</b>	Kayanne (ptps)	Espresso (ptps)	Sultana (000)	Feodora (ptps)	Anicia	Flavert	Twist /Vulcano	Hanka / Fenu-fix	Candy	Clara
<b>Poids de 1000 graines</b>	214	360	181	239	26	161	319/263	11/16	66	220
<b>Variétés parmi les plus vendue en France</b>	oui	oui	oui	oui	oui	oui				
<b>Variété adaptée au climat bourguignon</b>			oui	oui	oui		oui		oui	oui

<sup>(1)</sup> FranceAgrimer (2018); <sup>(2)</sup> Agreste (2017) ; <sup>(3)</sup> Terres Univia (2018) ; <sup>(4)</sup> Herridge et al. (2008) ; <sup>(5)</sup> GEVES (2017) ; <sup>(6)</sup> Tribouillois et al. (2016) ; <sup>(7)</sup> Cober et al. (2001); <sup>(8)</sup> Duthion et al. (1994); <sup>(9)</sup> Covell et al. (1986); <sup>(10)</sup> Machado Neto et al. (2006)

ptps : printemps

## 2.2 Expérimentations mises en place

Afin de faciliter la compréhension de la démarche expérimentale mobilisée dans le cadre de cette thèse pour répondre aux différentes questions de recherche, une **description générale des expérimentations** est proposée dans la partie suivante. Les expérimentations mises en place seront plus largement détaillées dans les différents chapitres de la thèse.

Pour répondre aux deux premières questions portant sur la **fixation symbiotique des légumineuses**, **une expérimentation au champ** a été mise en place en 2014 au domaine expérimental de l'INRA de Dijon situé à Bretenière (21). Les dix espèces de légumineuses étudiées ont été semées en mars où en mai selon la physiologie de chaque espèce, et toutes les espèces ont été inoculées avec une souche de *Rhizobium* spécifique afin d'assurer la fixation symbiotique (Annexe 2). Deux céréales (orge et sorgho) ont également été semées comme plante de référence. Au semis, quatre niveaux de fertilisation azotée ont été appliqués sur l'ensemble des espèces (0, 50, 150 et 300 kg N ha<sup>-1</sup>) afin de faire varier la disponibilité en azote minéral du sol au moment du semis des légumineuses et céréales. Afin de mesurer la fixation symbiotique, un marquage de l'azote minéral du sol au <sup>15</sup>N a été effectué au semis. Plusieurs prélèvements au cours du cycle des cultures ont été réalisés pour mesurer la biomasse et la teneur en azote des parties aériennes et calculer le pourcentage d'azote issu de la fixation symbiotique à maturité. Cette expérimentation est résumée dans la figure 7.

### Essai au champ 2014 : réponse de la croissance aérienne et de la fixation symbiotique à l'azote minéral du sol

LEGUMINEUSES ET CEREALES : 4 niveaux de fertilisation azotée

**Semis mars** (espèces de printemps) : féverole, lentille, lupin, pois, vesce commune + *orge*  
**Semis mai** (espèces d'été) : fenugrec, haricot, pois chiche, soja, vesce de Narbonne + *sorgho*

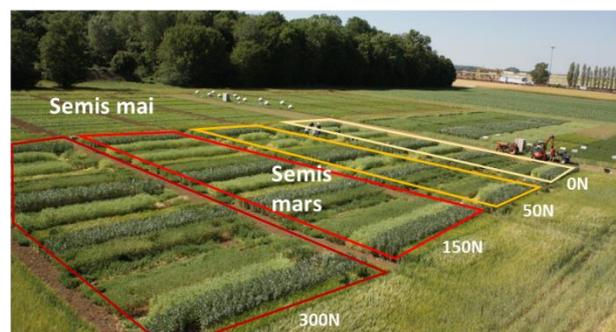
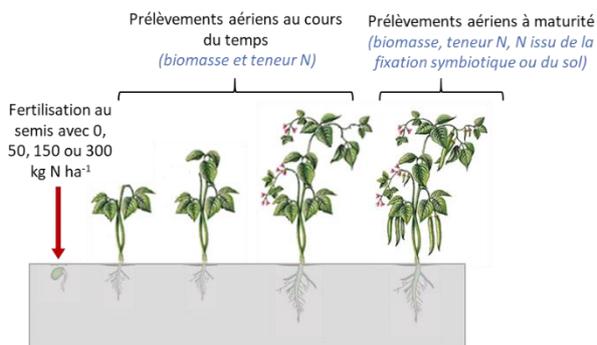


Photo prise le 16 juin 2014

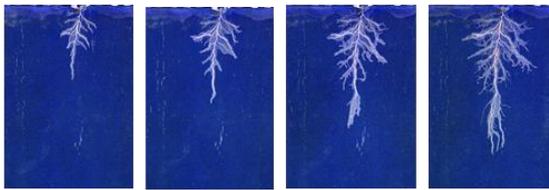
**Figure 7** : Expérimentation mise en places au champ en 2014 afin de quantifier la fixation symbiotique selon plusieurs niveaux de disponibilité en azote minéral du sol, et identifier les facteurs explicatifs des différences de réponse de la fixation symbiotique à la présence d'azote minéral dans le sol.

Afin de suivre finement la **capacité d'expansion racinaire** et d'étudier sa réponse à la présence d'azote minéral, une expérimentation en serre a été mise en place en 2016, dans laquelle les dix espèces de légumineuses ont été cultivées en rhizotrons, avec deux niveaux de fertilisation azotée. Cette expérimentation est résumée dans la figure 8.

## Essai en rhizotrons 2016 en serre : réponse de la croissance racinaire à l'azote minéral

### LEGUMINEUSES : 2 niveaux de fertilisation azotée

- 10 espèces : fenugrec, féverole, haricot, lentille, lupin, pois, pois chiche, soja, vesce commune, vesce de Narbonne
- Fertilisation azotée : 0 et 14 mmol N L<sup>-1</sup>



Prise d'image du système racinaire au cours du temps (*expansion racinaire en largeur et profondeur*)



Prélèvement destructif à la fin de la phase végétative (*répartition de la biomasse entre les organes*)

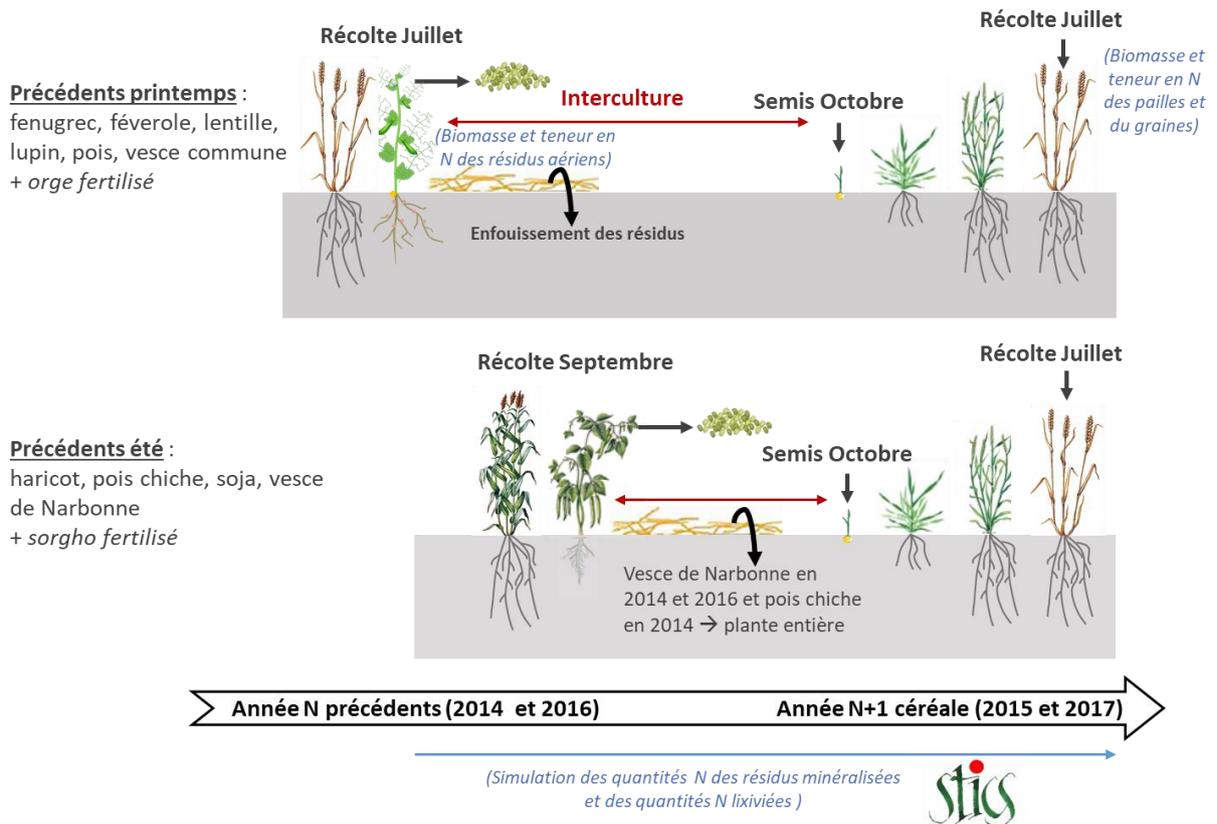
**Figure 8** : Expérimentation mise en place en serre en rhizotrons en 2016 afin d'étudier la capacité d'expansion racinaire et sa réponse à l'azote minéral pour les 10 espèces de légumineuses.

Afin de **quantifier l'effet précédent azoté des légumineuses** et répondre aux troisième et quatrième questions de recherche, deux expérimentations de deux ans au champ ont été mises en place au domaine expérimental de l'INRA de Dijon. La première année (2014 et 2016) dix espèces de légumineuses ont été cultivées en absence de fertilisation azotée. L'orge et le sorgho ont également été cultivés en parallèle avec une fertilisation azotée raisonnée. A maturité, les graines ont été récoltées sauf lorsque les conditions climatiques n'ont pas permis la production de graines. Les résidus aériens ont par la suite été enfouis dans le sol et un blé a été semé à l'automne puis récolté en juillet de l'année suivante (2015 et 2017). En 2015 et 2017, une modalité sans fertilisation azotée a été appliquée sur le blé tandis qu'en 2017 une modalité supplémentaire avec une faible quantité de fertilisation azotée a aussi été étudiée. En parallèle, certains flux azotés difficilement quantifiables au champ ont été estimés à partir de simulations réalisées à l'aide du modèle STICS entre la récolte des légumineuses et la récolte du blé l'année suivante. Ainsi, les quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus et les quantités d'azote perdues par lixiviation ont été estimées. La figure 9 résume la démarche expérimentale mise en place pour quantifier l'effet précédent azoté des légumineuses.

**Essais au champ 2014-2015 et 2016-2017**

10 PRÉCÉDENTS LEGUMINEUSES NON N FERTILISES (0N)  
2 PRÉCÉDENTS CEREALES N FERTILISES (+N)

BLE NON FERTILISE (0N) : 2015 et 2017  
BLE FERTILISE (40N) : 2017

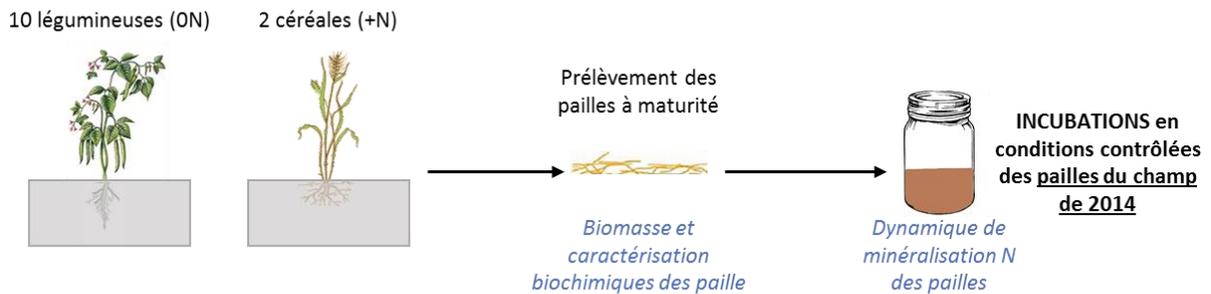


**Figure 9 :** Quantification de l'effet précédent azoté des 10 légumineuses au cours de deux expérimentations de deux ans au champ.

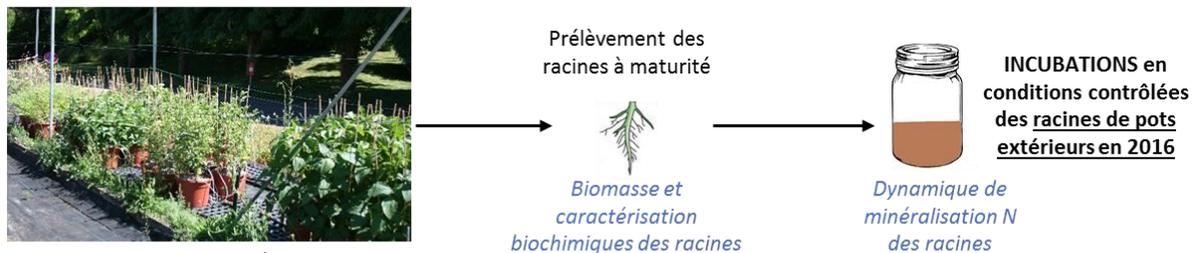
Une meilleure estimation des quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus aériens et racinaires pour répondre à la troisième question de recherche a impliqué une **caractérisation des résidus selon leurs biomasses et leurs propriétés biochimiques**. Les résidus ont par la suite été incubés en conditions contrôlées afin de suivre la dynamique de minéralisation de l'azote (Figure 10). Les résidus aériens ont été prélevés à maturité en 2014 à partir de l'expérimentation au champ mis en place pour quantifier l'effet précédent des légumineuses (Figure 9). Dans l'objectif d'avoir une meilleure estimation de la biomasse racinaire, les résidus racinaires ont été prélevés suite à une expérimentation conduite en 2016 en pots cultivés en extérieur, permettant de récupérer l'ensemble du système racinaire dans des conditions climatiques proches de celles du champ.

## Incubations des pailles et des racines

### Pailles issues de l'expérimentation au champ en 2014



### Racines issues de l'expérimentation en pots extérieurs en 2016



**Semis mars** : fenugrec, féverole, lentille, lupin, pois, vesce commune

**Semis mai** : haricot, pois chiche, soja, vesce de Narbonne

**Figure 10** : Caractérisation et incubation des résidus aériens et racinaires des 10 espèces de légumineuses afin de quantifier l'azote issu de la minéralisation des résidus.

### 3. Organisation du manuscrit

Le manuscrit est structuré en quatre chapitres rédigés sous forme d'article scientifique en anglais pour les 3 premiers chapitres et en français pour le dernier (Figure 11) :

- Un premier axe de la thèse porte sur **la fixation symbiotique**. Il est constitué d'un chapitre qui cherche à étudier l'effet de la disponibilité en azote minéral sur la croissance et la fixation symbiotique des légumineuses et à identifier les facteurs explicatifs des différences de réponse entre les espèces. Ce premier axe cherche à répondre spécifiquement aux deux premières questions de recherche.
- Un deuxième axe porte sur **l'effet précédent des différentes légumineuses**. Dans cet axe un chapitre porte un intérêt particulier sur la minéralisation de l'azote des résidus, tandis que le deuxième chapitre porte sur l'effet des légumineuses sur le blé suivant et sur la quantification des flux d'azote induits entre la récolte des légumineuses et la récolte du blé suivant. Le deuxième axe répond aux questions de recherche trois et quatre.
- Un dernier et troisième axe de la thèse cherche à synthétiser les informations des deux premiers axes afin d'établir la **multifonctionnalité des dix espèces de légumineuses en terme de flux azotés étudiés**. Ce troisième axe traite donc de la cinquième question de recherche.

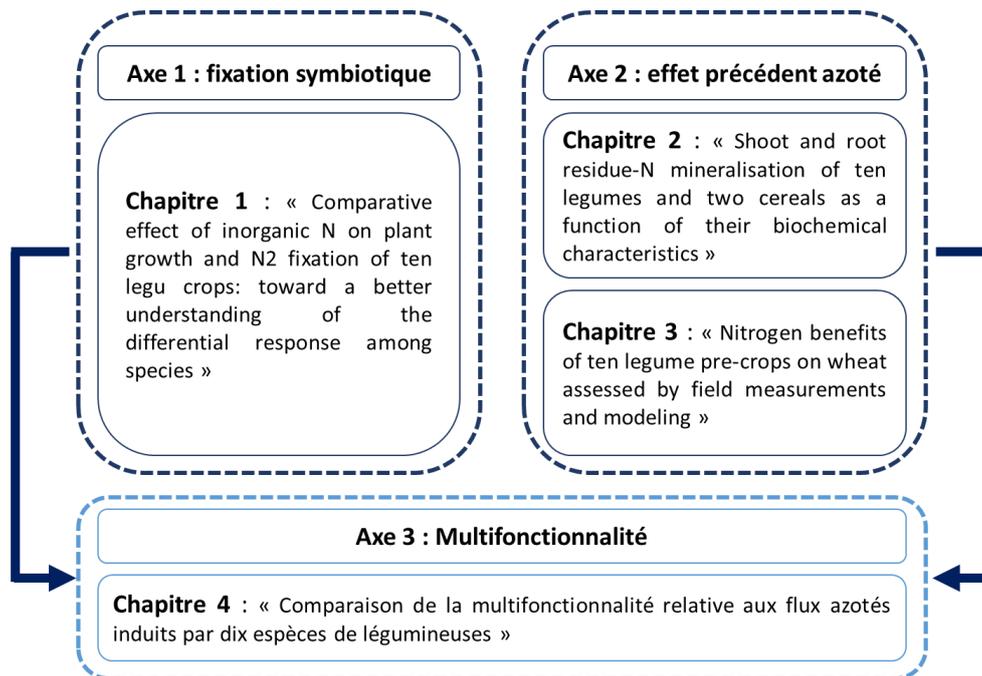


Figure 11 : Organisation du manuscrit de thèse.



# Chapitre 1 : Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species

Ce chapitre correspond à un article publié dans la revue Plant and Soil

Guinet M., Nicolardot B., Revellin C., Durey V., Carlsson G., and Voisin A.-S. (2018). Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. *Plant Soil*. 432 (1-2), 207-227.

# Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species

<sup>1</sup>Maé Guinet • <sup>1</sup>Bernard Nicolardot • <sup>1</sup>Cécile Revellin • <sup>1</sup>Vincent Durey • <sup>2</sup>Georg Carlsson • <sup>1\*</sup>Anne-Sophie Voisin

<sup>1</sup>Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche Comté, F-21000 Dijon, France

<sup>2</sup>Department of Biosystems and Technology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden

\*Corresponding author: anne-sophie.voisin@inra.fr; Tel: +33 (0)3 80 69 36 34; Fax: +33 (0)3 80 69 32 63

## Abstract

**Aims:** A better understanding of how plant growth, N nutrition and symbiotic nitrogen fixation (SNF) are influenced by soil inorganic N availability, for a wide range of legume species, is crucial to optimise legume productivity, N<sub>2</sub> fixation, while limiting environmental risks such as N leaching.

**Methods:** A comparative analysis was performed for ten legume crops, grown in a field experiment and supplied with four N fertiliser rates. Dry matter, N concentration and SNF were measured. In parallel, root elongation rates were studied in a greenhouse experiment.

**Results:** For most species, N fertilisation had little effect on plant growth and N accumulation. SNF was reduced by soil inorganic N available at sowing but with large differences in the magnitude of the response among species. The response varied according to plant N requirements for growth and plant ability to retrieve inorganic N. Accordingly, root lateral expansion rate measured in RhizoTubes was highly correlated with plant ability to retrieve inorganic N measured in the field experiment.

**Conclusion:** Combining SNF response to soil inorganic N, shoot N and plant ability to retrieve inorganic N, allowed a robust evaluation of differential response to soil inorganic N among a wide range of legume species.

## Keywords

Grain legumes, Plant growth, Nitrogen nutrition, Symbiotic N<sub>2</sub> fixation, Nitrogen Use Efficiency, Root soil exploration

**Abbreviations**

% N <sub>c</sub>	Critical shoot N concentration
% N <sub>dfa</sub>	Proportion of N derived from symbiotic fixation
% N <sub>df(soil + fertiliser)</sub>	Proportion of N derived from soil and fertiliser
DM	Dry matter
D <sub>pr</sub>	Depth penetration rate
isoNUE <sub>f+s</sub>	Curves of iso-inorganic N uptake efficiency from soil and fertiliser
L <sub>er</sub>	Lateral expansion rate
N <sub>50</sub>	Amount of inorganic N available at sowing for which % N <sub>dfa</sub> was reduced to 50%
N <sub>df(soil + fertiliser)</sub>	Amount of inorganic N from the soil and fertiliser retrieved by legumes over the growth cycle
NUE <sub>f</sub>	N uptake efficiency of the fertiliser
NUE <sub>f+s</sub>	N uptake efficiency of soil and fertiliser
SNF	Symbiotic nitrogen fixation

**1. Introduction**

A large diversity of legume crops exists and could contribute to improve agriculture sustainability in various pedoclimatic conditions. In the context of agroecological transition, the reintroduction of legume crops in cropping systems should therefore play a key role by allowing a reduction of nitrogen inputs (Magrini et al., 2016). Indeed, legumes have the unique ability to establish a symbiosis with *Rhizobium* bacteria and biologically fix atmospheric dinitrogen (N<sub>2</sub>). Therefore, N nutrition of legumes can rely on both symbiotic nitrogen fixation (SNF) and on soil inorganic N uptake by their root system. Despite a complementarity between these two N sources, legumes can show N deficiency and reduced growth, especially when plant N nutrition mostly relies on SNF (Moreau et al., 2008; Voisin and Gastal, 2015). Several studies suggest a higher carbon cost of SNF compared to inorganic N uptake (Jensen, 1997b; Pate et al., 1979), likely due to the establishment of the nodules on the root system. Furthermore, as a biological process, SNF is highly sensitive to environmental conditions such as water stress, salt stress, phosphorus deficiency, low pH and high temperatures (Bordeleau and Prévost, 1994; Chaudhary et al., 2008; Rao et al., 2002; Salon et al., 2011; Streeter, 2003). At the end of the growth cycle, SNF also decreases, due to the competition for carbon compounds with the reproductive organs (Jeuffroy and Warembourg, 1991; Voisin et al., 2003b; Voisin et al., 2002b) and therefore may not be able to meet the high plant N requirements, in comparison with inorganic N uptake. Hence, plant growth and N nutrition can differ according to N sources (i.e. SNF or inorganic N uptake) and might not be optimum when legumes are grown on soil with very low inorganic N.

The proportion of N derived from symbiotic fixation (% Ndfa) is known to be reduced by inorganic N in the soil (Liu et al., 2011b; Salvagiotti et al., 2008; Voisin et al., 2002b). Due to the additional carbon cost of SNF, legumes first rely on seed N resources and soil inorganic N to meet plant N requirements for growth. In the field, gradual depletion of soil inorganic N by plant uptake causes a N deficiency sensed by the plant, which activates nodulation and then SNF (Voisin et al., 2010). As a consequence, a high amount of soil inorganic N causes delayed establishment of SNF and lower % Ndfa (Voisin et al., 2002b). A quantitative relationships between % Ndfa and the availability of soil inorganic N has been established for only a few legume species: i.e. pea (Voisin et al., 2002b), faba bean and chickpea (Schwenke et al., 1998). Moreover, some studies showed that the effect of soil inorganic N on SNF can differ among legume species. Yet, studies mainly compared two or three legumes species in the same field experiment (George and Singleton, 1992; Schwenke et al., 1998; Turpin et al., 2002). Thus, the comparison among a wider range of legume species is made relatively difficult due to different experimental conditions and geographic localisation of the existing studies (Cernay et al., 2016).

Herridge et al. (2008) combined data on SNF for a large diversity of legume species, as measured on a large number of field experiments performed in various pedoclimatic conditions. They showed that for each species, observed % Ndfa ranged from 0 to 97%. Interestingly, mean observed % Ndfa greatly varied with species. Thus, in average, lupin and faba bean mainly relied on SNF (mean % Ndfa = 75%) while common bean poorly relied on SNF (mean % Ndfa = 40%), but no explanations were given to understand the differences among species. A better understanding of the comparative effect of SNF sensitivity to soil inorganic N for a wide range of legume species is thus needed. For a given species, growth defines N demand and therefore N uptake and N<sub>2</sub> fixation, when soil N uptake is not sufficient to meet legume N requirements. Indeed, the amount of N<sub>2</sub> fixed was often shown to be positively correlated to plant growth (Herridge et al., 2008; Naudin et al., 2010), explaining a large part of intra specific variation of SNF when species are sown in various pedoclimatic conditions affecting plant growth. On the other hand, for a given species, SNF “apparent” inhibition by total soil inorganic N depends on the actual amount of soil inorganic N accessed by its root system. Thus, a greater inorganic N uptake ability shall reduce the amount of N derived from fixation needed to meet plant N requirements. In similar soil conditions, the ability to retrieve inorganic N was shown to differ among legume species (e.g. common bean and soybean (George and Singleton, 1992); chickpea and faba bean (Turpin et al., 2002)). This differential ability may arise from differential soil colonisation by roots among species, as determined by root growth and architecture (Garnett et al., 2009). Hence, it was shown that a rapid and effective root occupancy of the soil volume by legume and cereal roots allows a better N uptake (Dayoub et al., 2017). This will contribute to a better soil N use efficiency, due to reduced N losses by leaching (Dunbabin et al., 2003; Ju et al., 2015; Mi et al., 2010). Knowledge on

legumes ability to retrieve inorganic N is all the more important in agronomic situations with high soil inorganic N, subject to higher risks of leaching.

However, due to the difficulty to make detailed and systematic samplings and analyses of root systems grown in soil (Zhu et al., 2011), legume root trait comparisons have only been made for two or three species in field experiments (Benjamin and Nielsen, 2006; Liu et al., 2011a) or the studies focused on few simple root traits in greenhouse experiments (Dayoub et al., 2017). Moreover, to our knowledge the ability to retrieve soil inorganic N according to root traits, have never been related to SNF inhibition by soil inorganic N.

Against this background, the overall objective of this study was to improve our understanding of how plant growth, N accumulation and SNF in different legume species are influenced by soil inorganic N availability. A comparative analysis was carried on ten legume crops, grown in a field experiment and supplied with four N fertiliser rates. To test the hypothesis that SNF inhibition by inorganic N would differ according to the ability of legume species to retrieve inorganic N, and its link with root architecture, a specific greenhouse experiment was carried out. As such, root traits of the ten legume species were compared on plants grown in rhizotrons either with a high N fertiliser rate or without inorganic N.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Field experiment

#### 2.1.1. Site

A field experiment was carried out in 2014 at the INRA experimental site of Bretenière (Eastern France; 47.241 N, 5.115 E, altitude = 206 m). The soil is classified as Cambisol (Eutric) (WRB, 2006) with a clayey surface layer (depth =  $0.65 \pm 0.15$  m) developed on an alluvial coarse layer. Soil characteristics are: clay =  $425 \text{ g kg}^{-1}$ , silt =  $515 \text{ g kg}^{-1}$ , sand =  $60 \text{ g kg}^{-1}$ , organic C =  $19.3 \text{ g kg}^{-1}$ , organic N =  $1.69 \text{ g kg}^{-1}$ , pH = 7.3,  $\text{CaCO}_3 < 1 \text{ g kg}^{-1}$ . In 2013, the whole field was cultivated with barley (*Hordeum vulgare*).

#### 2.1.2. Treatments and experimental design

The following ten legume crops were included in the experiment: faba bean, fenugreek, chickpea, common bean, common vetch, lentil, lupin, pea, soybean and Narbonne vetch (see Table 1 for Latin names and cultivars). They were sown either on March 18<sup>th</sup> 2014 or on May 5<sup>th</sup> 2014, depending on the physiology of each species (Table 1). All seeds were inoculated at sowing with species-specific strains of N<sub>2</sub>-fixing bacteria with at least 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> viable rhizobia per seed, for small and large seeded legumes, respectively. The rhizobial strains were known or tested in the greenhouse to ensure symbiotic nitrogen fixation (SNF) (Table 1). These strains were obtained from the collection "Microorganismes d'intérêt Agro-Environnemental" located at UMR Agroécologie, INRA, Dijon, France.

Non-fixing reference crops for the measurement of N<sub>2</sub> fixation were also sown in separate plots randomly distributed among legume plots: spring barley in March and sorghum in May. At sowing, inorganic N content in the upper 60 cm of the soil were 69 kg N ha<sup>-1</sup> in March and 84 kg N ha<sup>-1</sup> in May. In order to induce a wide range of inorganic N in the soil, different rates of inorganic N (0, 50, 150 and 300 kg N ha<sup>-1</sup>) were applied at each sowing date, in form of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, corresponding to 0N, 50N, 150N and 300N treatments. Nitrogen fertiliser was applied in 12 m bands across four blocks in which crops were randomly distributed. To estimate SNF, the <sup>15</sup>N natural abundance calculation was used, with barley or sorghum as non-fixing reference crops. For the purpose of ensuring a sufficient difference in <sup>15</sup>N enrichment between soil inorganic N and N derived from fixation of atmospheric N<sub>2</sub>, 5 kg N ha<sup>-1</sup> of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> labelled with 1% <sup>15</sup>N was dissolved in water and additionally spread on the soil at a rate of 300 L ha<sup>-1</sup> on all treatments, at sowing. Irrigation was applied during spring so as to reduce water stress (Fig. 1). For legumes sown in March, 35, 40 and 50 mm were supplied on March 26<sup>th</sup>, May 16<sup>th</sup> and June 18<sup>th</sup>, respectively. For legumes sown in May, 40, 40 and 50 mm were supplied on May 16<sup>th</sup>, May 27<sup>th</sup> and June 14<sup>th</sup>, respectively. Weeds were controlled by hand weeding and one insecticide (Karate Zeon on April 25<sup>th</sup>) was applied. Crops were sown on 1.5 m wide and 12 m long plots and sowing density and row spacing were adapted to each crop. Cultivation conditions are summarised in Table 1.

### 2.1.3. Climatic conditions

The site is subject to a semi-continental climate. In 2014, annual precipitations and mean temperature were 865 mm and 12.1°C, respectively. Compared to the annual means over the past 20 years, precipitations were very low between March and June (102 mm vs 255 mm) and unusually high between July and August (246 mm vs 147 mm) (Fig. 1).

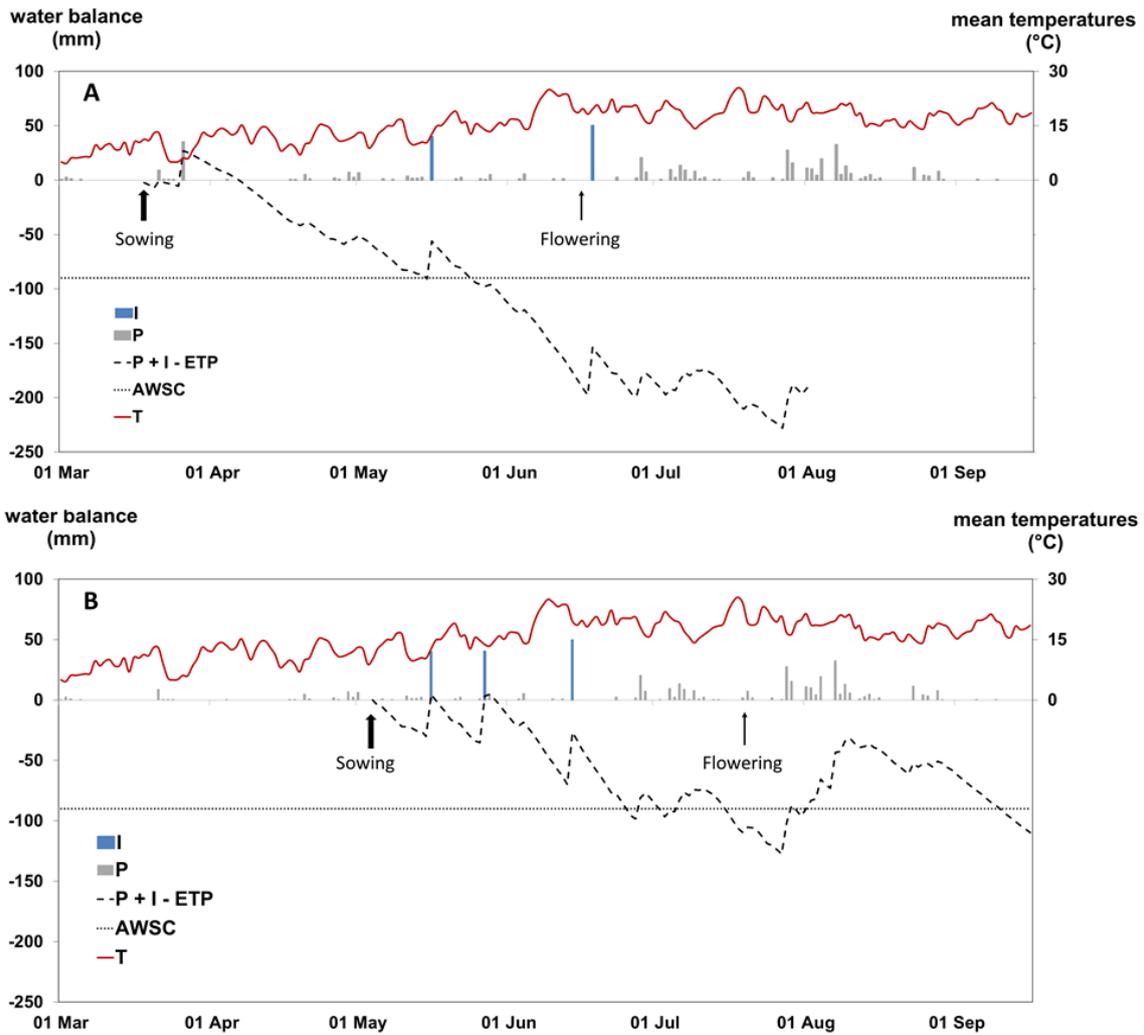
### 2.1.4. Sampling and measurements

Shoots were harvested on subplots of 1 m<sup>2</sup> for legumes and 0.5 m<sup>2</sup> for cereals. Samples were collected twice during vegetative stages for the 0N, 50N and 150N treatments (54 and 78 days after sowing for legumes sown in March and 50 and 63 days after sowing for legumes sown in May). At flowering (89 and 77 days after sowing for legumes sown in March and May respectively (Fig. 1)) and at physiological maturity (Table 1) samples were collected for all four N treatments. Dry matter (DM) was determined on samples after oven-drying for 48 h at 80°C. Samples were milled and N concentration and <sup>15</sup>N enrichment were measured using a mass spectrometer combined with an elemental analyser (ANCA-GLS, Sercon Ltd., Crewe, UK).

**Table 1** Cultivar, sowing date, Rhizobium strain, and sowing density for the ten legume crops and two cereals.

Species	Common name	ID	Cultivar	Sowing date	Rhizobium strain	Sowing density (seeds m <sup>-2</sup> )	Harvest date
<i>Lens culinaris</i>	Lentil	Le	Anicia	18 March 2014	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> MIAE01212 (MSDJ469, P221) <sup>(a)</sup>	250	11 July 2014
<i>Lupinus albus</i>	Lupin	Lu	Feodora		<i>Bradyrhizobium</i> sp. ( <i>Lupinus</i> ) MIAE00428 (MSDJ718, LL13) <sup>(b)</sup>	70	1 August 2014
<i>Pisum sativum</i>	Pea	Pe	Kayanne		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> MIAE01212 (MSDJ469, P221) <sup>(a)</sup>	80	1 July 2014
<i>Vicia faba</i>	Faba bean	Fa	Espresso		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> MIAE01211 (MSDJ822, FH34) <sup>(c)</sup>	45	25 July 2014
<i>Vicia sativa</i>	Common vetch	Cv	Candy		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> MIAE01212 (MSDJ469, P221) <sup>(a)</sup>	100	11 July 2014
<i>Hordeum vulgare</i>	Barley	Ba	Irina		none	350	15 July 2014
<i>Cicer arietinum</i>	Chickpea	Ch	Twist	5 May 2014	<i>Mesorhizobium</i> sp. ( <i>Cicer</i> ) MIAE04996 (MSDJ2193, 3HOa8) <sup>(d)</sup>	70	16 September 2014
<i>Glycine max</i>	Soybean	So	Sultana (000)		<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> MIAE00426 (MSDJ1996, G49) <sup>(e)</sup>	70	5 September 2014
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Common bean	Cb	Flavert		<i>Rhizobium etli</i> MIAE05216 (MSDJ2414, GD164) <sup>(f)</sup>	30	4 September 2014
<i>Trigolia foenum-graecum</i>	Fenugreek	Fe	Hanka		<i>Ensifer</i> sp. ( <i>Trigonella</i> ) MIAE06333 (MSDJ3531) <sup>(f)</sup>	180	5 September 2014
<i>Vicia narbonensis</i>	Narbonne vetch	Nv	Clara		<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> MIAE01212 (MSDJ469, P221) <sup>(a)</sup>	35	5 September 2014
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum	Sg	Québec		none	30	5 September 2014

<sup>(a)</sup> Mazurier (1989), Laguerre et al. (1993); <sup>(b)</sup> Laguerre et al. (1993); <sup>(c)</sup> Amarger (1981); <sup>(d)</sup> Kingsley and Bohlool (1983); <sup>(e)</sup> Lagacherie et al. (1977); <sup>(f)</sup> Microorganismes d'Intérêt Agro-Environnemental (MIAE) Collection.



**Fig. 1** Climatic water balance and mean daily temperatures during the growth cycle of plants either sowed in March (A) or in May (B) in the 2014 field experiment. (I: Irrigation; P: Daily precipitation; P + I - ETP: Precipitation + Irrigation - Potential evapotranspiration; AWSC: Available Water Storage Capacity water; T: mean daily temperature). I, P, ETP and T were measured from a weather station located in the INRA experimental site of Bretenièrre. Large arrows indicate sowing dates and narrow arrows indicate sampling dates at flowering stage.

#### 2.1.5. N uptake relative to N requirements for growth

In order to evaluate whether N requirements for growth were met for the different inorganic N inputs, the concept of critical dilution curve was used. For a given shoot dry matter the critical shoot N concentration (% N<sub>c</sub>) is the minimal shoot N concentration that leads to a maximum dry matter production (Justes et al., 1994). As a general plant feature, % N<sub>c</sub> decreases during plant growth as shoot dry matter increases, due to a decrease in the leaf/stem ratio across plant development and growth and to N remobilisation from shaded to illuminated part of the canopy (Lemaire et al., 2008). Even if species-specific relationship could be drawn until the end of flowering (Justes et al., 1994; Moreau et al., 2008; Ney et al., 1997; Plénet and Cruz, 1997), they are fairly close to each other. To date, for

legumes, only the critical dilution of pea and lucerne have been determined (Lemaire et al., 1985; Ney et al., 1997). Despite contrasted leaf/stem ratios for these species, their critical N dilution curves are very close to each other (Fig. 3). Hence, in our study, legume species were compared with the critical curves established for pea and lucerne which were considered as our reference critical N dilution curves. For a given shoot DM measured before the end of flowering, N concentration lower than % N<sub>c</sub> reveals N deficiency, meaning that shoot growth was limited by nitrogen in that situation (sub-optimal N nutrition). Shoot N concentration close to % N<sub>c</sub> indicates that N requirements for growth were met (optimal N nutrition). In that case, N uptake from either N<sub>2</sub> fixation or inorganic N uptake is precisely adapted to assimilate availability (Vance and Heichel, 1991) and to N requirements for growth (Devienne-Barret et al., 2000). Nitrogen concentration higher than % N<sub>c</sub> reflects excess N nutrition relative to N requirements for growth (supra-optimal N nutrition). In the last two cases, inorganic N uptake and nitrogen fixation both react to an upper limit of N concentration in the shoots, through shoot to roots N-feedback mechanisms that reduce SNF activity (Hartwig, 1998; Muller and Touraine, 1992; Sulieman et al., 2010).

#### 2.1.6. N<sub>2</sub> fixation

At each harvest date, since a very small amount of <sup>15</sup>N was added, the percentage of N derived from the air (% N<sub>d</sub>f<sub>a</sub>) of each legume crop was calculated using the natural abundance technique (Rennie and Rennie, 1983) with the following equation (1), using the shoot <sup>15</sup>N enrichment of legume crops (δ<sup>15</sup>N legume) and that of barley or sorghum (δ<sup>15</sup>N non-fixing reference crop) (Table 4):

$$\% N_{d}f_{a} = 100 \times \frac{\delta^{15}\text{N legume} - \delta^{15}\text{N non fixing reference crop}}{\beta_{\text{fix}} - \delta^{15}\text{N non fixing reference crop}} \quad (1)$$

where β<sub>fix</sub> is the isotopic fractionation factor associated with symbiotic N<sub>2</sub> fixation processes (Rennie and Rennie, 1983). It was assumed to be equal to -1 for all ten legume crops. Several studies measured β<sub>fix</sub> for various legume crops and obtained values close to -1 (Peoples et al., 1997; Unkovich and Pate, 2000; Voisin et al., 2002b).

The amount of N<sub>2</sub> fixed by legumes was calculated by multiplying the total amount of shoot N, measured in the subplots, by % N<sub>d</sub>f<sub>a</sub>. Measurements from the subplots were extrapolated to express data in kg N ha<sup>-1</sup>.

In order to compare the effect of inorganic N on SNF among legume species, % N<sub>d</sub>f<sub>a</sub> over the growth cycle was plotted as a function of the total amount of inorganic N available at sowing. This was calculated as the sum of soil inorganic N in the top 60 cm soil layer at sowing and inorganic N applied as fertiliser. From the regression between % N<sub>d</sub>f<sub>a</sub> and soil inorganic N available at sowing, the N50 indicator was calculated as the amount of inorganic N available at sowing for which % N<sub>d</sub>f<sub>a</sub> was reduced to 50% (SNF then accounts for 50% of shoot N).

### 2.1.7. Inorganic N uptake

The relative contribution of N derived from soil and N fertiliser to total N uptake was calculated as follows (2):

$$\% Ndf(\text{soil} + \text{fertiliser}) = 100 - \% Ndfa \quad (2)$$

The amount of inorganic N derived from soil and fertiliser was calculated by multiplying the total amount of shoot N, measured in the subplots, by % Ndf(soil + fertiliser). For non-fixing reference crops it was equal to the total amount of shoot N as inorganic N was the only source of N for plant growth. Data were expressed in kg N ha<sup>-1</sup> by extrapolating measurements from the subplots.

As an indicator of each species ability to take up N fertiliser, the total amount of inorganic N retrieved over the growth cycle (Ndfsoil + fertiliser) was plotted as a function of the amount of inorganic N available at sowing for each species. As the amount of inorganic N available at sowing was experimentally varied by N fertilisation, the slope of the linear relationship was considered as an indicator of N uptake efficiency of the fertiliser (NUEf) of each legume species.

An indicator of legume species ability to take up total inorganic N available at sowing from soil and fertiliser, (NUEf+s) was also calculated. It is the ratio between half of the total amount of shoot N at maturity (as averaged for the four N fertilisation rates), and the amount of inorganic N available at sowing required to reduce SNF to 50% of total shoot N (N50). For example, a legume crop with a mean total shoot N of 200 kg N ha<sup>-1</sup>, and relying on SNF for half of the total amount of shoot N (% Ndfa = 50 %), retrieved 100 kg N ha<sup>-1</sup> from the soil inorganic N. If NUEf+s is equal to 1, it means that the legume crop retrieved the total amount of soil inorganic N available at sowing. In our example, 100 kg N ha<sup>-1</sup> of inorganic N were then required at sowing to reduce SNF to 50% of total shoot N (N50). The same crop with 50% lower NUEf+s (i.e. NUEf+s = 0.5) would require 200 kg N ha<sup>-1</sup> of inorganic N at sowing to retrieve 100 kg ha<sup>-1</sup> and therefore to reduce SNF to 50% of total shoot N. Curves of iso-inorganic N uptake efficiency from soil and fertiliser (isoNUEf+s) were thus calculated and plotted in Fig. 6.

Neither inorganic N from mineralisation nor N losses during the growth cycle were taken into account in the calculation of NUEf and NUEf+s. Hence, on the one hand, inorganic N was underestimated as soil mineralisation was not taken into account; on the other hand, there might have been overestimation of inorganic N actually available due to presumable N losses by leaching, volatilisation or denitrification. Soil inorganic N that was not retrieved by legumes and which remained in the soil was either lost or inaccessible to legume roots.

## 2.2. Greenhouse experiment

### 2.2.1. Plant material and experimental treatments

A greenhouse experiment was carried out in 2016 in the Plant Phenotyping Platform for Plant and Microorganism Interactions (4PMI), at INRA in Dijon (France) for the measurement of root traits of the same ten legume crops cultivated in the field experiment, using the same cultivars and Rhizobial strains (Table 1). Legume species were grown with two different nutrient solutions varying in their inorganic N concentration (0 and 14 mM in the form of nitrate) and referred to as -N and +N treatments hereafter (Table 2).

### 2.2.2. Growing conditions

Seeds of homogenous weight were sown in attapulgit substrate and placed in an incubator at 22 °C in the dark. Then, 72 h after sowing, when the taproot had reached 3 to 5 cm long, seedlings were transplanted in cylindrical RhizoTube (49.5 cm high and 18.0 cm diameter) that enable root phenotyping (Jeudy et al., 2016). Each RhizoTube contained one seed and four RhizoTubes (replicates) per species and N treatment were used. Legume species and N treatments were randomised in the greenhouse compartment.

In the RhizoTubes, roots were confined in a two dimensions zone, between an inner permeable membrane and an external transparent tube. Inoculation was performed at transplantation ( $2.10^8$  colony forming units per seedling), and then two and four days after transplantation to ensure nodulation. Plants were watered three times a day with 50 mL of nutrient solution the first six days and five times a day with 150 mL for the rest of the experiment. The nutrient solutions also contained P, K and micronutrients (and N in the +N treatment) (Table 2). The photoperiod was 16 hours and plants were illuminated using 400 W lamp (HPS Plantastar, OSRAM, Munich, Germany). Mean day and night temperatures were  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectively.

### 2.2.3. Root traits and measurements

Root images were automatically taken five times a week from 6 to 26 days after sowing (Jeudy et al. 2016). From these images, maximal root depth exploration and maximal lateral expansion were monitored using Matlab software (2015). The depth penetration rate (Dpr) lateral expansion rate (Ler) against time (in  $\text{mm day}^{-1}$ ) were then calculated by linear regression analysis.

Twenty seven days after sowing, plants were harvested while still in early growth phase. At this stage the longest taproot had just reach the bottom of the RhizoTubes. Shoot, roots and nodules were separated and oven-dried (48 h at 80 °C) to determine DM.

**Table 2** Composition of the two nutrient solutions (-N and +N) varying for their nitrate concentration.

Compounds in the nutrient solution	Concentration of compounds (mM)	
	-N	+N
KNO <sub>3</sub>	0.00	5.35
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.80	0.20
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub> O	0.00	4.00
MgSO <sub>4</sub>	1.00	0.75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.00	0.90
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 6H <sub>2</sub> O	0.00	0.33
CaCl <sub>2</sub>	2.50	0.00
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.70	0.00
NaCl	0.20	0.20
versenate	0.05	0.05
micronutrients	traces	traces

### 2.3. Data analysis

All intermediate calculations and data analysis were performed in R version 3.4.2. (R Core Team, 2016). ANOVA were performed to test for N fertilisation treatment effects, legume species effects and treatment x species interaction effects on all traits measured in field or greenhouse experiments. If the effects were significant, Tuckey's Honest Significant Difference (HSD) test ( $p < 0.05$ ) was performed for multiple means comparison, using agricolae package (R Core Team, 2016). Homoscedasticity and normality of variable's residuals were tested with a Bartlett and Shapiro-Wilk test respectively. When the homogeneity assumption was violated, the model was fitted using the generalised least square (GLS) method in the nlme package (R Core Team, 2016). In order to compare among the different legume species for their response of % Ndfa to the amount of inorganic N available at sowing, the "emtrends" function from the "emmeans" package (R Core Team, 2016) was used. Pairwise comparisons with the false discovery rate adjustment method were then performed using the CLD function.

### 3. Results

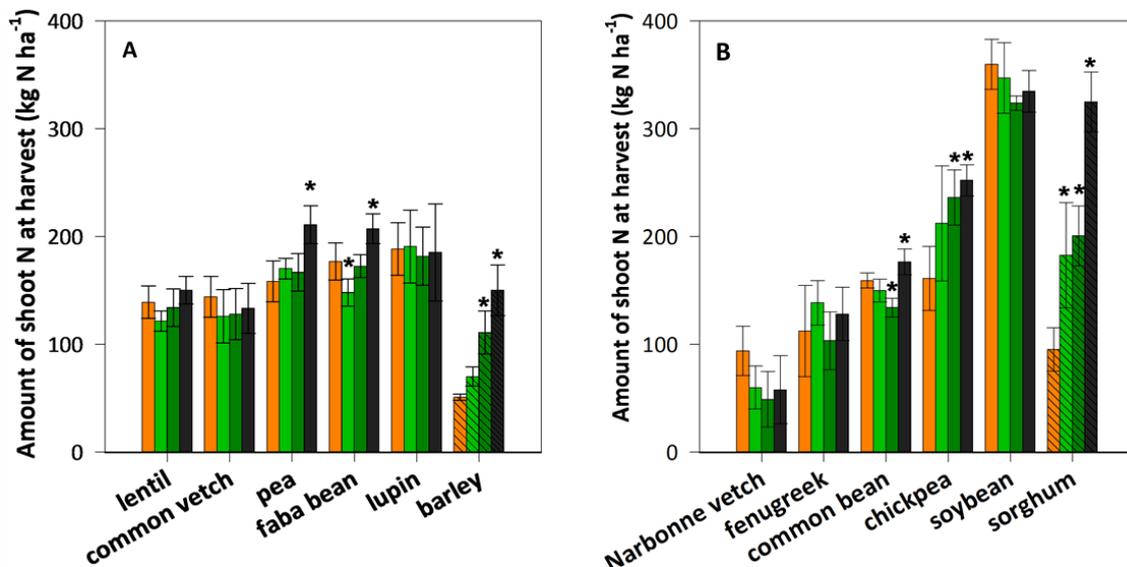
Since the climatic conditions (Fig. 1) and the amount of soil inorganic N at sowing (0-60 cm soil layer) differed between the two sowing dates, results from the field experiment are presented separately for each group of legumes according to their sowing date.

The year 2014 was characterised by a very dry spring that led to a water deficit during almost all the plant growth cycle for both sowing dates (Fig. 1). A diagnosis of limiting factors of pea yield (cv. Kayanne) performed in 2014 in neighbouring fields of our experimental site, indicated that the most

impacting stresses were the large number of days with temperature exceeding 25°C, and water deficit until the beginning of seed filling (Lecomte, C. unpublished data). Plant growth of the other legume species may as well have been reduced by those stresses in this field experiment.

### 3.1. Effects of legume species and inorganic N fertilisation on shoot growth and N accumulation in the field

For legumes sown in March, when no N fertiliser was applied (ON treatment), shoot N accumulated over the whole growth cycle ranged from 139 (lentil) to 188 (lupin) kg N ha<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 2A). For legumes sown in May and unfertilised (ON treatment), shoot N greatly varied among species and ranged from 94 (Narbonne vetch) to 360 (soybean) kg N ha<sup>-1</sup>, respectively. For both sowing dates, barley (51 kg N ha<sup>-1</sup>) and sorghum (95 kg N ha<sup>-1</sup>) had the smallest shoot N when unfertilised (ON treatment) compared to legumes.



**Fig. 2** Amount of shoot N measured at harvest, as affected by inorganic N fertilisation at sowing (ON (light orange), 50N (light green), 150N (dark green), 300N (black)) for the ten legume crops (solid) and two cereals (hatched) either sowed in March (A) or in May (B) in the 2014 field experiment in the 2014 field experiment. Values are means ( $n = 4$ )  $\pm$  SD (standard deviation). For each species, bars with \* are significantly different ( $p < 0.05$ ) from the ON treatment.

For six legume species (common vetch, lentil, lupin, fenugreek, Narbonne vetch and soybean), N fertiliser did not significantly affect total shoot N. For common bean, faba bean and pea, the 300N treatment only differed from the ON treatment with total shoot N being increased by 17, 30, and 52 kg N ha<sup>-1</sup> respectively (Fig. 2). The highest values of total shoot N for the 300N treatment were associated with an increase of shoot N concentration (faba bean: 11%, pea: 12% and common bean: 27%) (Table 3). For pea the 300N treatment also induced a significant increase of shoot DM as compared to the ON treatment (Table 3). Chickpea was the only legume species for which N treatments gradually increased

total shoot N, as compared to the 0N treatment (Fig. 2B). This was associated with a strong increase of shoot DM for all N fertilisation rates (+ 29 to 64% from the 50N to the 300N treatment), the N concentration being unchanged among N treatments (Table 3). Nitrogen fertilisation increased barley and sorghum shoot N (Fig 2) by increasing both shoot DM and N concentration (Table 3).

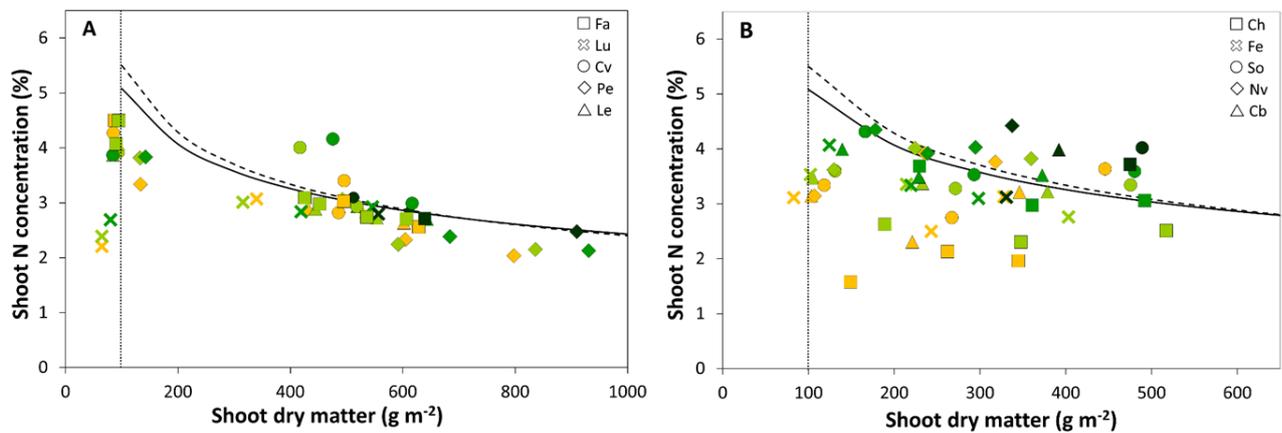
### 3.2. Variations in N uptake relative to plant N requirements from growth over time and with different inorganic N input

For each species, so as to evaluate whether N uptake allowed to meet N requirements for growth over time for the various N treatments, shoot N concentration was compared to the critical N concentration from our reference curve (% N<sub>c</sub>, which indicates optimal N nutrition for growth) (Fig. 3). For legumes sown in March (Fig. 3A), until flowering, no clear differences of N concentrations among N treatments were observed. For all N treatments, shoot N concentration was always equal to or slightly lower than % N<sub>c</sub>. Only two points of common vetch collected 78 days after sowing and fertilised with 50 and 150 kg N ha<sup>-1</sup> had much higher N concentration than % N<sub>c</sub>. Hence, for legumes sown in March N requirements for plant growth were fully met for all N treatments until flowering.

For legumes sown in May (Fig. 3B), N fertilisation increased both shoot N concentration and dry matter at the first vegetative stage (50 days after sowing) for all legumes species. Nitrogen concentration lower than % N<sub>c</sub> for the 0N and 50N treatments indicates a N deficiency for all species at these early stage of growth. When Narbonne vetch DM was higher than 200 g m<sup>-2</sup> (end of vegetative phase: 64 days after sowing) and until flowering (77 days after sowing), shoot N concentration was equal or higher than % N<sub>c</sub> for all N treatments, revealing an optimal N nutrition for plant growth. For common bean and soybean, N fertilisation had a reduced effect on shoot N concentration at flowering compared to the earlier stages. At flowering for both species, N concentrations were similar or higher than % N<sub>c</sub> revealing an optimal or supra-optimal N nutrition for plant growth, for the four N fertiliser treatments. Conversely, shoot N concentration of fenugreek was always slightly lower than % N<sub>c</sub>, indicating a small N deficiency for all N treatments. For chickpea, until flowering N fertilisation increased shoot N concentration regardless of shoot DM. Shoot N concentration was equal or higher than % N<sub>c</sub> only when at least 150 kg inorganic N ha<sup>-1</sup> were applied. Hence, for chickpea, until flowering N requirements for plant growth were only met for the 150 and 300N treatments while N was a limiting factor of growth for the 0N and 50N treatments

**Table 3** Shoot DM and N concentration measured at harvest, as affected by N treatments for the ten legume crops and two cereals in the 2014 field experiment. Values are means (n = 4). For each species, mean value sharing the same letter ('a' and / or 'b') are not different according to Tukey's HDS test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

	shoot dry matter (g m <sup>-2</sup> )					shoot N concentration (%)				
	N treatment				significance <i>p</i>	N treatment				significance <i>p</i>
	0N	50N	150N	300N		0N	50N	150N	300N	
<b>Lentil</b>	552 a	516 a	552 a	575 a		2.52 ab	2.36 c	2.43 bc	2.62 a	**
<b>Common vetch</b>	521 a	479 a	466 a	472 a		2.77 a	2.64 a	2.75 a	2.85 a	
<b>Pea</b>	772 b	851 ab	799 ab	917 a	*	2.05 b	2.00 b	2.09 b	2.30 a	***
<b>Fababean</b>	672 ab	526 c	587 bc	708 a	**	2.63 b	2.82 a	2.94 a	2.93 a	***
<b>Lupin</b>	560 a	525 a	515 a	569 a		3.37 a	3.63 a	3.51 a	3.23 a	
<b>Barley</b>	598 c	782 b	960 a	949 a	***	0.86 c	0.90 bc	1.15 b	1.57 a	***
<b>Narbonne vetch</b>	257 a	182 a	162 a	175 a		3.63 a	3.23 a	2.93 a	3.23 a	
<b>Fenugreek</b>	464 a	567 a	406 a	508 a		2.46 a	2.45 a	2.58 a	2.52 a	
<b>Common bean</b>	715 ab	741 a	629 b	626 b	*	2.23 b	2.02 c	2.13 bc	2.83 a	***
<b>Chickpea</b>	725 b	933 ab	1054 a	1191 a	**	2.21 a	2.28 a	2.24 a	2.13 a	
<b>Soybean</b>	1009 a	1035 a	996 a	1077 a		3.57 a	3.35 ab	3.25 b	3.11 b	***
<b>Sorghum</b>	1160 b	1736 a	1726 a	1640 a	**	0.82 c	1.04 b	1.16 b	1.98 a	***



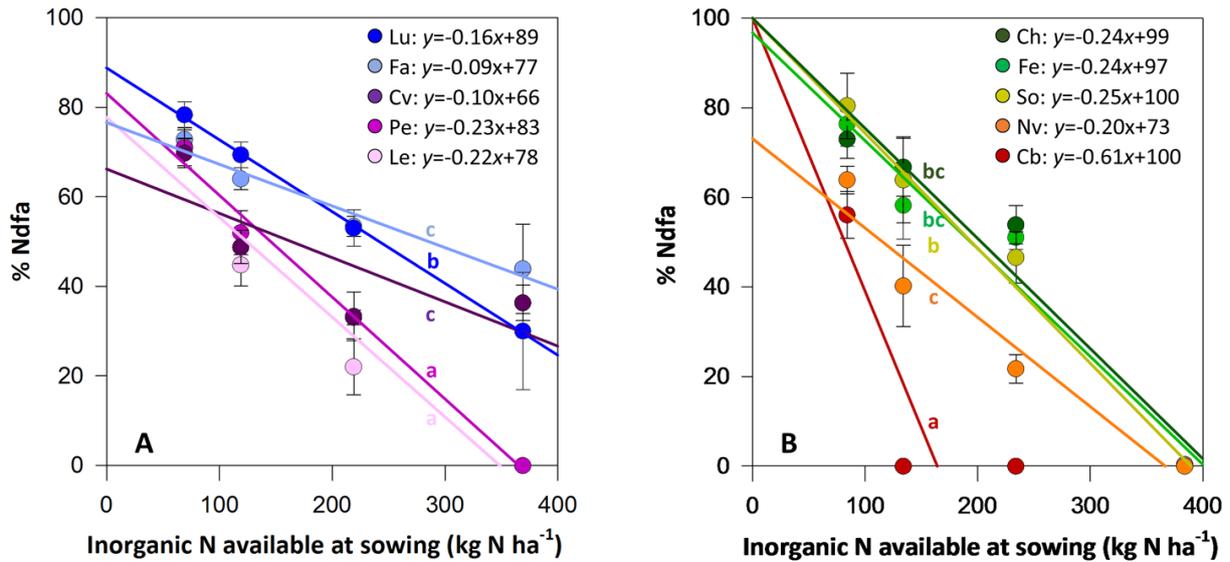
**Fig. 3** Shoot N concentration as a function of shoot dry matter for four inorganic N fertilisation rates (0N (light orange), 50N (light green), 150N (dark green), 300N (black)) measured for three sampling dates between vegetative stages and the end of flowering for the ten legumes crops sown either in March (A) or in May (B) in the 2014 field experiment. Values are means per sampling dates (n = 4). The curves correspond to the critical dilution of N into dry matter for pea (straight curve), and lucerne (dashed curve) used as references. The vertical line indicates the minimum threshold of dry matter (100 g dm m<sup>-2</sup>) that delimits the domain of validity of the different curves. Species ID is given in Table 1.

### 3.3. Effect of inorganic N available at sowing on symbiotic nitrogen fixation

For the ON treatments % Ndfa for the entire growth cycle ranged from 70% (common vetch) to 78% (lupin) for legumes sown in March (Fig. 4A) and from 56% (common bean) to 80% (soybean) for legumes sown in May (Fig.4B). When unfertilised (ON treatment), legumes sown in March fixed between 99 kg N<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> (lentil) and 147 kg N<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> (lupin) while legumes sown in May fixed between 60 kg N<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> (Narbonne vetch) and 290 kg N<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> (soybean) (Table 4).

For both sowing dates, a strong negative relationship between % Ndfa and the amount of inorganic N available at sowing (soil inorganic N in the top 60 cm soil layer at sowing + inorganic N applied as fertiliser) was observed for all species (Fig. 4). However, strong differences in the magnitude of the response were observed among legumes species. For legumes sown in March, % Ndfa decreased the most with the amount of inorganic N available at sowing for lentil and pea, while for faba bean, common vetch and lupin the response was significantly lower. As a result, when 300 kg inorganic N ha<sup>-1</sup> were applied at sowing in March, % Ndfa was zero for lentil and pea while faba bean, common vetch and lupin, maintained SNF with % Ndfa equal to 44, 36 and 30%, respectively (Fig. 4A). For legumes sown in May, % Ndfa highly decreased with the amount of inorganic N available at sowing for common bean while the response was significantly lower and similar for chickpea, fenugreek, Narbonne vetch and soybean. When 300 kg inorganic N ha<sup>-1</sup> were applied, % Ndfa was zero for all species (Fig. 4B). For common bean, SNF was totally inhibited when inorganic N available at sowing was over 200 kg N ha<sup>-1</sup>. The amount of N fixed also decreased with N fertilisation (Table 4), as the amount of total shoot N only slightly varied among N treatments for most legume species, while the % Ndfa strongly decreased with N fertilisation.

The indicator N50, defined as the amount of inorganic N available at sowing for which SNF was reduced to 50%, ranged from 82 kg N ha<sup>-1</sup> for common bean to 285 kg N ha<sup>-1</sup> for faba bean, meaning that for faba bean, compared to common bean, three times more inorganic N were required at sowing to reduce SNF by 50% (Fig. 6).



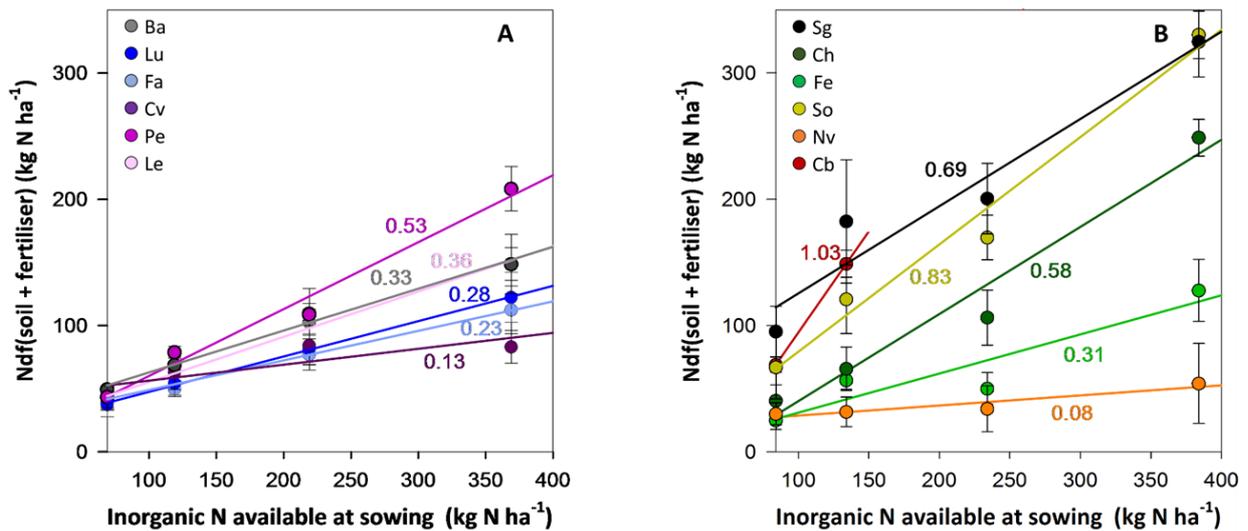
**Fig. 4** Percentage of N derived from SNF (% Ndfa) measured at harvest, as affected by the amount of inorganic N available at sowing (soil inorganic N in the top 60 cm soil layer at sowing + inorganic N applied as fertiliser (0, 50, 150 and 300N)) for the ten legume crops either sowed in March (**A**) or in May (**B**) in the 2014 field experiment. Values are means ( $n = 4$ )  $\pm$  SD (standard deviation). Slopes sharing the same letter ('a' and / or 'b') are not different according to pairwise test. Species ID is given in Table 1.

**Table 4**  $\delta^{15}\text{N}$  values and amount of N fixed measured at harvest, as affected by N treatments for the ten legume crops in the 2014 field experiment. Values are means ( $n = 4$ ). For each N treatment mean value sharing the same letter ('a' and / or 'b') are not different according to Tukey's HSD test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

	$\delta^{15}\text{N}$ values at maturity				Amount of N derived from SNF (kg N ha <sup>-1</sup> )			
	0 N	50 N	150 N	300 N	0 N	50 N	150 N	300 N
<b>Lentil</b>	18.5 bc	23.7 b	22.5 b	18.2 a	99 c	54 d	30 c	0 c
<b>Common vetch</b>	19.4 b	21.9 bc	19.0 b	11.5 b	100 bc	62 cd	42 bc	49 b
<b>Pea</b>	18.3 bc	20.4 c	19.1 b	14.0 ab	112 bc	89 bc	55 b	0 c
<b>Fababean</b>	16.8 bc	14.6 d	12.8 c	9.9 b	129 ab	95 b	92 a	91 a
<b>Lupin</b>	12.9 c	12.2 e	12.9 c	12.7 b	147 a	133 a	97 a	59 b
<b>Barley</b>	68.2 a	44.3 a	29.2 a	18.7 a				
significance <i>p</i>	***	***	***	***	***	***	***	***
<b>Narbonne vetch</b>	11.2 bc	16.2 b	18.8 b	14.3	60 c	25 cd	11 c	0
<b>Fenugreek</b>	7.5 cd	11.6 bc	11.7 c	13.7	87 bc	82 bc	53 b	0
<b>Common bean</b>	15.0 b	25.0 a	26.5 a	22.2	90 bc	0 d	0 c	0
<b>Chickpea</b>	8.3 cd	8.7 c	10.8 c	13.4	117 b	143 b	127 a	0
<b>Soybean</b>	5.9 d	9.7 c	12.8 c	17.6	290 a	223 a	151 a	0
<b>Sorghum</b>	35.6 a	29.2 a	25.1 a	16.4				
significance <i>p</i>	***	***	***		***	***	***	

3.4. Legume species had different ability to retrieve inorganic N from the soil and fertiliser

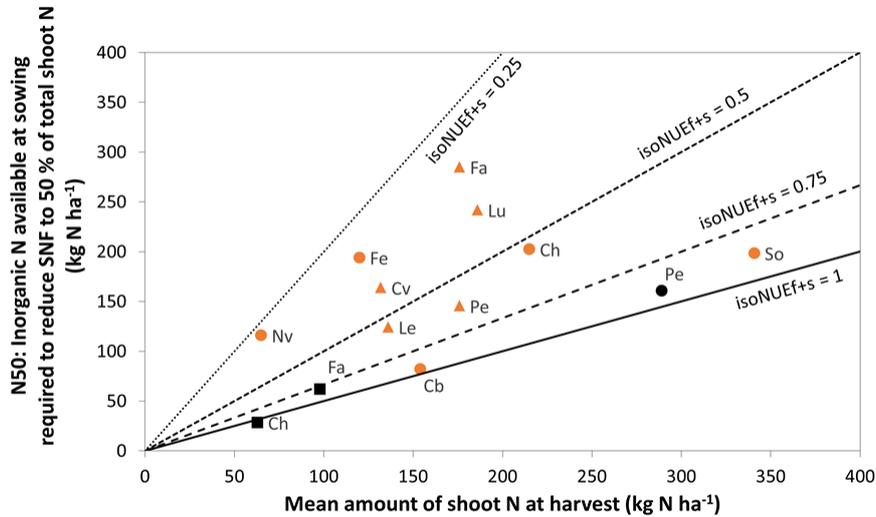
For legumes sown in March, when no N fertiliser was applied (0N treatment, curve intercept), no differences among species were observed for the amount of inorganic N uptake from the soil, being in average 41 kg N ha<sup>-1</sup> for all legume species (Fig. 5A). Barley retrieved a slightly higher amount of soil inorganic N (51 kg N ha<sup>-1</sup>) compared to legumes sown in March (Fig. 5A). For legumes sown in May, two distinct groups of legumes were identified for the 0N treatment (Fig. 5B). The first group included chickpea, fenugreek and Narbonne vetch, with an average soil N uptake of 32 kg N ha<sup>-1</sup>. The second group was composed of common bean and soybean, with a twice as high soil N uptake for the 0N treatment (68 kg N ha<sup>-1</sup> in average). Sorghum had the highest soil N uptake for the 0N treatment (95 kg N ha<sup>-1</sup>).



**Fig. 5** Amount of N derived from the soil and the fertiliser (Ndfsoil + fertilizer) measured at harvest as affected the amount of inorganic N available at sowing (soil inorganic N in the top 60 cm soil layer at sowing + inorganic N applied as fertiliser (0, 50, 150 and 300N)) for the ten legumes crops and two cereals either sowed in March (A) or in May (B) in the 2014 field experiment. Values are means (n = 4) ± SD (standard deviation). Numbers indicate the value of the slope for each species. For common bean, the slope was calculated using only the 0N and 50N treatments as Ndf(Soil + fertiliser) did not show any further increase at higher fertilisation rates (150N and 300N treatments). Species ID is given in Table 1.

For both sowing dates, a positive linear relationship between the amount inorganic N retrieved by the legumes and cereals species (Ndfsoil+fertiliser) and the amount of inorganic N available at sowing was observed for all species (Fig. 5). As the amount of inorganic N available at sowing was experimentally varied by N fertilisation, the slope of the linear relationship was considered as an indicator of N uptake efficiency of the fertiliser (NUEf) (Fig. 5). For species sown in March (Fig. 5A), NUEf ranged from 0.13 to 0.53 (common vetch and pea, respectively) with barley having an intermediate NUEf of 0.33. For

legume sown in May, greater differences were observed among species (Fig. 5B). NUEf was 0.08, 0.31, 0.58, 0.83 and 1.03 for Narbonne vetch, fenugreek, chickpea, soybean and common bean, respectively. Hence, common bean had the highest ability to retrieve N fertiliser closely followed by soybean. Sorghum had among the highest NUEf (0.69) among species sown in May.



**Fig. 6** Relationships between the amount of inorganic N available at sowing for which % Ndfa was equal to 50 % and the mean amount of shoot N at maturity for four N fertilisation rates for the ten legumes either sowed in March (▲) or in May (●) in the 2014 field experiment. Species ID is given in Table 1. Points from Schwenke et al. (1998) for faba bean and chickpea (■) and Voisin et al. (2002b) for pea (●) were added for comparison. The curves represent different iso-inorganic N uptake efficiency (isoNUEf+s).

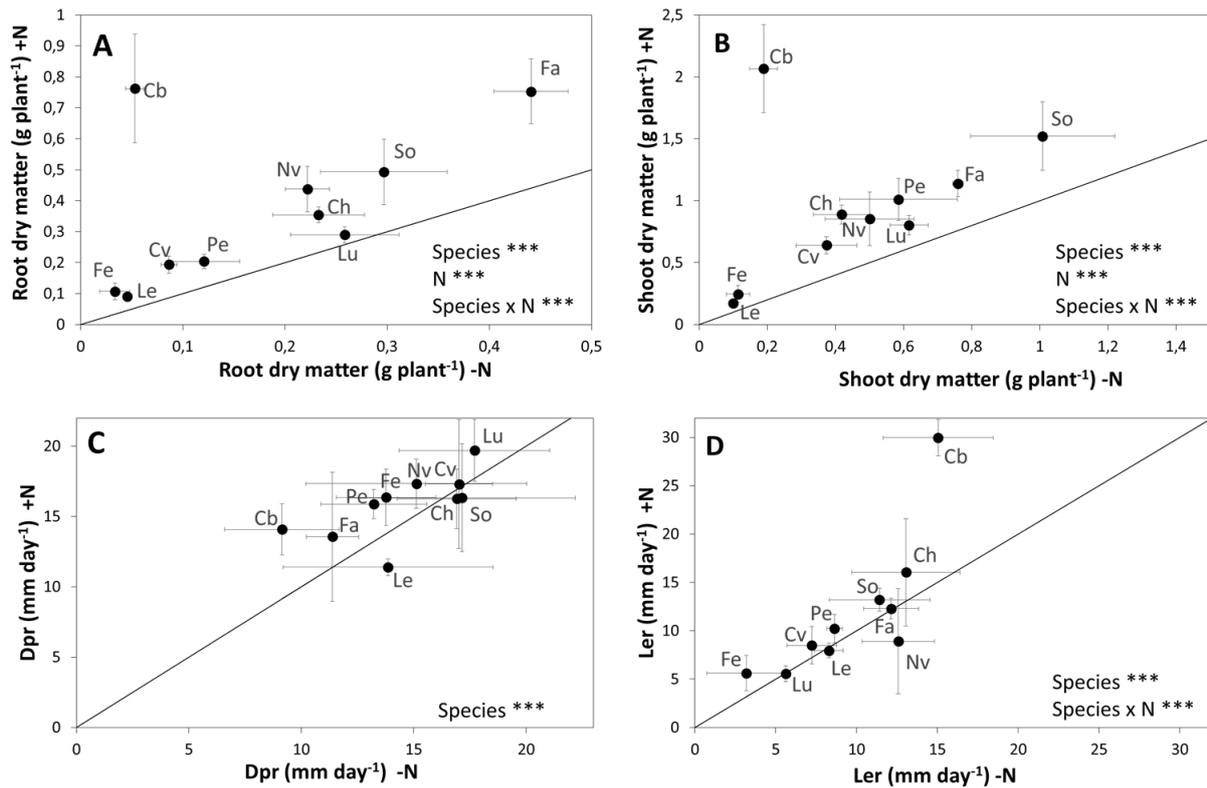
### 3.5. Variations in root soil exploration among species and as influenced by N fertilisation

In the rhizotron experiment, root DM for the -N treatment ranged from 0.033 to 0.441 g plant<sup>-1</sup> (Fig. 7A). Fenugreek, lentil and common bean had the smallest root DM (0.044 g plant<sup>-1</sup> in average). Root DM of Narbonne vetch, chickpea, lupin, soybean and faba bean was at least 6 times higher than fenugreek, with faba bean displaying the highest root DM. For all species except lupin, root DM was at least 1.5 higher for the +N treatment compared to the -N treatment. Common bean root DM responded the most to fertilisation and displayed a root DM 14 times greater for the +N treatment compared to the -N treatment.

Legume species displayed differences in shoot DM with values ranging from 0.100 g plant<sup>-1</sup> (lentil) and 1.008 plant<sup>-1</sup> (soybean) (Fig 7B). Unlike in the field experiments, for all species shoot DM was at least 1.3 greater for the +N treatment compared to the -N treatment. For the -N treatment, shoot DM constituted in average 73% of total DM with values ranging from 63% (faba bean) to 83% (pea) and the ratio was unchanged when N legumes were fertilised (data not shown).

Legume species also differed according to root depth penetration rate (Dpr) and lateral expansion rate (Ler). Nitrogen fertilisation had no effect on those variables except for common bean which had a

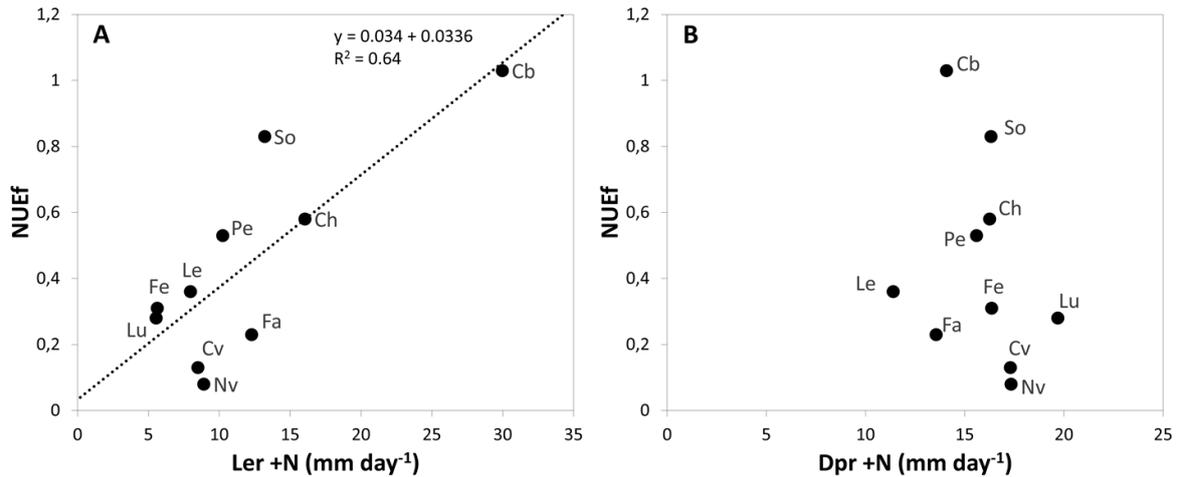
much higher root Ler when fertilised. (Fig. 7C and D). The highest root Dpr were measured for lupin, soybean, common vetch and chickpea (17.3 mm day<sup>-1</sup> in average), while common bean, faba bean and lentil had the lowest root Dpr (Fig. 7C). Common bean had the highest root Ler for both N treatments (15.0 mm day<sup>-1</sup> for -N vs 30.0 mm day<sup>-1</sup> for +N) (Fig. 7D). On the contrary, fenugreek and lupin had the lowest root Ler with no significant differences between N treatments (3.2 and 5.6 mm day<sup>-1</sup>, respectively, for the -N treatment and 5.6 and 5.5 mm day<sup>-1</sup> for the +N treatment).



**Fig. 7** Root dry matter (A), shoot dry matter (B), Depth penetration rate (Dpr)(C), Lateral expansion rate (Ler) (D) with (+N) or without N fertilisation (-N) for ten legume species grown in rhizotrons. Values are means ( $n = 4$ )  $\pm$  SD (standard deviation). Analysis of variances (ANOVA) was performed for each plant trait and the results for the significant main effects (species and N fertilisation) and their interaction (Species x N) are shown as \*\*\* $p < 0.001$ . Species ID is given in Table 1. See Appendix 4 for further root characteristics.

### 3.6. Correlation between N uptake efficiency of the fertiliser (NUEf) and root soil exploration rates

To evaluate whether root elongation rates could account for the differences among species in N uptake efficiency of fertiliser (NUEf) measured in the field experiment, NUEf was plotted as a function of depth penetration rate (Dpr) and lateral expansion rate (Ler) (Fig. 8). As N fertilisation did not affect Dpr and Ler except for common bean (Fig. 7C and D), rates measured for the +N treatment in rhizotrons were selected. A clear positive relation between NUEf and Ler was highlighted (Fig. 8A). Species with higher Ler tended to have higher NUEf (Common bean, Soybean and Chickpea). However no relationship between NUEf and Dpr could be drawn (Fig. 8B).



**Fig. 8** Correlation between N uptake efficiency of the fertiliser (NUEf) measured in the field experiment and lateral expansion rate (Ler) (A) or depth penetration rate (Dpr) (B) measured in rhizotrons supplied with N fertilisation (+N) for ten legume species. Legumes were either sown in March (●) or in May (▲) in the 2014 field experiment. Values are means (n = 4) in both field and rhizotrons experiments. Species ID is given in Table 1.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Plant growth and N nutrition were affected by climatic conditions

For all legume species, the increase of soil inorganic N availability modified the N source, thereby sustaining plant growth through complementing symbiotic N<sub>2</sub> fixation with inorganic N uptake. However, dry and warm climatic conditions in our field experiment this particular year may have differently impacted both growth and plant N nutrition according to the N source. Water deficit and high temperatures are known to reduce plant growth but also SNF and inorganic N uptake (Hartwig, 1998; Salon et al., 2011). Yet, legumes sown in March were able to match plant requirements for all N treatments (affecting the source of N: SNF or inorganic N). For legumes sown in May, N requirements for growth were not met at the beginning of plant growth especially when legume N nutrition relied mostly on SNF (0N treatment). Legumes were sown after a long period without rainfall, which might have had a particularly strong negative effect on SNF since root nodules are generally positioned at a relatively shallow soil depth (20 to 30 cm depth), making SNF very sensitive to water deficit (Streeter, 2003). In general, SNF is often more sensitive to environmental conditions than inorganic N uptake (Sprent et al., 1988). However, at flowering, N requirements were met for common bean, soybean and Narbonne vetch for all N treatments, with a situation of excess N uptake compared to the optimal for the highest N treatment. SNF seems to have been able to meet N requirements later in the growth cycle suggesting the ability of SNF to recover from stresses at earlier stages of growth (Naudin et al., 2011). It may be due to the decrease of water deficit once precipitations started 3 weeks before full flowering. Chickpea is the only crop for which N requirements were only met when a least 150 kg N ha<sup>-1</sup> were applied at sowing.

As such, in our experiment, plant growth was presumably reduced first by dry and warm climatic conditions as SNF and inorganic N uptake appeared to be sufficient to meet the reduced N requirement for growth. This was not the case at the beginning of the growth cycle for legumes sown in May when N deficiency was observed, presumably because of a stronger effect of environmental stresses (water limitation) on SNF or inorganic N uptake than on plant growth. More favourable climatic conditions would have certainly induced higher shoot growth and thus higher SNF to meet the greater N demand.

#### 4.2. N fertilisation did not increase the amount of shoot N for most legume species

In our field experiment, for barley and sorghum, shoot dry matter and N was highly increased by N fertilisation, showing growth limitation by nitrogen for cereals species. This was an expected result as inorganic N is their only source of N.

By contrast, the increase of N fertilisation at sowing did not change the amount of shoot N at maturity for most legume species (common vetch, fenugreek, lentil, lupin, Narbonne vetch and soybean). It shows a complete substitution of soil inorganic N uptake by SNF as the amount of soil N decreases. Accordingly, studies on lupin (Evans et al., 1987a), and soybean (Salvagiotti et al., 2008) showed little impact of N fertilisation on shoot N, total biomass or grain yield. A slight increase of shoot N for the highest N supply only (300N), was observed for three species (common bean, faba bean and pea). For pea, the increase of shoot N for the highest N supply was related to an excess development of the aerial vegetative parts but no significant increase in grain yield (Appendix 3). Therefore it could suggest a supra-optimal N nutrition for the highest N treatment as reported by Voisin et al. (2002a). However, this type of response (increased vegetative growth, indicating supra-optimum N nutrition) was not observed in common bean or faba bean.

Surprisingly, in the field experiment, common bean DM was not increased by N fertilisation; conversely, it was reduced for the highest N supply (300N) compared to the 50N treatment. Yet, it was compensated by an increase in N concentration leading to an overall increase in total shoot N for the 300N treatment. In general, N fertilisation was reported to have a very strong impact on common bean shoot N and grain yields even for low N supply (Fageria et al., 2015; Leidi and Rodriguez-Navarro, 2000; Redden and Herridge, 1999). Redden and Herridge (1999), assumed that for common bean, SNF is often poorly efficient, likely due to the selection of plant genotypes in high fertility soils that resulted in the decline of the N<sub>2</sub> fixation efficiency. Thus, N fertilisation is often required to satisfy common bean N requirements for growth. On the other hand, in our experiment, soil inorganic N content at sowing for the 0N treatment (84 kg N ha<sup>-1</sup>) was much higher than in the cited studies. Since it corresponded to half of the total amount of shoot N at maturity for common bean, soil inorganic N availability might have been sufficient to satisfy N needs even with low amounts of fixed N.

The high initial soil inorganic N in the 0N treatment (69 kg N ha<sup>-1</sup> and 84 kg N ha<sup>-1</sup> for sowing dates in March and May, respectively) might have avoided early N stresses especially during the establishment of nodulation and SNF when legume plants only rely on N from the seed or from the soil (Moreau et al., 2008). Greenhouse experiments on pea showed that a small amount of N fertilisation at sowing (N starter) could enhance growth, especially when the amount of inorganic N available at sowing was zero or very low (Jensen, 1986; Voisin et al., 2003b), in agreement with our findings in the greenhouse experiment.

In our field experiment, chickpea shoot N was increased by up to 57% when N fertilised compared to the unfertilised treatment, while Turpin et al. (2002) did not observe these effects in their field experiment. For all N fertilisation rates, SNF of chickpea increased much later during the growth cycle compared to the other legume species (data not shown). In the unfertilised treatment, the N deficiency which limited growth, apparently occurred before SNF establishment. Once SNF was established, N requirements might have been met, but the growth restriction experienced during the early stages restricted shoot growth until maturity.

#### 4.3. SNF inhibition by inorganic N varies according to plant growth and plant inorganic N uptake ability

Our data confirmed the inhibition of SNF by inorganic N for a wide range of legumes species but clear differences of SNF inhibition were observed among species. The comparison of the ten species cultivated in the same pedoclimatic conditions allowed us to identify some plant characteristics that could explain such differences of SNF inhibition by inorganic N.

To evaluate to what extent plant N requirements accounted for the differences of SNF inhibition by inorganic N, the indicator of inhibition intensity, N50, was related to plants mean amount of shoot N at maturity, as averaged for the four N fertilisation rates (Fig. 6). There was a positive trend between those variables, showing that for legume species with higher mean amount of shoot N a greater amount of inorganic N available at sowing is needed to reduce their SNF to 50%. This result is in accordance with the analysis from Schwenke et al (1998), explaining that faba bean was more dependent on SNF than chickpea partly due to its higher N requirements.

However, when 300 kg N ha<sup>-1</sup> were applied, soil inorganic N available at sowing was 30 to 80% higher than the amount of shoot N at maturity except for soybean. Hence, legumes were cultivated in non-limiting N conditions. However, common vetch, faba bean and lupin still partly relied on SNF when 300 kg N ha<sup>-1</sup> were applied. Yet, the amount of shoot N in those three species was only 50% of that in soybean for which SNF was equal to zero for the 300N treatment.

Thus, the ability of legumes to access and/or take up inorganic N during their growth cycle might also account for the differences of SNF response to soil inorganic N. Our field experiment allowed us to

classify ten legume species according to their inorganic N uptake efficiency by positioning each species relative to isoNUEf+s curves (Fig. 6). Faba bean, lupin, fenugreek and Narbonne vetch had a NUEf+s lower than 0.5 while chickpea, common bean, common vetch, lentil, pea and soybean had NUEf+s equal or higher than 0.5 (Fig. 6). Here, common bean was identified as the most efficient to take up inorganic N which could partially explain its low N<sub>50</sub>. The high ability to take up inorganic N was also observed in a field experiment by George and Singleton (1992). Consistently, our results indicate that the relatively low inhibition of N<sub>2</sub> fixation by soil inorganic N (indicated by high N<sub>50</sub>) usually observed on faba bean compared to other species such as chickpea and pea (Chalifour and Nelson, 1988; Schwenke et al., 1998; Turpin et al., 2002) can be partly explained by relatively low NUEf+s efficiency in faba bean.

Our results suggest that the ability to retrieve inorganic N (NUEf+s) and shoot N accumulation potential might be key elements to understand the interspecific differences of SNF inhibition by soil inorganic N. Legume species can have similar ability to retrieve soil inorganic N, but shoot growth and thus N accumulation can differ according to the physiology of each species (e.g. soybean vs common bean in our field experiment). Hence, for legumes with greater shoot growth and N accumulation, higher amounts of N<sub>2</sub> fixation are required, as soil inorganic N is not sufficient to meet N needs (e.g. common bean compared to soybean). On the contrary, for legume species having substantially similar shoot growth (e.g. faba bean and pea in our field experiment), lower amounts of N<sub>2</sub> fixation results when species have higher ability to retrieve soil inorganic N (e.g. pea compared to faba bean).

As plant growth and thus the amount of shoot N are likely to vary according to each specific pedoclimatic conditions for every species, data collected on pea on the same experimental site (France) (Voisin et al., 2002b), and published data on chickpea and faba bean, cultivated in the region of New South Wales (Australia) (Schwenke et al., 1998) were added on Figure 6. To our knowledge, these two studies were the only ones for which a quantitative relationship was established between SNF and the amount of soil inorganic N available at sowing, enabling to determine N<sub>50</sub> and to relate it to shoot N. Moreover, initial amount of soil inorganic N at sowing is often not specified in the published studies (Evans et al., 1987a; Salvagiotti et al., 2008). Compared to our experiment, the amount of shoot N was higher (+ 40%) for pea in Voisin et al. (2002b) but lower for faba bean (-45%) and chickpea (-70%) in Schwenke et al. (1998). Plant growth and shoot N in the various field experiments might have been affected by the different climatic conditions and by cultivar choice. Especially, the abiotic stresses described earlier may have impacted pea growth in our experiment, which may partly explain the lower amount of shoot N and N<sub>50</sub>, compared to Voisin et al. (2002b). Despite this difference in growth induced by climatic conditions, NUEf+s of pea were in the same range in both studies. As such, our study proved efficient to identify NUEf+s as a stable characteristic of the pea species, in a single site. In addition, it demonstrates the predictive value of our method, to estimate variation of N<sub>50</sub> of a given

species grown in different environmental conditions as indicated by shoot N variation along the isoNUEt curve.

Conversely, NUEf+s were much higher for faba bean and chickpea in Schwenke et al. (1998), as compared to our study. Variations of NUEf+s between studies could partly be explained by the fact that the established relationship (Fig. 6) does not take into account N mineralisation during growth cycle, but only inorganic N available at sowing. Due to differences in soil characteristics and climatic conditions, soil N mineralisation potential during legume growth is site specific, and this might affect the NUEf+s that we calculated. In comparison to our study, a site with higher N mineralisation potential might reduce SNF to 50% for lower inorganic N available at sowing. In such conditions, legumes could present higher NUEf+s than in our study. Nevertheless, NUEf+s ranking between fababean and chickpea was the same for both sites. Hence, the set of indicators that we propose (combining SNF response to soil inorganic N (N50), shoot N and NUEf+s), appears to allow a robust evaluation of species differential response to soil inorganic N within a single site, and a robust ranking when compared in different sites. Using this set of indicators for more precise interspecific comparisons across several sites would require integrating soil N mineralisation during crop growth cycle in the calculation of NUEf+s, but data are not always available for this calculation.

#### 4.4. Inorganic N uptake efficiency and root elongation rates

For all legume crops root DM was increased by N fertilisation in the greenhouse experiment. This is in accordance with observations made on pea (Jensen, 1986; Voisin et al., 2002a) or other legume species (Dayoub et al., 2017). However, the ratio between root and shoot was unchanged between both N treatments, meaning that for all species, the increase in root DM was a consequence of shoot DM response to nitrogen fertilisation. On the contrary, root soil exploration rates (Dpr and Ler) were not affected by N fertilisation except for common bean which presented a higher Ler when N fertilised. Hence, interspecific differences appeared to be relatively independent from root and shoot growth variations among species.

Yet, soil colonisation by roots greatly varied among legume species and a rapid lateral soil colonisation was positively correlated with the ability to retrieve inorganic N. Common bean had the largest Ler leading to a wide volume of soil exploration, which was associated to the highest NUEf measured in the field. Soybean and chickpea also had high Ler which were associated to high ability to retrieve inorganic N, as reported by Dayoub et al. (2017). On the contrary, fenugreek and lupin had slow lateral root expansion rate leading to low nitrogen uptake in the field experiment. Dayoub et al. (2017) also showed low ability to deplete soil inorganic N at the beginning of the growth cycle for fenugreek compared to chickpea, pea and soybean. On the other hand, interspecific variation in soil depth colonisation by roots evaluated in rhizotrons could not be related to the differential species ability to

retrieve inorganic N measured in our field experiment. Part of these results may be related to specific climatic conditions of our field experiment. Indeed, climatic conditions in the field experiment were very dry before July. Nitrogen fertilisation applied at sowing on soil surface may not have been leached into deeper soil layers during the early stages of legume growth. Hence, species with large lateral expansion might have been able to better retrieve soil inorganic N in the upper layers while deeper root systems induced no further benefit in soil inorganic N uptake. Still, deeper root systems might play a key role for water uptake in deeper soil layers especially under dry conditions such as in 2014 in the field experiment. Moreover, in wetter conditions, legumes with deeper root systems should have a better access to soil inorganic N leached into deeper soil layers. Yet, in our experimental setup, differences among legume species according to soil depth colonisation by roots were small and might have been less discriminant for water and N uptake in deeper soil layers. Larger differences in soil depth colonisation might have been observed between grain legumes and cereals, as cereals generally display deeper root systems compared to grain legumes (Fan et al., 2016). Their deeper root systems could partly explain the higher ability of cereals to retrieve soil inorganic N compared to legumes (Hauggaard-Nielsen et al., 2001). In our field experiment, sorghum retrieved the highest amounts of soil inorganic N compared to legumes for all N treatments, due to combined high N<sub>u</sub>E<sub>f</sub> and high shoot growth (and therefore N accumulation). On the other hand, barley had a relatively low N<sub>u</sub>E<sub>f</sub> but it was equal or higher than most of the legumes from the same sowing date. For this cereal species, N<sub>u</sub>E<sub>f</sub> may have been physiologically limited by its lower N accumulation compared to legumes.

Roots are known to be very plastic to environmental factors. Root architecture can be modified by soil structure and texture, heterogeneous distribution of nutrients and water (López-Bellido et al., 2004) and the presence of microorganisms. Nevertheless, our rhizotron experiment allowed us to make a comparative evaluation of the root soil exploration rates of ten legume species. However, root soil exploration rates may still not be sufficient to explain all the differences of inorganic N uptake ability. Indeed, traits such as root length density defined as root length per unit of soil volume ( $\text{mm cm}^{-3}$ ) is often considered as an indicator of nutrient uptake potential (Reich, 2014). For a same root biomass, roots with smaller diameter and low tissue density have a greater root length density and thus a higher contact area with the soil. Faba bean is characterised by large root diameter (Materrechera et al., 1992; Materrechera et al., 1991), and thus potentially low root length density. This could partly explain its low ability to take up inorganic N while having similar L<sub>er</sub> to pea. In the rhizotron experiment, root traits were also measured during the early vegetative stages while, in the field experiment, the ability to take up inorganic N was determined over the whole growth cycle. Yet, root establishment mainly occurs during vegetative growth and reaches a maximum development at flowering. Also, the impact of inorganic N on SNF mainly occurs at the beginning of the growth cycle, since legume N nutrition primary relies on soil inorganic N before establishing SNF (Voisin et al., 2002b). As such, even if not

perfect, our experimental set up in the rhizotron allowed us to explain some of the differences in the ability of legumes to uptake inorganic N and to relate them to interspecific variation in the intensity of SNF inhibition by soil inorganic N.

## 5. Conclusion

We provided here a better understanding of SNF inhibition by soil inorganic N and its variations among a wide range of legume crops, through comparison in a single field experiment. For this, we evaluated and disentangled the two main factors that modulate the amount of N fixed required to meet the overall plant N needs: (i) shoot N accumulation (that primarily determines the size of the N sink), and (ii) inorganic N uptake efficiency, which modulates the size of accessible inorganic N pool (as a N source) and therefore the remaining N to be fixed to meet plant N needs. An indicator of inorganic N uptake efficiency was computed in an original way, using the response of SNF to a wide range of inorganic N availability. For a given level of shoot N accumulation, inorganic N uptake efficiency largely varied among species and explained most of the remaining difference of SNF inhibition by soil inorganic N. The ability to take up inorganic N is all the more important in agronomic situations with high soil inorganic N. A low efficiency of inorganic N uptake might enhance SNF to meet plant N requirements but it might also lead to N losses from the plant-soil system. Nitrate leaching is often an undesirable environmental risk in grain legume based rotations compared to adjusted N fertilised cereal based rotations (Plaza-Bonilla et al., 2015). Indeed, the superficial development of legume root systems compared to cereals can lead to greater amount of inorganic N remaining in deeper soil layers and partly explain the higher risk of nitrate leaching (Hauggaard-Nielsen et al., 2001). Interestingly, our field experiment highlighted great differences in the ability of inorganic N uptake among legume species. Based on our findings, higher risk of N leaching during the growth cycle can be expected for faba bean, fenugreek and Narbonne vetch compared to soybean or common bean. Even for the unfertilised treatment, almost 75% of inorganic N available at sowing could be left in the soil, for legumes with the lowest ability to retrieve inorganic N (around 55 kg N ha<sup>-1</sup> in our case). Adapted agronomical practices, such as intercropping (Hauggaard-Nielsen et al., 2009) are required to reduce the risk of N leaching for legumes with a low inorganic N use efficiency.

## Acknowledgements

M. Guinet was granted by INRA and the Ministry in charge of Agriculture. This experimental work was supported by the ANR LEGITIMES, INRA Bourgogne-Franche-Comté Region (PSDR project ProSys), the European Community under the grant agreement n°FP7-613551 (LEGATO project), and Terres Inovia. We thank G. Adeux, F. Bizouard, M. Chanis, A. Coffin, M. Dourneau, C. Ducourtieux, S. Girodet, C. Jeudy, M Lefebvre, F. Lombard, P. Mathey, E. Pimet for their excellent technical assistance, M. Lamboeuf for his help in image analysis.



## Chapitre 2: Shoot and root residue-N mineralisation of ten legumes and two cereals as a function of their biochemical characteristics

Ce chapitre correspond à un article en préparation pour soumission à une revue internationale

# Shoot and root residue-N mineralisation of ten legumes and two cereals as a function of their biochemical characteristics

<sup>1</sup>Maé Guinet • <sup>1</sup>Anne-Sophie Voisin • <sup>1\*</sup>Bernard Nicolardot

<sup>1</sup>Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche Comté, F-21000 Dijon, France

\*Corresponding author: [bernard.nicolardot@agrosupdijon.fr](mailto:bernard.nicolardot@agrosupdijon.fr); Tel: +33 (0)3 80 77 23 48; Fax: +33 (0)3 80 77 25

51

## Abstract

**Aims:** Our objective was to quantify and characterise shoot and root residues of a wide range of grain legumes to better estimate residues-N mineralisation compared to cereals.

**Methods:** Shoot and root residues from ten legume and two cereal crops were collected either under field conditions or from an outer pot experiment. Residues were incubated in soil for 112 days at 28°C. Biochemical characteristics were determined and related to N mineralisation.

**Results:** Root residues accounted for a small proportion (10% on average) of total residues-N but root N varied greatly among species and experiments. Root and shoot residue decomposition mostly induced N immobilisation with higher values measured for cereals, lupin and soybean. Residue-N mineralisation was negatively correlated with their C:N ratio and cellulose fraction. For a given C:N ratio, roots having higher lignin fractions induced higher N immobilisation compared to shoot residues. Combining field experiments and incubations allowed us to estimate the amount of N derived from residue decomposition available for the following crop.

**Conclusion:** The biochemical properties of shoot and root residues can help predict N mineralisation. Due to the specific biochemical characteristics of legume residues, higher amounts of inorganic-N are available after legume residue-N mineralisation compared to cereals but with large differences among legume species.

## Keywords

Incubation, Grain legumes, Decomposition, C:N ratio, Lignin

## Abbreviations

DM	Dry matter
NHI	Nitrogen harvest index

## 1. Introduction

Thanks to their ability to fix dinitrogen ( $N_2$ ) from the atmosphere and their residues rich in organic N, legumes contribute to more sustainable agriculture, by notably allowing the reduction of N fertilisers (Gan et al., 2015; Peoples et al., 2009b; Voisin et al., 2014).

In crop rotations including annual grain legumes, a substantial amount of N can be left in the field by shoot and root residues after grain harvesting (Espinoza et al., 2012; Peoples et al., 2001; Rochester et al., 2001; Williams et al., 2014). However, crop residue-N is not directly available for the following crop as it requires microbial conversion of organic-N into inorganic-N to make it available for crop uptake (Kumar and Goh, 2000). However, quantifying the amount of N derived from crop residue mineralisation and available for the following crop is difficult to predict.

After their incorporation in the soil, crop residues start to decompose first with a rapid decline of residue-N during the first few weeks followed by a much slower decrease of residue-N in the longer term (Lupwayi et al., 2006; Lupwayi and Soon, 2009). As residues decompose, their recalcitrant fraction increases, thus limiting further residue decomposition. Moreover, much of the inorganic N released from crop residue mineralisation is immobilised by the soil microbial biomass, at least temporarily (Nicolardot et al., 2001). Nitrogen mineralisation and N immobilisation are concomitant processes, but the biochemical characteristics of residues such as residue-N concentration and C:N ratio partially determine the dominant process (Jensen, 1997a; Kumar and Goh, 2000). During residue decomposition, carbon compounds are rapidly used by soil microbes for their respiration and growth (Fillery, 2001). Residue organic-N is also rapidly assimilated to fulfil soil microbial-N requirements. Hence, for residues with high C:N ratio, N released from residue decomposition is not sufficient to meet microbial-N requirements for growth. N limitation is thus overcome by the assimilation of soil inorganic-N when available, inducing net N immobilisation. Conversely, for crop residues with a low C:N ratio, N released from residue decomposition exceeds microbial-N requirements, leading to net N mineralisation. Since legumes are generally characterised by residues with high N concentrations and a low C:N ratio compared to cereals (Abiven et al., 2005; Herridge et al., 2008; Jensen et al., 2004; Nicolardot et al., 2001; Turpin et al., 2002), they are expected to result in higher N mineralisation fluxes. Other biochemical characteristics of residues, such as lignin, hemicellulose and soluble compounds, can also influence N mineralisation by soil microflora.

In order to estimate potential crop residue-N mineralisation dynamics, incubations in controlled and non-limiting N conditions have often been carried out on shoot residues. However, most of these incubation experiments focused on cover crops used as green manure or on a very limited number of mature legume residues, such as pea and soybean (Abiven et al., 2005; Justes et al., 2009; Nicolardot et al., 2001; Redin et al., 2014b). The biochemical characteristics of plant tissues tend to change during crop growth (Luna-Orea et al., 1996). As the plant matures, straw-N concentration tends to decrease

while the cellulose, hemicellulose, and lignin fractions increase (Nicolardot et al., 2001). Therefore, results obtained from legume cover crops-N mineralisation cannot be transposed to mature legume residues. Several studies included a larger number of mature legume residues (Jensen et al., 2005; Palm et al., 2001). However, it was not possible to compare residue-N mineralisation between legume species based on the previous studies as the results from all legume species were presented as an average value and compared with other botanical families. However, biochemical characteristics may vary widely between mature legume residues, which might induce differences in their N mineralisation dynamics.

Many authors have emphasised the importance of taking into account the contribution of the belowground compartment to better estimate residue-N mineralisation (Evans et al., 2001; Peoples et al., 2001; Walley et al., 2007). A few studies have measured the amount of N left over by roots after legume harvesting (Armstrong et al., 1994; Izaurralde et al., 1992; Russell and Fillery, 1996; Voisin et al., 2002a). Moreover, root residue-N mineralisation has been given little attention compared to aboveground residues (Palm et al., 2001; Zhang et al., 2008). Some authors have studied root decomposition in field conditions (Jani et al., 2016; Jani et al., 2015) but few studies were carried out on mature legume root residues (Abiven et al., 2005) while others focused on C mineralisation only (Aulen et al., 2011; Redin et al., 2014a). Nonetheless, grain legume root decomposition could contribute to the release of N in the soil. As biochemical characteristics may vary among legume root residues, differences in N mineralisation should be expected when considering a wide range of legume species.

Therefore, our aim was to quantify the amount of N left by shoot and root residues after grain harvesting for ten legume crops and two cereals. To do this, shoot and root residues of mature plants were grown either in field conditions or in outer pots. The biochemical composition of shoot and root residues was assessed to evaluate the intra-specific variations among legumes and the differences between legumes and cereal crop residues. Shoot and root residues were also compared. Residue-N mineralisation was measured in incubations under controlled conditions and related to residue biochemical characteristics. Measurements from the field experiment (N amounts present in residues) and from soil incubations (N mineralised from residues), were combined to estimate the amounts of N that potentially mineralised from shoot and root residues and available for the following crop, after the incorporation of residues in the soil.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Field experiments

#### 2.1.1. Site

Two field experiments were carried out at the INRA experimental site of Bretenière (Eastern France; 47.241 N, 5.115 E, altitude = 206 m) in 2014 and 2016. The soil is classified as a Cambisol (Eutric) (WRB, 2006) with a clayey surface layer (depth =  $0.65 \pm 0.15$  m) developed on an alluvial coarse layer. In 2014, the soil had the following characteristics: clay =  $425 \text{ g kg}^{-1}$ , silt =  $515 \text{ g kg}^{-1}$ , sand =  $60 \text{ g kg}^{-1}$ , organic C =  $19.3 \text{ g kg}^{-1}$ , organic-N =  $1.69 \text{ g kg}^{-1}$ , pH = 7.3,  $\text{CaCO}_3 < 1 \text{ g kg}^{-1}$ . In 2016, the soil characteristics were: clay =  $512 \text{ g kg}^{-1}$ , silt =  $428 \text{ g kg}^{-1}$ , sand =  $60 \text{ g kg}^{-1}$ , organic C =  $19.6 \text{ g kg}^{-1}$ , organic-N =  $1.81 \text{ g kg}^{-1}$ , pH = 7.8,  $\text{CaCO}_3 = 4 \text{ g kg}^{-1}$ .

#### 2.1.2. Treatments and experimental design

The following ten legume species: chickpea (*Cicer arietinum*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), common vetch (*Vicia sativa*), faba bean (*Vicia faba*), fenugreek (*Trigolia foenum-graecum*), lentil (*Lens culinaris*), lupin (*Lupinus albus*), pea (*Pisium sativum*), soybean (*Glycine max*) and Narbonne vetch (*Vicia narbonensis*) were included in both experiments (see Table 1 for cultivars). They were sown either in March or in May, depending on the physiology of each species. In the 2014 field experiment, fenugreek was sown in May, while it was sown in March in the 2016 field experiment (Table 1). To ensure symbiotic  $\text{N}_2$  fixation, legumes seeds were inoculated at sowing with species-specific strains of  $\text{N}_2$ -fixing bacteria, as described in Guinet et al. (2018). Two fertilised cereal crops: barley and sorghum (*Sorghum bicolor*) (later called Barley + N and Sorghum + N) were also included in both experiments and sown in March and May, respectively (Table 1). N fertilisation was applied in the form of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  at rates of  $135 \text{ kg N ha}^{-1}$  in 2014 and  $70 \text{ kg N ha}^{-1}$  in 2016 for barley, and  $100 \text{ kg N ha}^{-1}$  for sorghum in both experiments. Irrigation was applied to reduce water stress. In the 2014 field experiment, for species sown in March, 35, 40 and 50 mm were supplied on March 26<sup>th</sup>, May 16<sup>th</sup> and June 18<sup>th</sup>, respectively. For species sown in May 2014, 40, 40 and 50 mm were supplied on May 16<sup>th</sup>, May 27<sup>th</sup> and June 14<sup>th</sup>, respectively. In the 2016 field experiment, 50 mm were supplied on July 11<sup>th</sup> on species sown in May. Weeds were controlled by hand weeding and one insecticide (Karate Zeon) was applied on April 25<sup>th</sup> 2014 and April 21<sup>th</sup> 2016. Crops were sown on 1.5 m wide and 12 m long micro-plots with four replicates per species; the sowing densities are given in Table 1.

#### 2.1.3. Samplings

At physiological maturity (Table 1), shoots were harvested on subplots of  $1 \text{ m}^2$  for all crops in both experiments. Straws were separated from grains to determine shoot residues left in the soil at maturity. Grains were harvested mechanically on the rest of the plots. No grains were harvested for

chickpea and fenugreek in 2014 and Narbonne vetch in 2014 and 2016, due to climatic conditions which were unsuitable for grain production. The whole plant was considered as shoot residues in those cases.

In the 2014 field experiment, roots were also collected at physiological maturity from soil cores using a 20 cm diameter and 40 cm deep cylinder to excavate the soil. The cylinder (8 replicates per species) was centred on a row and included 2 to 10 plants depending on plant density for each species. Soil cores were placed in saturated salted water for 24 h to facilitate clay dispersion. The roots were then gently washed free of soil with water. Shoots above the excavated soil cores were also collected to determine the root:shoot ratio. Root biomass was then calculated by multiplying shoot biomass (measure from 1 m<sup>2</sup> plots) by root:shoot ratio (measured from soil core samples).

**Table 1** Cultivar, sowing date, sowing density and harvest date for species cultivated in the 2014 and 2016 field experiments

Crop species	Cultivar	Sowing date	Sowing density (seeds m <sup>-2</sup> )	Harvest date	
<b>Field Experiment I (2014)</b>					
Common vetch	Candy	18 March 2014	100	11 July 2014	
Faba bean	Espresso		45	25 July 2014	
Lentil	Anicia		250	11 July 2014	
Lupin	Feodora		70	1 August 2014	
Pea	Kayanne		80	1 July 2014	
Barley + N	Irina		350	15 July 2014	
Chickpea	Twist	5 May 2016	70	16 September 2014	
Common bean	Flavert		30	4 September 2014	
Fenugreek	Hanka		180	5 September 2014	
Narbonne vetch	Clara		35	5 September 2014	
Soybean	Sultana (000)		70	5 September 2014	
Sorghum + N	Québec		30	5 September 2014	
<b>Field Experiment II (2016)</b>					
Common vetch	Candy		15 March 2016	100	27 July 2016
Faba bean	Espresso	29 February 2016	45	2 August 2016	
Fenugreek	Fenu-Fix	15 March 2016	180	2 August 2016	
Lentil	Anicia	15 March 2016	250	27 July 2016	
Lupin	Feodora	18 March 2016	70	12 August 2016	
Pea	Kayanne	18 March 2016	80	13 July 2015	
Barley + N	Irina	15 March 2016	350	20 July 2016	
Chickpea	Vulcano	17 May 2016	55	12 September 2016	
Common bean	Flavert		30	12 September 2016	
Narbonne vetch	Clara		35	1 September 2016	
Soybean	Sultana (000)		70	12 September 2016	
Sorghum + N	Québec		30	14 September 2016	

## 2.2. Outer pot experiment

### 2.2.1. Experimental treatment

In order to better estimate the amount of N left over by root residues, a parallel experiment in outer pots was also carried out in 2016 at INRA in Dijon (France). The ten legumes species cultivated in the 2016 field experiment were grown using the same cultivars (Table 1) and Rhizobia strains. The sowing dates were very close to those of the 2016 field experiment (March 18<sup>th</sup> 2016 for common vetch, faba bean, fenugreek, lentil, lupin, pea or May 20<sup>th</sup> 2016 for chickpea, common bean, Narbonne vetch and soybean). Thus the plants were subjected to climatic conditions similar to those of the 2016 field experiment.

### 2.2.2. Growing conditions

Seeds calibrated to ensure homogenous weight were sown in 12 L pots filled with 60% attapulgite and 40% clay pebbles. Each pot contained four seeds per legume species, with 4 replicates per species. Legumes species were randomised for each sowing date. Pots were watered twice a day with a nutrient solution to avoid any water stress. The nutrient solution (0.16 mM KNO<sub>3</sub>, 0.80 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 4H<sub>2</sub>O, 1.00 mM MgSO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O, 2.27 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.62 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.20 mM NaCl) contained small amounts of N (0.625 mM) to reduce the risk of N deficiency during the early stages of plant growth, before the establishment of symbiotic N<sub>2</sub> fixation.

### 2.2.3. Samplings

At physiological maturity, the legume plants were harvested and the four plants per pot were pooled. Straws were separated from the seeds and the roots were gently removed from the soil and washed with water. During the outer pot experiment, fenugreek presented disease symptoms on shoots which greatly limited growth and seed production, hence, no data are presented for fenugreek for the outer pot experiment.

## 2.3. Processing of shoot and root residues from the field and outer pot experiments

### 2.3.1. Measurements

Shoot and root residue dry matter (DM) was determined on samples from the field and the outer pot experiments after oven-drying for 48 h at 80°C. Samples were ground (< 80 µm) and N and C concentrations measured using an elemental analyser (ANCA-GLS, Sercon Ltd., Crewe, UK). Biochemical analyses were performed on shoot residues from both the field experiments and on root residues from the outer pot experiment. Samples from the four replicates were pooled for each species from each experiment. A standard procedure (AFNOR, 2013) derived from the method proposed by van Soest (1963) was used to determine soluble compounds (SC), hemicellulose (HEM), cellulose (CEL) and lignin (LIG) fractions. The biochemical fractions were expressed as a proportion of DM.

### 2.3.2. Incubations

In 2014 and 2016, soil was collected on the first 30 cm in the field experiments. Fresh soil was sieved at 6 mm and stored for a few days at ambient temperature before use.

For each species in the 2014 field experiment, shoot residues ground to 1 mm were incubated using the soil sampled in 2014. Root residues from each legume species collected from the outer pot experiment were also incubated using the soil collected in 2016 (Table 2). All residues were incorporated in soil at a rate of 8 g DM kg<sup>-1</sup> dry soil (4 replicates per treatment and sampling date). Soil samples and crop residues were thoroughly mixed and placed in polyethylene pots before being incubated in 2 L glass jars (10 polyethylene pots per jar). A treatment without any residue (control soil) was also included in each incubation experiment to measure N mineralisation from native soil organic matter. To avoid any limitation in C decomposition and N immobilisation by microbial biomass due to soil inorganic-N deficiency, a sufficient amount of inorganic-N (> 20 mg N kg<sup>-1</sup> dry soil) was added to the soil in KNO<sub>3</sub> form before the beginning of incubation, as indicated by Nicolardot et al. (2001). Soil moisture content was monitored to ensure a constant value during the whole period of incubation, corresponding to field capacity (34 g 100 g<sup>-1</sup> dry soil). The incubations were carried out for 112 days at a constant temperature of 28°C.

Inorganic-N from the control soil and from the soil + crop residue mixtures were extracted 7, 14, 28, 58, 84, and 112 days after the beginning of the incubations using 1 M KCl (1 h shaking at ambient temperature, soil weight (g):solution volume (mL) ratio = 1:4). After 1 h of sedimentation, 10 mL of solution were sampled and stored at -20 °C until analysis.

Inorganic-N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) from the extracted solution was measured by colorimetry using a Global 240 analyser (BPC Biosed, Italy). Nitrate and nitrite were measured using an adaptation of the method of Kamphake et al. (1967) and ammonium using a method published by Krom (1980).

N mineralisation on the control soil and on the soil + crop residue mixture was calculated as the difference between inorganic-N present in soil at the different dates of incubation and inorganic-N present in soil at the beginning of incubation. Then, N mineralisation from the crop residues was calculated as the difference between N mineralisation in control soil and that in the soil + crop residue mixture. Results were expressed in percentage of total-N added by the crop residues.

**Table 2** Origin and characteristics of the crop residues incubated

Species	ID	Residues	Growth conditions	C:N ratio
Common vetch	Cv	shoots	2014 field experiment	28.6
Faba bean	Fa	shoots	2014 field experiment	34.2
Lentil	Le	shoots	2014 field experiment	31.9
Lupin	Lu	shoots	2014 field experiment	69.7
Pea	Pe	shoots	2014 field experiment	64.6
Barley + N	Ba	shoots	2014 field experiment	73.2
Chickpea	Ch	shoots	2014 field experiment	23.4
Common bean	Cb	shoots	2014 field experiment	28.8
Fenugreek	Fe	shoots	2014 field experiment	18.4
Narbonne vetch	Nv	shoots	2014 field experiment	13.6
Soybean	So	shoots	2014 field experiment	47.8
Sorghum + N	Sg	shoots	2014 field experiment	50.0
Common vetch	Cv	roots	outer pots	16.6
Faba bean	Fa	roots	outer pots	26.8
Lentil	Le	roots	outer pots	21.9
Lupin	Lu	roots	outer pots	36.4
Pea	Pe	roots	outer pots	18.7
Chickpea	Ch	roots	outer pots	25.5
Common bean	Cb	roots	outer pots	17.5
Narbonne vetch	Nv	roots	outer pots	13.1
Soybean	So	roots	outer pots	24.9

#### 2.4. Calculation of the amount of N potentially mineralised from shoot and root residues in field conditions

The potential amount of inorganic N derived from residue mineralisation corresponds to the maximum amount of N mineralised from residues in non-limiting conditions of temperature, soil moisture and soil inorganic N. It was calculated by multiplying the percentage of N mineralised from the shoot and root residues during incubation by the amount of N present in shoot and root residues at harvest in the 2014 field experiment. As the amounts of N in root residues were probably underestimated in the field experiment, amounts of N in root residues were also estimated by multiplying the amount of N in shoot residues measured in the 2014 field experiment by the N root:shoot ratio measured in the 2016 outer pot experiment.

The potential amounts of inorganic N derived from residue mineralisation was calculated from the sampling time 28 days after the beginning of the incubations. This sampling time was chosen since it is the equivalent of ten months' residue mineralisation in field conditions (period between residue incorporation in the soil and the subsequent winter wheat harvest the next summer) using the concept

of normalised days (Recous et al., 1998). The concept of normalised day allows comparing situations with contrasting temperature and soil moisture conditions, by converting the number of days with variable temperature and humidity to a number of days at a reference temperature and optimal moisture. Thus, the number of days of incubation and the number of day following residue incorporation in the 2014 field experiment were corrected by applying the following temperature  $f(T)$  and moisture  $g(\theta)$  functions:

$$f(T) = e^{(0.115(T-T_{ref}))} \quad (1)$$

where  $T_{ref}$  is the reference temperature, set at 11°C in this paper (mean annual temperature at the INRA experimental site of Bretenière).

$$g(\theta) = 0.2 + 0.8 \frac{(\theta - \theta_{WP})}{(\theta_{FC} - \theta_{WP})} \quad (2)$$

where  $\theta$  is the soil moisture content,  $\theta_{FC}$  the soil moisture content at field capacity (0.34 g 100 g<sup>-1</sup> dry soil) and  $\theta_{WP}$  (0.18 g 100 g<sup>-1</sup> dry soil) the soil moisture content at wilting point.

For the 2014 field experiment, the mean soil moisture content during the ten months following residue incorporation was 0.30 g 100 g<sup>-1</sup> dry soil. It was measured through monthly sampling of the 0-30 cm soil layer. As soil moisture content in the soil incubations was maintained at field capacity (34 g 100 g<sup>-1</sup> dry soil), no correction on soil moisture content had to be performed when we calculated normalised days.

## 2.5. Data analysis

Data analyses were performed using the R software version 3.4.2. (R Core Team, 2016). ANOVA were performed to test the effects of species, year and the interaction of species x year on residue DM. Homoscedasticity and normality of residue DM residuals were tested using a Bartlett and Shapiro-Wilk test, respectively Proportion data (i.e. shoot and root N concentration, proportion of total residue DM in roots and proportion of total residue-N in roots), were analysed using beta regression model with a logit link function from the betareg package. Where species effect was significant, differences between pairs of species were tested using post-hoc pairwise multiple comparison.

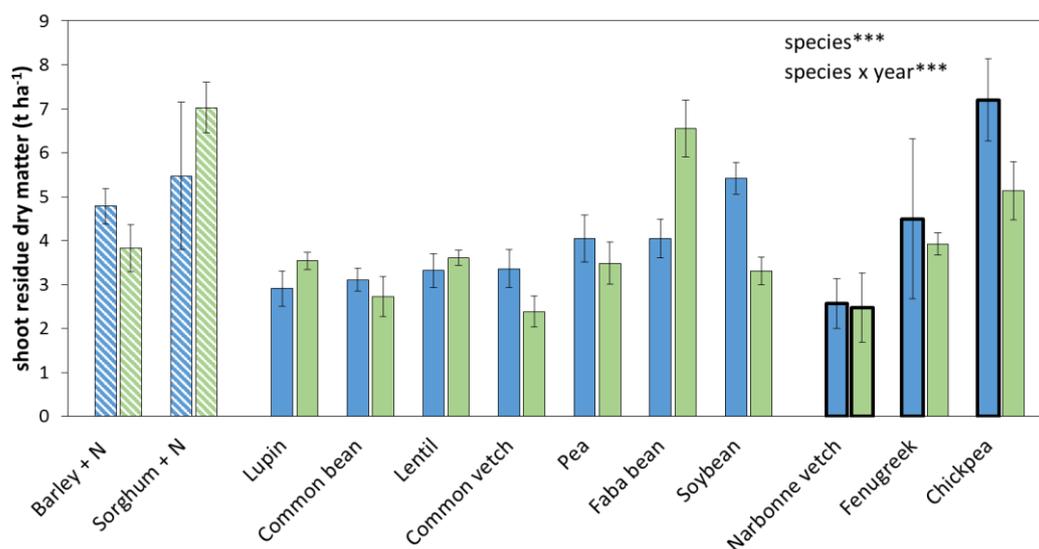
Multivariate analyses were performed to determine how residue biochemical properties differed between crop species and plant organs (shoot and root) and to analyse the correlation with residue-N mineralisation measured in the incubation experiments. Samples were ordered through a Principal Component Analysis (PCA) using the Canoco 5.10 program (ter Braak and Šmilauer, 2012). Variables were standardised to obtain equal weights in the PCA. Ascending hierarchical clustering was also performed on the data using the coordinates obtained for each axis of the PCA. To calculate the

dissimilarity matrix among residues, the Euclidian distance was implemented using the hclust function. To minimise intragroup inertia losses, Ward's minimum variance method was used.

### 3. Results

#### 3.1. Shoot residue dry matter at harvest in the field experiments

In 2014, shoot residue-DM at harvest varied greatly among species with values ranging from 2.6 t ha<sup>-1</sup> (Narbonne vetch) to 7.2 t ha<sup>-1</sup> (chickpea) (Fig. 1). The two N fertilised cereals had among the highest shoot DM with soybean and chickpea. On the contrary, common bean, common vetch, lentil, lupin, and Narbonne vetch had the lowest shoot residue-DM (on average 3.1 t ha<sup>-1</sup>). No clear distinction could be drawn according to shoot residue-DM between grain harvested legumes and legumes for which the whole plant was considered as crop residue (no grain production). Indeed, shoot residue-DM varied from 2.9 t ha<sup>-1</sup> (lupin) to 5.4 t ha<sup>-1</sup> (soybean) for the first group of legumes and from 2.6 t ha<sup>-1</sup> (Narbonne vetch) to 7.2 t ha<sup>-1</sup> (chickpea) for the second group of legumes. Shoot residue-DM was affected differently by year and according to crop species. In 2016, common vetch, chickpea and soybean presented -1, -2.1 and -2.1 t ha<sup>-1</sup> of shoot residues-DM, respectively, in 2016 compared to 2014. On the contrary, faba bean presented + 2.5 t ha<sup>-1</sup> of shoot residue-DM in 2016 compared to 2014. For common bean, fenugreek, lentil, lupin, pea, Narbonne vetch barley and sorghum shoot residue-DM was similar in 2014 and 2016.



**Fig. 1** Shoot residue dry matter measured at harvest in the field experiments in 2014 (blue) and 2016 (green) for the ten legumes (solid) and the two N fertilised cereals (hatched). Bars with a heavy dark border indicate legumes for which the whole plant was considered as a crop residue since there was no grain production. Values are means ( $n = 4$ ,  $\pm$  SD (standard deviation)). The results of the analysis of variance (ANOVA) for the significant main effects (species and year) and their interaction (species x year) are shown as \*\*\* $p < 0.001$

### 3.2. Dry matter and N distribution between shoot and root residues

In the 2014 field experiment, root DM at harvest represented a very small proportion of total crop residue-DM (shoot + root) (Table 3). Roots represented in average 6% of total crop residue-DM, with values ranging from 3% (fertilised barley) to 17% (fertilised sorghum). The proportion of N in root residues compared to the overall amount of N in crop residues (shoot + root) was even lower for most species and was 4% on average (Table 3). Values ranged from 1.5% (chickpea, fenugreek and Narbonne vetch) to 8.2% (fertilised sorghum). Compared to the proportion of plant DM present in roots, the lower proportion of plant-N present in roots was due to a higher N concentration in shoot residues compared to root residues, except for pea and fertilised barley (Table 3). Shoot-N concentration ranged from 0.6% (fertilised barley) to 3.6% (Narbonne vetch) while root-N concentration ranged from 0.3% (lupin) to 1.3% (pea). Cereals had among the lowest shoot-N concentrations with pea, lupin and soybean. On the contrary, legumes with the whole plant considered as crop residue (chickpea, fenugreek and Narbonne vetch), presented the highest shoot-N concentration values, with an average value of 2.8%. For these three species, the considerable differences between shoot- and root-N concentrations explained the even lower proportion of N in root residues in comparison to the other species.

In the 2016 outer pot experiment, root residues constituted a higher proportion of total crop residue-DM compared to the 2014 field experiment (Table 4). On average, root residue-DM accounted for 12% of total crop residues-DM with faba bean, chickpea, Narbonne vetch and soybean presenting the highest values. Lupin, lentil, pea, and common bean presented higher shoot residues-N concentration compared to the 2014 field experiment, while the shoot residue-N concentrations for common vetch, faba bean, chickpea and Narbonne vetch were 0.3, 0.4, 1.3 and 1.4% lower, respectively. Unlike in the 2014 field experiment, the N concentration of the root residues was on average 0.5% higher than for shoot residues, for all legume species (Table 4). Therefore, the proportion of N in root residues compared to the total amount of N in residues was much higher in the 2016 outer pot experiment than in the 2014 field experiment. Values ranged from 6% (pea) to 38% (soybean) with an average value of 17% (Table 4).

**Table 3** N concentrations and root/total residue distributions of dry matter and N amounts of plant residues, measured at harvest in the 2014 field experiment for the ten legumes and the two N fertilised cereals. Values are means (n=4)  $\pm$  (standard deviation). For each response variables, values sharing the same letter ('a' and / or 'b') are not different according to post-hoc pairwise comparison (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

	Root dry matter / total residue dry matter (%)		Root-N / total residue-N (%)		Root residues N concentration (%)		Shoot residues N concentration (%)	
Barley + N	3.3	(0.1) hi	4.2	(0.2) b	0.81	(0.04) b	0.63	(0.01) g
Sorghum + N	17.0	(1.5) a	8.2	(1.6) a	0.43	(0.06) cd	0.88	(0.01) f
Lupin	6.8	(0.1) d	3.5	(0.5) bc	0.34	(0.02) d	0.68	(0.05) g
Common bean	3.7	(0.1) gh	3.9	(0.4) bc	1.15	(0.14) a	1.08	(0.03) e
Lentil	5.2	(0.1) ef	4.3	(0.4) b	1.14	(0.13) a	1.39	(0.06) d
Common vetch	4.0	(0.1) g	3.1	(0.7) c	1.22	(0.20) a	1.59	(0.23) d
Pea	3.9	(0.1) g	6.9	(0.5) a	1.29	(0.10) a	0.71	(0.07) g
Faba bean	10.2	(0.2) b	3.5	(0.2) bc	0.48	(0.03) cd	1.50	(0.10) d
Soybean	7.6	(0.2) c	7.6	(1.0) a	0.60	(0.08) bc	0.60	(0.10) g
Narbonne vetch	5.6	(2.3) e	1.9	(0.2) d	1.18	(0.19) a	3.63	(0.13) a
Fenugreek	2.9	(1.2) i	1.6	(0.5) d	1.38	(0.44) a	2.53	(0.12) b
Chickpea	5.0	(1.6) f	1.8	(0.1) d	0.79	(0.09) b	2.23	(0.16) c
significance	***		***		***		***	

**Table 4** N concentrations and root/total residue distributions of dry matter and N amounts of plant residues, measured at harvest in the 2016 outer pot experiment for nine legumes. Values are means (n=4)  $\pm$  (standard deviation). For each response variables, values sharing the same letter ('a' and / or 'b') are not different according to post-hoc pairwise comparison (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

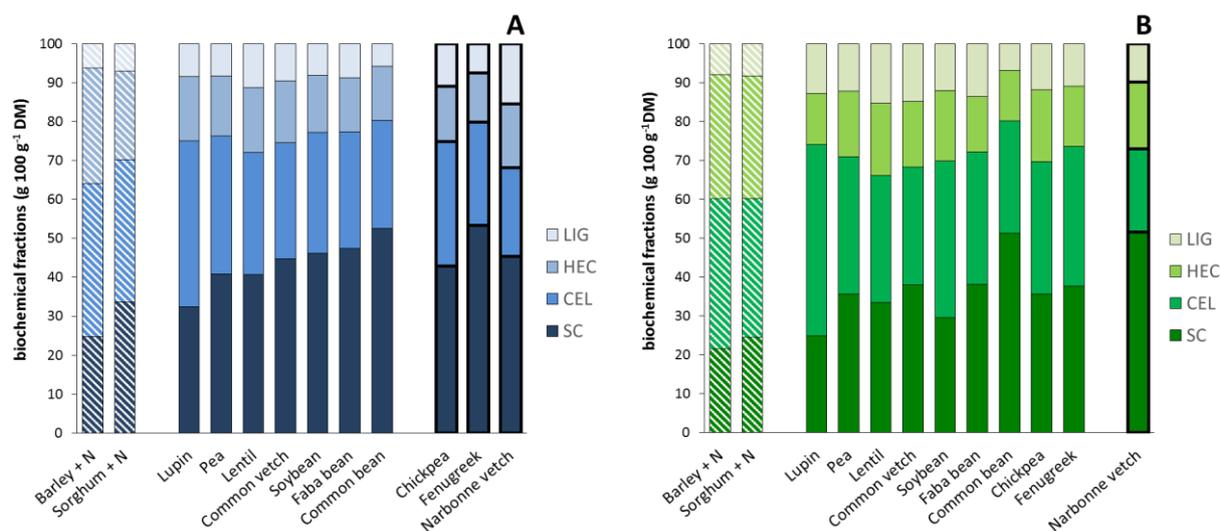
	Root dry matter / total residue dry matter (%)		Root-N / total residue-N (%)		Root residues N concentration (%)		Shoot residues N concentration (%)	
Lupin	10.7	(0.6) cd	14.6	(0.7) cde	1.27	(0.15) e	0.89	(0.15) cd
Common bean	12.3	(1.3) bc	16.7	(4.6) bcd	2.41	(0.13) a	1.77	(0.51) ab
Lentil	8.9	(1.7) de	9.4	(2.5) ef	1.91	(0.23) bc	1.82	(0.20) ab
Common vetch	6.4	(1.4) ef	10.3	(1.9) def	2.21	(0.07) ab	1.32	(0.24) bc
Pea	4.8	(0.9) f	6.3	(2.3) f	2.21	(0.17) ab	1.76	(0.44) ab
Faba bean	15.6	(1.4) ab	20.6	(2.4) bc	1.53	(0.12) de	1.11	(0.20) c
Soybean	17.8	(1.0) a	38.2	(3.9) a	1.69	(0.28) cd	0.59	(0.04) d
Narbonne vetch	17.4	(3.2) a	20.0	(6.6) bc	2.60	(0.32) a	2.26	(0.44) a
Chickpea	15.8	(2.4) a	23.2	(4.9) b	1.52	(0.12) de	0.96	(0.14) cd
significance	***		***		***		***	

### 3.3. Biochemical characteristics of shoot and root residues

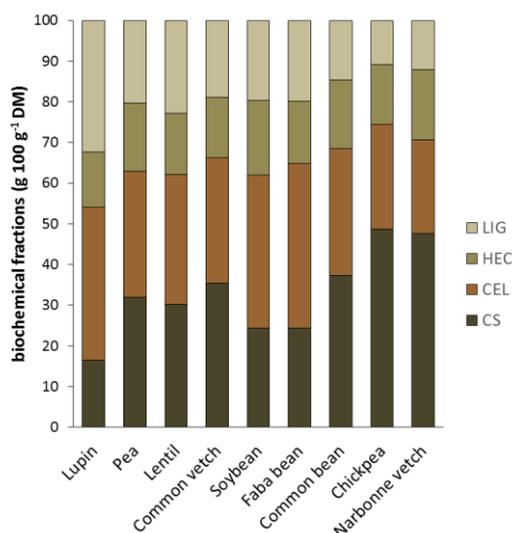
For most legume species, and for both field experiments (2014 and 2016), soluble compounds constituted the largest fraction of shoot residues (Fig. 2). In 2014, soluble compounds represented in average of 45% shoot-DM with values ranging from 32% (lupin) to 53% (Narbonne vetch) (Fig. 2A). In 2016, values were slightly lower for most legume species with an average of 38% of shoot dry matter (Fig. 2B). Regardless of the year, lupin always presented the lowest soluble compound fraction (on average 29% of shoot-DM), while Narbonne vetch and common bean had the largest soluble fraction (on average 52% of shoot-DM). Legume crop residues-DM also presented large cellulose fraction. In 2014, the cellulose fraction ranged from 23% (Narbonne vetch) to 43% (lupin) of shoot DM. The cellulose fractions were similar in the 2016 field experiment compared to the 2014 field experiment, except for fenugreek, lupin and soybean for which the cellulose fraction represented on average 8% more of shoot-DM in 2016 compared to 2014. Hemicellulose and lignin fractions were relatively small with an average value of 16 and 11% shoot-DM, respectively, regardless of the legume species and year.

Cereal shoot residues exhibited very contrasting biochemical characteristics compared to legume shoot residues (Fig. 2). For both years, cereal shoots had smaller soluble compound fractions, which represented 23 and 29% of shoot-DM for barley and sorghum, respectively. On the contrary, barley and sorghum presented the largest hemicellulose fractions (31 and 27% of shoot-DM for barley and sorghum, respectively).

Biochemical characteristics of root residues also differed among legume species grown in the 2016 outer pot experiment (Fig. 3). Soluble compound fractions represented on average 33% of root-DM. The lowest values were measured for faba bean, lupin and soybean (on average 22% of root-DM) while chickpea (49%) and Narbonne vetch (48%) presented the largest soluble compound fractions. The importance of cellulose fraction in root residues followed the opposite trend. Species with smaller soluble compound fractions presented larger cellulose fractions and vice-versa. Legume root residues showed similar hemicellulose fractions, with an average value of 16% of root-DM. Root residues had large lignin fractions with an average value of 19% of root-DM. Lignin fraction ranged from 11% (chickpea) to 32% of root-DM (faba bean).



**Fig. 2** Biochemical characteristics of shoot residues sampled at harvest for the field experiments conducted in 2014 (A) and 2016 (B). Data are expressed in % of shoot residues-DM for the ten legumes (solid) and two N fertilised cereals (hatched). Bars with a heavy dark border indicate legumes for which the whole plant was considered as crop residue since there was no grain production. LIG: lignin; HEC: hemicellulose; CEL: cellulose; CS: soluble compounds



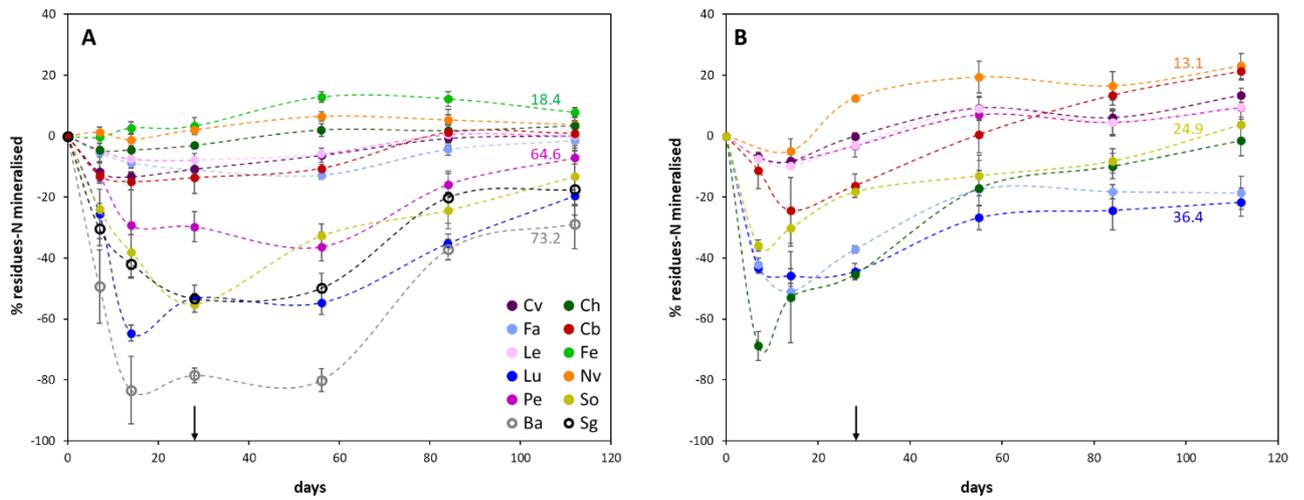
**Fig. 3** Biochemical characteristics of root residues sampled at harvest for the 2016 outer pot experiment. Data are expressed in % of root residue-DM for nine legumes. LIG: lignin; HEC: hemicellulose; CEL: cellulose; CS: soluble compounds

### 3.4. Shoot and root residues-N mineralisation dynamics

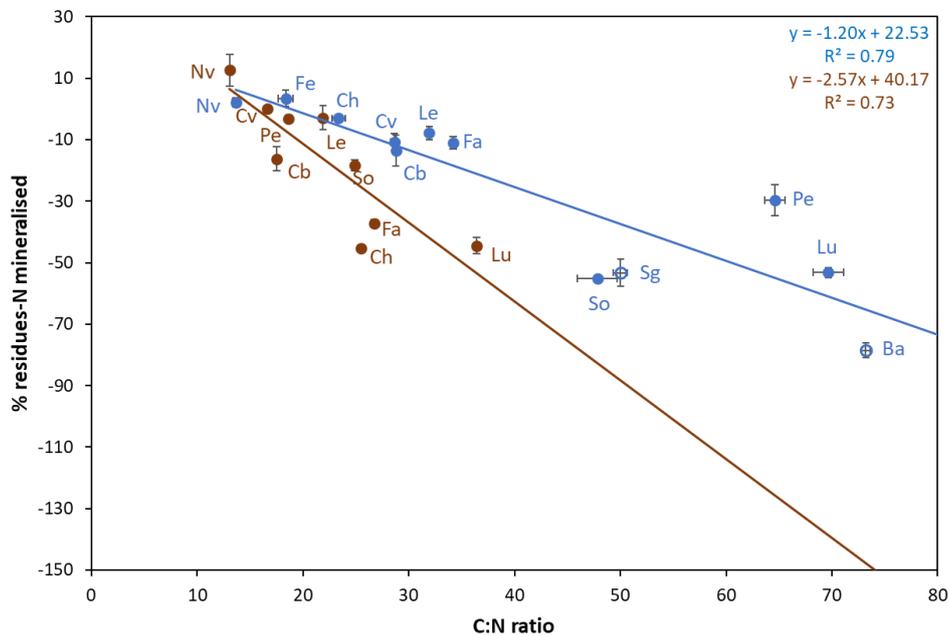
Inorganic-N derived from residue mineralisation in incubation varied widely among residues with contrasting dynamics over time (Fig. 4). For the shoot residues, the highest net N immobilisation was measured at day 14 for most species with values ranging from -83.4% to -1.1% residue total-N for barley and Narbonne vetch, respectively (Fig. 4A). The highest net N immobilisation was observed at day 28 for sorghum (-53%) and soybean (-55%) and at day 56 for faba bean (-13%) and pea (-36%). Then, net N mineralisation occurred later during the incubation period. However, for barley, faba bean, lupin, pea, sorghum and soybean shoot residues, the concentrations of inorganic-N in the soil + residue mixture at the end of the incubation period were lower than those in the corresponding control soils (i.e. net mineralisation was still negative). Conversely, for chickpea, common bean, common vetch, fenugreek, lentil and Narbonne vetch, the concentrations of inorganic-N in the soil + residues mixture after 14 to 112 days of incubation were higher than those in the corresponding control soils (i.e. net N mineralisation was positive). A similar trend was observed for root residues (Fig. 4B) with an initial period of net N immobilisation by microbial biomass followed by net N mineralisation later during the incubation. However, net N mineralisation at the end of the incubation period was still negative for lupin, faba bean, and chickpea root residues while net N mineralisation ranged from + 4 to + 23% for common bean, common vetch, lentil, pea, Narbonne vetch and soybean.

### 3.5. Shoot and root residue-N mineralisation related to their C:N ratio

The C:N ratio of the residues used for the incubations varied widely among species (Table 2 and Fig. 5). For the shoot residues from the 2014 field experiment, the residue C:N ratio ranged from 13.6 for Narbonne vetch to 73.2 for barley. Cereals had among the highest C:N ratios with pea, lupin and soybean, while legumes for which the whole plant was considered as crop residues in 2014 (Narbonne vetch, fenugreek and chickpea), had the smallest values. For root residues collected from the 2016 outer pot experiment, C:N ratios ranged from 13.1 to 36.4, with Narbonne vetch, common vetch and pea having the smallest C:N ratios while faba bean, chickpea and lupin had the highest values. Residue-N mineralisation was negatively related to the C:N ratio, considering the percentage of residues-N mineralised after 28 days of incubation and the C:N ratio of shoot or root residues (Fig. 5). However, for a similar C:N ratio, root residues tended to have a lower N mineralisation rate compared to shoot residues, especially for the highest of C:N ratio values.



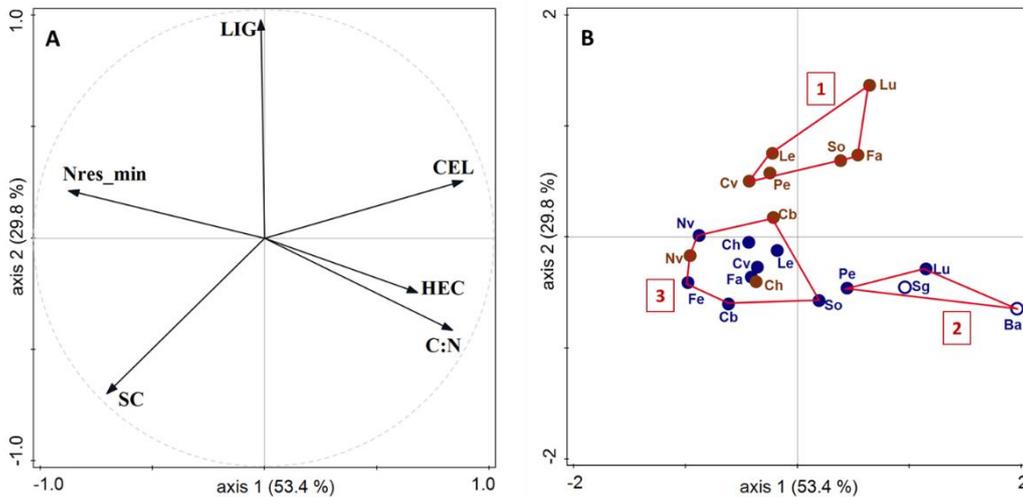
**Fig. 4** Dynamics of N mineralisation from shoot residues (**A**) and root residues (**B**) measured during the incubation of the ten legume crop residues (●) and the two N fertilised cereal crop residues (○). Values are means (n = 4) ± SD (standard deviation). Species ID are specified in Table 2. The arrow in each graph corresponds to the sampling date at day 28. Numbers indicate the crop residues C:N ratios



**Fig. 5** Percentage of N mineralised from shoot (blue) and root (brown) residues, measured in incubations after 28 days at 28°C, as a function of residues C:N ratio, for ten legumes (●) and two N fertilised cereals (○). Values are means (n = 4) ± SD (standard deviation). Species ID are specified in Table 2

3.6. Nitrogen mineralisation related to the biochemical profile of shoot and root residues

A PCA was performed to test whether the biochemical characteristics of residues could account for the N mineralisation rates among species and type of organ. The first and second axis of the PCA accounted respectively for 53.4 and 29.8% of the total variance (Fig. 6). The cellulose (24.3%) and hemicellulose (14.5%) fractions of residues-DM, the residues C:N ratio (21.8%), and the residues-N mineralisation rate after 28 days (23.9%) contributed most to the first axis. Moreover, N mineralisation rates of residues were negatively correlated with the first three variables. Two variables contributed most to the second axis and were negatively correlated: lignin (53.6%) and soluble compounds (27.2%) fractions of residues-DM. A clear separation between root and shoot residues appeared, with a distinction mostly made on axis 2 (Fig. 6B). Root residues presented higher lignin fractions and lower soluble compound fractions in comparison to shoot residues, except for Narbonne vetch and chickpea. Residues were then grouped using a hierarchical clustering analysis (Fig. 6B). The first cluster included root residues from common vetch, faba bean, lentil, lupin, pea and soybean with residues characterised by large lignin fractions. The second cluster included shoot residues from lupin, pea, barley and sorghum, characterised by large cellulose and hemicellulose fractions, high C:N ratio and low N mineralisation rates. The third cluster included the other residues which presented higher N mineralisation rates compared to the second cluster and lower lignin fraction compared to the first cluster.



**Fig. 6 (A)** Correlation circle with the two first axes of the principal component analysis (PCA) performed for the matrix of shoot and root residues used in the incubation experiment (Table 2;  $n = 21$ ) and biochemical characteristics ( $n = 6$ ; lignin (LIG); hemicellulose (HEC); cellulose (CEL); soluble compounds (CS); C:N ratio (C:N); % residues-N mineralised measured after 28 days incubation (Nres\_min). **(B)** Scatter diagram with the first two axes of the PCA. Root residues from the 2016 outer pot experiment (brown points); shoot residues from the 2014 field experiment (blue points); legume crop residues (●); cereal crop residues (○). Species ID are specified in Table 2. Clusters of the 21 residues are represented in red. Clusters were obtained using Ward's hierarchical clustering according to the Euclidean distance matrix comparing all variables (used in PCA analysis) for each crop residue

## 3.7. Amount of N potentially mineralised from shoot and root residues

Except for fenugreek and Narbonne vetch, shoot residues-N mineralisation induced net N immobilisation by soil microbial biomass after ten months following residue incorporation (Table 5). However, soil inorganic-N immobilisation was always higher for cereal shoot residues compared to legume species. Barley and sorghum shoot residue decomposition induced 6 kg N ha<sup>-1</sup> (soybean) to 30 kg N ha<sup>-1</sup> (Narbonne vetch) more soil inorganic-N immobilisation compared to legumes.

In the 2014 field experiment, the amount of N measured in root residues was very small and represented on average 2.2 kg N ha<sup>-1</sup> for legume crops (Table 6). When estimated from the root-N:shoot-N ratio of the 2016 outer pot experiment, the N in root residues for the 2014 field experiment was much higher, on average 14.6 kg ha<sup>-1</sup>. Total-N contained in root residues was highest for chickpea, Narbonne vetch and soybean. However, ten months after harvest, soil inorganic-N immobilisation by the microbial biomass was extremely small and very close among species for both calculations of N root residues. On average, legume root residues induced 2 kg N ha<sup>-1</sup> of soil inorganic-N immobilisation. Chickpea was the only legume species for which a higher amount of soil inorganic-N immobilisation was expected when the amount of N in root residues was estimated from the root-N:shoot-N ratio of the 2016 outer pot experiment.

**Table 5** Calculation of the amounts of N potentially mineralised from the shoot residues in the 2014 field experiment

	Shoot residues-N (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Shoot residues-N mineralised (%) <sup>b</sup>	Potentially mineralised-N (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
Sorghum + N	48	-53.3	-26
Barley + N	30	-78.4	-24
Soybean	33	-55.2	-18
Lupin	20	-53.2	-11
Pea	29	-29.7	-9
Faba bean	61	-11.0	-7
Common vetch	53	-10.8	-6
Common bean	34	-13.7	-5
Lentil	46	-7.8	-4
Chickpea	161	-3.0	-5
Narbonne vetch	94	2.1	2
Fenugreek	112	3.4	4

a: measured at harvest in the 2014 field experiment

b: measured after 28 days of incubation at 28°C

c = a \* b / 100

**Table 6** Amounts of N potentially mineralised from the root residues

	Root residues-N measured (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Root residues-N estimated (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Root residues-N mineralised (%) <sup>c</sup>	Potentially mineralised-N (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
Soybean	2.7	20.3	-18.2	-0.5 ; -3.7
Lupin	0.7	3.4	-44.5	-0.3 ; -1.5
Pea	2.1	1.9	-3.1	-0.1 ; -0.1
Faba bean	2.2	15.8	-37.2	-0.8 ; -5.9
Common vetch	1.7	6.1	0.0	0.0 ; 0.0
Common bean	1.4	6.7	-16.3	-0.2 ; -1.1
Lentil	2.1	4.8	-2.9	-0.1 ; -0.1
Chickpea	3.0	48.6	-45.3	-1.4 ; -22.0
Narbonne vetch	1.8	23.5	12.6	0.2 ; 3.0

a: measured in the 2014 field experiment

b: estimated from the amount of N in shoot residues measured in the 2014 field experiment by multiplying with the proportion of N in root residues relative to N present in shoot residues measured in the 2016 outer pot experiment

c: measured after 28 days of incubation at 28°C

d = a \* c / 100 ; b \* c / 100

## 4. Discussion

### 4.1. Amounts of inorganic-N left by shoot and root residues

In 2014, the total amounts of N left by shoot residues were quite similar between harvested grain legumes and cereals. However, most harvested grain legumes compared to cereals had among the lowest shoot residue-DM but among the highest N concentrations, as highlighted by Jeuffroy et al., 2015 for pea. However, in our study pea, lupin and soybean shoot residues had low N concentrations and thus high C:N ratios, in the same range as cereals. High C:N ratios have already been reported for soybean and pea (Nicolardot et al., 2001; Soon and Arshad, 2002). However much lower C:N ratios were also often measured for both species (Abiven et al., 2005; Jensen, 1997a; Jensen et al., 2012; Kumar and Goh, 2003). In the 2014 field experiment, lupin, pea and soybean exported on average 87 % of the aboveground-N to the harvested grains (data not shown), which could explain the high C:N ratios we measured in the shoot residues compared to other studies. Conversely, in the 2014 field experiment the other harvested grain legumes had an average N harvest index of 68% (NHI: proportion of aboveground-N in the grains), probably explaining their lower C:N ratios compared to lupin, soybean, pea and the two cereals. Moreover, legumes with no grain production (chickpea, fenugreek and Narbonne vetch) had the highest N concentrations and lowest C:N ratios in shoot residues, with values close to those usually measured for non-mature legume residues (Cassigneul et al., 2015; Couédel et al., 2018; Lupwayi et al., 2006; Tribouillois et al., 2015a; Wivstad, 1999). For these three species, the N accumulated in the vegetative part during the legume cycle was not re-mobilised and exported by the grains. Therefore, large NHI reduces the amount of N left by shoot residues. The amounts of N in shoot residues therefore depends on plant growth driving plant-N accumulation and

on the distribution of N between straw and grains, both highly dependent on soil and climatic conditions.

In the vast majority of published data, root-N was not measured, mostly due to technical difficulties in excavating roots, especially in field conditions (Zhu et al., 2011). In the 2014 field experiment, root-N was estimated from soil core excavation at harvest. However, the proportions of total-N in the roots measured in the field experiment were very low compared to published data on chickpea (Turpin et al., 2002), faba bean, soybean, lupin (von Fragstein, 1995), pea and barley (Armstrong et al., 1994; Izaurralde et al., 1992; Wichern et al., 2007) in which root-N accounted for between 11 and 27% total plant-N. However, for faba bean and pea, the proportion of total residue-N in the roots measured in the field experiment (4 and 7%, respectively) were in agreement with Jensen et al. (2010) and Voisin et al. (2002a), who found values close to 5%. Some of the differences between our data and most of the published data may be due to soil and climate conditions, which are known to modify the shoot:root ratio (Kramer-Walter and Laughlin, 2017; McConnaughay and Coleman, 1999). Moreover, technical bias may also explain the low measured values. The high proportion of clay in the soil made root physical recovery from the soil difficult, especially for thin roots. Roots were also only collected in the first 40 cm of the soil, undoubtedly leading to an underestimation of root-DM and -N. Nevertheless, legumes are characterised by shallow root systems with most of the roots are located in the first 20-30 cm of the soil (Voisin et al., 2002a; Williams et al., 2013). Furthermore, at maturity, root-N concentrations were low compared to other studies that measured root-N concentrations close to 2% for pea (Izaurralde et al., 1992; Voisin et al., 2002a), 1.4% for soybean and common bean (Redin et al., 2014a) and 1% for faba bean (Jensen et al., 2010).

In greenhouse experiments, the proportion of total plant-N in roots-N is often higher than in field experiments, partially because root physical recovery is much easier (Anglade et al., 2015; Khan et al., 2002; Khan et al., 2003; Mahieu et al., 2007; Unkovich and Pate, 2000), in accordance with our own results in outer pots where root-N accounted in average for 17% of total residues-N. Furthermore, root-N decomposition at the end of the legume growth cycle may be much lower than in field conditions, due to very limited microbial biomass in the substrates. Therefore, this could explain the much higher N concentrations measured in the outer pot experiment compared to the field experiment.

As such, in the 2014 field experiment, root-N as a proportion of total residue-N at harvest may have been clearly underestimated and the values from the outer pot experiment are closer to those generally suggested in the literature (Armstrong et al., 1994; Unkovich et al., 1994; Walley et al., 2007). Nevertheless, total belowground-N was certainly underestimated in the field and the outer pot experiments since root-N was measured at maturity and N rhizodeposition in the form of organic materials during the plant life cycle was not quantified.

#### 4.2. Shoot and root residue-N mineralisation according to their biochemical characteristics

Shoot and root residue decomposition induced initial net inorganic-N net immobilisation by microbial biomass, after their incorporation in the soil, as was reported by Jensen (1997a), Nicolardot et al. (2001), and Trinsoutrot et al. (2000). Net N immobilisation intensity, however, varied widely among residues. Several studies based on cereal residues and a very limited number of mature legume residues such as pea and soybean or based on cover-crop residues, established a relationship between the residue C:N ratio and residue N mineralisation (Jensen, 1997a; Jensen et al., 2005; Justes et al., 2009; Kumar and Goh, 2003; Vigil and Kissel, 1991). According to our study, this relationship can be extended to cover a wide range of mature legume residues, as residue-N mineralisation was highly correlated with the residue C:N ratio after 28 days incubation. Legume residues generally having lower C:N ratios than cereals generated lower amounts of N immobilised by microbial biomass. Consequently, larger amounts of soil inorganic-N are available after legumes crops with low C:N ratios compared to cereals.

After 28 days incubation, positive net N mineralisation occurred at least for residues with C:N ratio lower than 19 for shoot residues and 16 for root residues. A threshold of residues C:N ratio  $< 25$  is generally given by several authors (Frankenberger and Abdelmagid, 1985; Kumar and Goh, 2000; Trinsoutrot et al., 2000) to predict net N mineralisation from residues. The small difference in threshold between the literature and our results might simply be due to the sampling date we chose (28 days). A threshold of C:N ratio = 24 for shoots and roots was found after 112 days incubation (not shown), as net N mineralisation continued to occur between 28 and 112 days incubation. In our incubation conditions, 28 days correspond more or less to ten months of decomposition of residue after its incorporation in soil under field conditions. Therefore, when considering a subsequent crop for which the growth cycle is around 10 months (winter wheat for example), only residues with C:N ratios lower than 19 for shoots and 16 for roots will lead to positive amounts of inorganic-N available for the subsequent crop.

However, even if no inorganic-N is released in the soil by residue-N mineralisation in the short term, residue-N incorporated in the soil organic matter contributes to long-term soil N fertility (Crews and Peoples, 2005). Soil microbial biomass turnover may also provide inorganic-N over a longer timescale. However, it is known that rapid residue decomposition can have a negative impact on soil organic C in the longer term. Because of lower legume C:N ratios compared to cereals, cropping systems including legume crops tend to reduce soil organic C accumulation compared to cereal based cropping systems (Plaza-Bonilla et al., 2016). A low legume residue C:N ratio can also modify the soil micro-organism community due to greater C use efficiency and hence increase soil native organic matter decomposition (Derrien et al., 2014).

Taken alone the residue C:N ratio cannot explain all the variability of N mineralisation among species and plant organs. Barley, lupin and pea had similar shoot residue C:N ratios, but barley induced respectively 1.5 and 2.5 times more N immobilisation compared to lupin and pea. Interestingly, barley had much higher hemicellulose fractions compared to pea and lupin. Hemicellulose is a structural polysaccharide, reducing the availability of residue-N for the microbial biomass. Therefore, a high barley hemicellulose fraction could explain the higher inorganic-N immobilisation during residue decomposition. On the contrary, compared to lupin and barley, pea had a much higher soluble compound content, making residue-N easily degradable by microbial biomass and leading to lower amounts of N immobilisation.

Furthermore, for a similar C:N ratio, N immobilisation was higher for root residues compared to shoot residues. Most shoot and root residues could be distinguished according to the lignin fraction, as highlighted by Abiven et al. (2005) and Bertrand et al. (2006). Although not directly related to N mineralisation rates, the lignin fraction could partially explain the differences in N mineralisation observed between shoots and roots for a given C:N ratio. Lignin is known to reduce net N mineralisation as it degrades into polyphenols, which become recalcitrant humic polymers once combined with N compounds. Moreover, lignin tends to create a physical barrier and therefore reduces the availability of more decomposable compounds for soil microbes (Haynes, 1986; Kumar and Goh, 2000). It leads to greater N immobilisation for materials with high lignin and polyphenol contents (Palm et al., 2001). This may be all the more the case for grain legume roots as they usually present higher lignin fractions compared to cereals (Abiven et al., 2005; Redin et al., 2014a). Legumes have a tap root system with in general thicker roots than cereals (Hamblin and Tennant, 1987; Petrie and Hall, 1992; Redin et al., 2014a), usually correlated with higher lignin fractions (Prieto et al., 2015). However, the lignin fraction did not completely explain the differences between shoot and root residues. Interestingly, chickpea and common bean root residues had small lignin fractions comparable to those of shoot residues, but the root residues of both species presented low N mineralisation rates for their given C:N ratios. However, this trend could not be explained by any particular biochemical characteristics.

#### 4.3. Residue-N potentially available for the following crop

Taking into account only the amount of N in shoot and root residues to estimate the amount of N that may be available for the following crop is certainly not enough. Only part of the residue-N is mineralised during the few months following residue decomposition (Lupwayi et al., 2006; Lupwayi and Soon, 2009) and residue-N mineralisation often leads to net N immobilisation as previously shown in this study. Therefore, multiplying the amounts of N in the residues measured in the field experiments by the N mineralisation rates measured in non-limiting conditions gives an estimation of

the amount of inorganic-N derived from residue mineralisation and potentially available for the following crop. According to this method of calculation, four groups of species could be highlighted for the shoot residues:

- i) Shoot residue-N values measured in the field were around 40 kg N ha<sup>-1</sup> and residue-N mineralisation induced a high proportion of N immobilisation. This included the two cereal residues for which shoot residue decomposition led to the lowest amounts of N potentially available for the following crop;
- ii) Shoot residue-N values measured in the field were lower than in the first group but residue-N mineralisation also induced a high proportion of N immobilisation. This group included soybean and lupin for which shoot residue decomposition led to slightly higher amounts of N potentially available for the following crop than in the first group;
- iii) Shoot residue-N mineralisation induced lower proportion of N immobilisation compared to the first and second groups. Whatever the amount of N measured in the shoot residues, the amount of N immobilised by the microbial biomass was small. This was the case for pea, faba bean, common vetch, common bean, lentil and chickpea.
- iv) The fourth group included Narbonne vetch and fenugreek for which shoot residue decomposition led to net N mineralisation. Therefore, the residue decomposition of these two species led to the highest amounts of inorganic-N potentially available for the following crop.

For root residues, whatever the amount of root-N measured in the field experiment or the outer pot experiment, root residue decomposition induced very small amounts of N immobilisation. Net N mineralisation only occurred for Narbonne vetch residue decomposition and led to a maximum of 3 kg N ha<sup>-1</sup> available for the following crop. Consequently, all the root residue decompositions provided similar negligible amounts of N available for the following crop.

The amount of N potentially available for the following crop must however be considered with caution. Soil incubations were performed using non-limiting inorganic-N to differentiate residue decompositions according to their biochemical characteristics. In field conditions, residue-N mineralisation may have been reduced due to the insufficiency of soil inorganic-N availability to fulfil microbial N requirements.

## 5. Conclusion

This study extended our knowledge of residue N mineralisation for a wide range of mature grain legume species characterised by large variations in biochemical characteristics for both shoot and root residues. Residue-N mineralisation was negatively correlated with the C:N ratio and cellulose fraction; but for a given C:N ratio, root with a higher lignin fraction induced higher N immobilisation rates compared to shoot residues. According to our calculations based on field and incubation measurements, legume shoot residue decomposition provided a maximum of 30 kg N ha<sup>-1</sup> more

inorganic-N compared to cereals. Extra inorganic-N after legume shoot residue decomposition mainly arose from lower N immobilisation compared to cereals. Unlike cover-crops used as green manure, mature grain legume residues had a higher C:N ratio than the threshold at which positive net N mineralisation occurs. Root decomposition induced negligible amounts of inorganic-N available for the following crop. Legume crops are known to increase the yields of subsequent cereal crops compared to those of cereals cultivated after cereals. The positive effect of legumes on the subsequent crop may be partially related to their residue-N mineralisation rate. The link between legume residue-N mineralisation and the yield of the subsequent crop must therefore be assessed in field conditions. This study contributed to a better understanding of residue-N mineralisation dynamics essentials for maximising the synchronisation between residue-N mineralisation and the subsequent crop N uptake through the implementation of adapted agricultural practices.

### **Acknowledgements**

M. Guinet received a grant from the INRA and the Ministry of Agriculture. This experimental work was supported by the ANR LEGITIMES, INRA Bourgogne-Franche-Comté Region (PSDR project ProSys), the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under agreement No. 727247 (SolACE project) and Terres Inovia. We thank C. Caule and S. A. Augustin for their work on the incubation experiments during their internship of master's degree. We also thank C. Ducourtieux, V. Durey and F. Lombard for their excellent technical assistance.



## Chapitre 3 : Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling

Ce chapitre correspond à un article en préparation pour soumission à une revue internationale

## Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling

Maé Guinet<sup>1</sup> • Bernard Nicolardot<sup>1</sup> • Anne-Sophie Voisin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche Comté, F-21000 Dijon, France

\*Corresponding author: [anne-sophie.voisin@inra.fr](mailto:anne-sophie.voisin@inra.fr); Postal address: INRA Dijon, 17 rue Sully, BP 86 510, 21 065 Dijon, FRANCE

### Abstract

The positive effect of grain legume pre-crops on the yield of the subsequent crop has been studied widely, whereas less information is available on the nitrogen process (N) related to this positive effect, especially for a wide range of grain legume species. In order to quantify and understand the effect of ten legume pre-crops on the following cereal compared to barley and sorghum pre-crops, a two-year field experiment was carried out with two climatic repetitions. The first year (2014 and 2016) spring and summer pre-crops were cultivated and grain was harvested. Once pre-crop residues had been incorporated in the soil, a winter wheat was sown, and harvested the second year (2015 and 2017). Inorganic N remaining in the soil at pre-crop harvest (N sparing) was measured. Residue-N mineralisation and N leaching between pre-crop harvest and wheat harvest were calculated using the STICS model.

Grain yield and shoot-N of unfertilised N wheat were on average 21% and 15% higher after spring legume pre-crops compared to barley in 2017, and 66% and 51% higher after summer legume pre-crops compared to sorghum in 2015 and 2017. The highest wheat grain yields and shoot N were measured after faba bean and lentil for spring legume pre-crops and after Narbonne vetch for summer legume pre-crops. In the second experiment, a N fertilisation treatment on wheat was added: it reduced the positive effect of fenugreek, lupin and lentil on wheat yield compared to barley pre-crops. A positive relationship between pre-crop residue-N mineralisation and wheat shoot-N was established with higher amounts of N available for the subsequent wheat after legume residue-N mineralisation. As residue-N mineralisation was not the only source of variation of N availability for the subsequent wheat, it did not explain all the variability of wheat shoot-N. In 2014, N sparing was higher after spring pre-crops compared to summer pre-crops. This was also the case of N leaching, especially in the first experiment which was characterised by heavy rain in summer and autumn. Estimating N availability by taking into account N inputs (N sparing, soil-N mineralisation and residue-N mineralisation) and N outputs (N leaching) explained 49% of wheat shoot N variability. Unquantified N processes and non-N processes might also have contributed to the positive effects of legumes on the subsequent wheat.

### Key words

Pre-crop effect, Grain legumes, Cereals, Crop residues, Mineralisation, N leaching

## 1. Introduction

Cereal crops generally have higher yields when cultivated after unrelated species (Kirkegaard et al., 2008) and especially after legume crops (Angus et al., 2015; Preissel et al., 2015). Some studies also highlighted higher grain N concentrations in cereals grown after legumes compared to cereals grown after cereals (Biederbeck et al., 1996; Gan et al., 2003). Part of the positive effect of legumes on the following cereals are due to N benefits.

Indeed, a substantial amount of N can be left by legume crop residues. Moreover, during crop residue decomposition by soil microbes, residue organic-N is converted into inorganic forms that can be retrieved by the subsequent crop. Much of the inorganic-N released is rapidly immobilised by soil microbial biomass. Inorganic-N accumulation in the soil occurs when the amounts of N released exceeds the microbial-N requirements (net N mineralisation). On the contrary, when inorganic-N released from crop residue-N mineralisation is not sufficient, micro-organisms will also assimilate soil inorganic-N to meet their N requirements, which results in net N immobilisation (Nicolardot et al., 2001). Net N mineralisation or smaller amounts of net N immobilisation are expected for legume residues compared to cereal residues, since legume residues are generally characterised by higher N concentrations and lower C:N ratios.

Furthermore, part of the additional soil inorganic-N after legume crops can be attributed to N “sparing” during legume growth (Evans et al., 1987b; Herridge et al., 1995). Legume superficial root systems compared to those of cereals can lead to higher amounts of inorganic-N remaining in the soil, especially in deeper layers (Hauggaard-Nielsen et al., 2001). A positive relationship between wheat yields and the amount of inorganic-N left in the soil after several pre-crops was established by Angus et al. (2015) for dry land field experiments, and legumes systematically presented the highest post-harvest amounts of inorganic-N.

However, the effects of legume crops on the following cereals are highly variable (Kirkegaard et al., 2008; Preissel et al., 2015) and they are difficult to predict. Part of this variability can be attributed to the diversity of legume species, environmental conditions and agronomic practices. Legumes species may differ according to their residue C:N ratio (Palm et al., 2001) or their ability to retrieve soil inorganic-N during their growth cycle (Dayoub et al., 2017; Guinet et al., 2018). The amounts of inorganic-N available for the following cereals, derived from crop residue-N mineralisation and/or N “sparing” may therefore depend on legume pre-crop species.

For a given pre-crop species, the effect on the following wheat can vary considerably with pedoclimatic conditions (Cernay et al., 2017). Hence, N fluxes occurring after pre-crop harvest that determine the amount of inorganic-N available for the following cereal are highly dependent on pedoclimatic conditions. On the one hand, crop residue-N mineralisation is positively stimulated by high soil moisture and temperature (Abera et al., 2012). On the other hand, soil inorganic-N can be lost by N

leaching if heavy rainfalls occur when high amounts of inorganic-N are present in the soil. In European climatic conditions, N leaching mainly occurs during the autumn-winter period, when the soil is bare after pre-crop harvest and/or because the following cereal crop requires only very small amounts of inorganic-N during its early development. Higher amounts of N losses by leaching are often measured after legume crops compared to cereals because of higher N sparing and their higher crop residue-N mineralisation (Plaza-Bonilla et al., 2015). However, N fluxes occurring between pre-crop harvest and the subsequent crop harvest are particularly difficult to quantify in field conditions. Therefore, their estimation often requires agronomic dynamic models that take into account the impact of both residue characteristics and pedo-climatic conditions on N fluxes after pre-crop harvest, thus allowing the calculation of N budgets over time.

Cereal performances after legumes are also affected by agricultural practices. Several studies showed that N fertilisation on the following cereal crops reduces the yield gap between a cereal cultivated after legumes and a cereal cultivated after cereals (Cernay et al., 2017; Jensen et al., 2004). Hence, in situations where high levels of N fertilisation are applied, the effect of legumes on the subsequent cereal performances is likely to be negligible.

Although it is widely acknowledged that legumes have a positive effect on subsequent crop performances, meta-analyses and reviews performed on legume pre-crop effects provide only a mean value of yield increases when cereals are cultivated after legume crops compared to cereals cultivated after cereals (Angus et al., 2015; Cernay et al., 2017; Preissel et al., 2015). Most of the time, these studies do not allow distinguishing legume species or quantitatively explaining the variability of subsequent cereal yields. Moreover, legume pre-crop comparisons based on previous field studies are difficult as very few grain legume species have been studied in the same pedoclimatic conditions (Espinoza et al., 2012; Miller and Holmes, 2005; Williams et al., 2014). To our knowledge, no direct relationship has been established between N fluxes and the performances of the subsequent crop for a wide range of legume pre-crops studied in comparable environmental conditions.

Hence, the aims of our study were the following: i) to compare the effect of ten legume and two cereal pre-crops on the subsequent performances of wheat; ii) to quantify N fluxes occurring between the pre-crop harvest and the subsequent wheat harvest and to evaluate how they were affected by pre-crop and climatic conditions; and iii) to evaluate whether the subsequent wheat performances could be explained by those N fluxes. To achieve these aims, a two-year field experiment was repeated twice between 2014 and 2017; i.e. the first year, legume and cereal pre-crops were cultivated in the same field and followed by wheat the second year, after the incorporation of pre-crop residues in the soil. Simulations with STICS model were performed to estimate soil N fluxes occurring during the period spanning from pre-crop harvest to wheat harvest: N mineralisation of pre-crop residues and soil organic-matter, and N leaching.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Field experiments

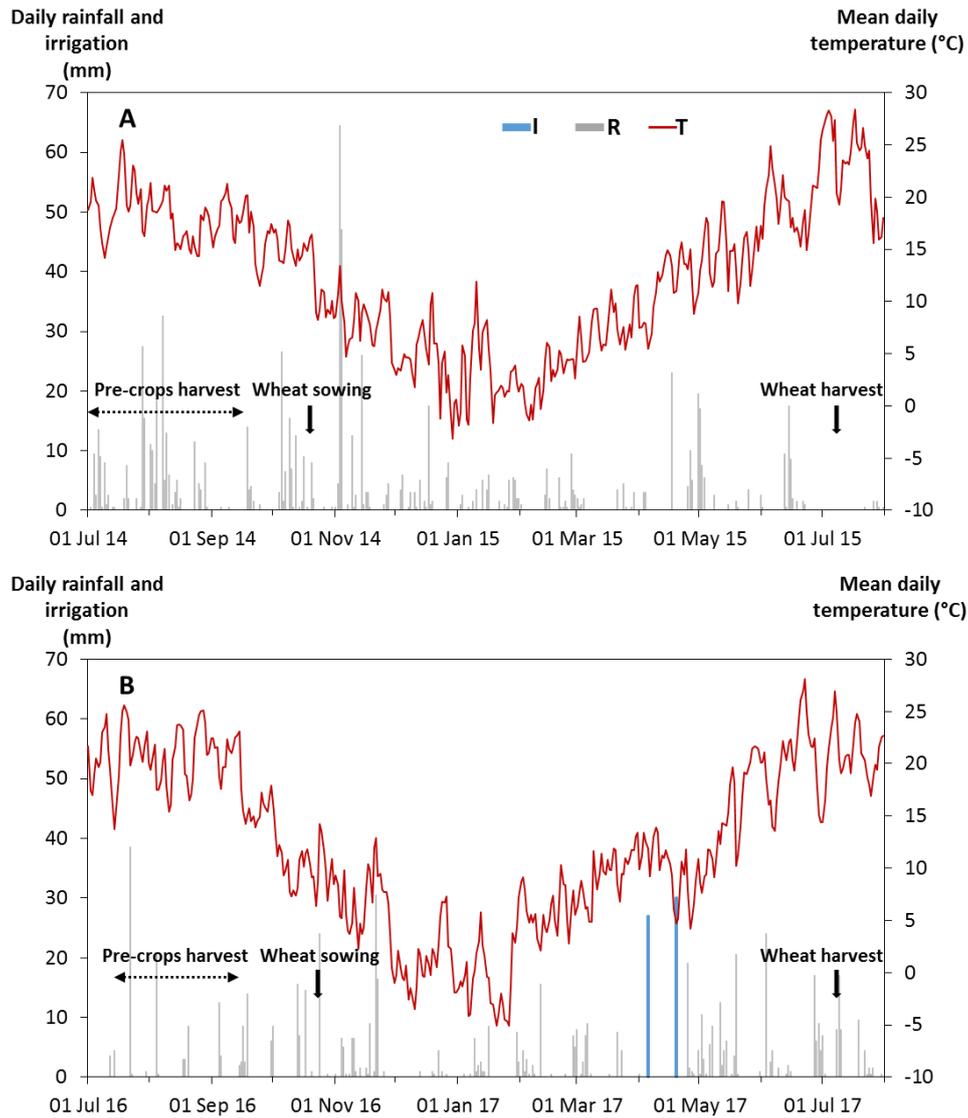
#### 2.1.1. Site and climatic conditions

Two field experiments lasting two years were carried out at the INRA Dijon experimental site of Bretenièrre (Eastern France; 47.241 N, 5.115 E, altitude = 206 m) in 2014-2015 (Experiment I) and 2016-2017 (Experiment II). The soil is classified as Cambisol (Eutric) (WRB, 2006) with a clayey surface layer (depth =  $0.65 \pm 0.15$  m) developed on an alluvial coarse layer. Soil characteristics were measured before the beginning of both experiments (2014 and 2016) and they are summarised in Table 1.

**Table 1** Soil characteristics in Experiments I and II

	<b>Experiment I (2014-2015)</b>	<b>Experiment II (2016-2017)</b>
<b>Clay (g kg<sup>-1</sup>)</b>	425	512
<b>Silt (g kg<sup>-1</sup>)</b>	515	428
<b>Sand (g kg<sup>-1</sup>)</b>	60	60
<b>Organic C (g kg<sup>-1</sup>)</b>	19.3	19.6
<b>Organic N (g kg<sup>-1</sup>)</b>	1.69	1.81
<b>C:N ratio</b>	11.4	10.8
<b>pH</b>	7.31	7.8
<b>CaCO<sub>3</sub> (g kg<sup>-1</sup>)</b>	< 1	4

The site is subject to a semi-continental climate but the climatic conditions were contrasted between Experiments I and II. Cumulative rainfalls and mean temperature between the beginning of pre-crop harvest and wheat harvest were 850 mm and 11.8°C in Experiment I and 600 mm and 11.3 °C in Experiment II (Fig. 1). Rainfalls were unusually high between July and November 2014 (541 mm) compared to 2016 (303 mm) and to the mean rainfall over the 20 past years during the same period (362 mm). Rainfalls between January and June were similar in 2015 (252 mm) and 2017 (293 mm), but they were lower than the rainfalls averaged over the 20 past years during the same period (340 mm).



**Fig. 1** Daily rainfall, irrigation and mean temperature between pre-crop harvest and wheat harvest in Experiment I (A) and Experiment II (B). I: Irrigation; R: Daily rainfall; T: mean daily temperature. I, R and T were measured from a weather station located in the INRA experimental site of Bretenière. Horizontal dotted arrows indicate the pre-crop harvest period and vertical arrows indicate wheat sowing and harvest dates.

### 2.1.2. Experimental design

**Pre-crop treatments:** Each experiment consisted of a two-year crop succession. Legume and cereal pre-crop treatments were sown in 2014 and followed by winter wheat that was harvested in 2015 (Experiment I). In 2016, the same pre-crops were grown in a field nearby the first experiment, and followed by winter wheat harvested in 2017 (Experiment II). This resulted in two separate data sets that allowed us to evaluate the effect of pre-crops on the following wheat performances.

In Experiment I and II, nine legume pre-crops were included: faba bean (*Vicia faba*, cv. Expresso), chickpea (*Cicer arietinum*, cv. Twist in 2014 and Vulcano in 2016), common bean (*Phaseolus vulgaris*,

cv. Flavert), common vetch (*Vicia sativa*, cv. Candy), lentil (*Lens culinaris*, cv. Anicia), lupin (*Lupinus albus*, cv. Feodora), pea (*Pisium sativum*, cv. Kayanne), soybean (*Glycine max*, cv. Sultana(000)) and Narbonne vetch (*Vicia narbonensis*, cv. Clara). In Experiment II, fenugreek (*Trigolia foenum-graecum*, cv. Fenu-fix) was also cultivated (Table 2). Pre-crops were either sown in March or in May, depending on the physiology of each species (Table 2) and were referred as spring pre-crops and summer pre-crops, respectively, thereafter. Legume seeds were inoculated at sowing with species-specific strains of N<sub>2</sub>-fixing bacteria to ensure symbiotic N<sub>2</sub> fixation, as described in (Guinet et al., 2018). No N fertilisation was applied to any of the legume pre-crops in either experiment.

Two N fertilised cereal pre-crops were also grown in Experiments I and II: barley (*Hordeum vulgare*, cv. Irina) and sorghum (*Sorghum bicolor*, cv. Quebec); they were sown in March and May, respectively. N fertilisation was applied in the form of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> at rates of 135 kg N ha<sup>-1</sup> in Experiment I and 70 kg N ha<sup>-1</sup> in Experiment II for barley, and 100 kg N ha<sup>-1</sup> for sorghum in Experiments I and II.

Pre-crops were sown on plots 1.5 m wide and 12 m long with four replicates per pre-crop in Experiment I and eight replicates in Experiment II. Sowing densities are summarised in Table 2.

Pre-crop management: In order to reduce water stress, irrigation was supplied on pre-crop treatments. In Experiment I, spring pre-crops were irrigated with 35, 40 and 50 mm on March 26<sup>th</sup>, May 16<sup>th</sup> and June 18<sup>th</sup> 2014, respectively. Summer pre-crops were irrigated with 40, 40 and 50 mm on May 16<sup>th</sup>, May 27<sup>th</sup> and June 14<sup>th</sup> 2014, respectively. In Experiment II, 50 mm was supplied to summer pre-crops on July 11<sup>th</sup> 2016. Weeds were controlled by hand weeding and one insecticide (Karate Zeon) was applied on April 25<sup>th</sup> 2014 and April 21<sup>th</sup> 2016 in Experiment I and II, respectively.

Wheat following all pre-crop treatments: Pre-crop grains were harvested with a harvesting machine. No grains were harvested for chickpea in 2014 and Narbonne vetch in 2014 and 2016, due to climatic conditions unsuitable for grain production. In these cases, the whole plant was considered as crop residue. Two to seven weeks after pre-crop grain harvest, crop residues were chopped and incorporated into the soil using a rototiller (see Table 2 for pre-crop incorporation dates). Thereafter, winter wheat (*Triticum aestivum*, cv. Rubisko) was sown on the same plots on October 20<sup>th</sup> 2014 (300 seeds m<sup>-2</sup>) in Experiment I and October 24<sup>th</sup> 2016 (350 seeds m<sup>-2</sup>) in Experiment II. In order to control weeds and pathogens, a herbicide (February 26<sup>th</sup> 2015, Arbalète) and a fungicide (April 30<sup>th</sup> 2015, Adexar + Voxan) were applied on wheat in Experiment I. In Experiment II, irrigation was applied on wheat on April 5<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> 2017 (27 mm and 30 mm, respectively) (Fig. 1B).

Wheat N treatments: In order to express pre-crop maximum effect on wheat, no N fertiliser was applied in Experiments I and II, corresponding hereafter to the ON treatment.

In Experiment II, an additional N fertilisation treatment on wheat was studied. At the end of wheat tillering (April 4<sup>th</sup> 2017), 40 kg N ha<sup>-1</sup> in the form of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> was applied on half of the trial (with four replicates per pre-crop treatment), corresponding to the 40N treatment.

**Table 2** Pre-crops and wheat characteristics and management in Experiments I and II.

Pre-crop treatments	ID	Pre-crop sowing period	Sowing density (seeds m <sup>-2</sup> )	Pre-crop harvest date	Residue C:N ratio	Incorporation of pre-crop residues in the soil	Wheat sowing date	End of winter	Wheat harvest date
<b>Experiment I (2014-2015)</b>									
Common vetch	Cv	18 March 2014 (spring)	100	11 July 2014	28.6	21 August 2014	20 October 2014	1 March 2015	6 July 2015
Faba bean	Fa		45	25 July 2014	34.2				
Lentil	Le		250	11 July 2014	31.9				
Lupin	Lu		70	1 August 2014	69.7				
Pea	Pe		80	1 July 2014	64.6				
Barley + N	Ba		350	15 July 2014	73.2				
Chickpea	Ch	5 May 2014 (summer)	70	16 September 2014	23.4	3 October 2014	20 October 2014	1 March 2015	6 July 2015
Common bean	Cb		30	4 September 2014	28.8				
Narbonne vetch	Nv		35	5 September 2014	13.6				
Soybean	So		70	5 September 2014	47.8				
Sorghum + N	Sg		30	5 September 2014	50.0				
<b>Experiment II (2016-2017)</b>									
Common vetch	Cv	15 March 2016	100	27 July 2016	22.3	2 September 2016	24 October 2016	1 March 2017	6 July 2017
Faba bean	Fa	1 March 2016	45	2 August 2016	34.2				
Fenugreek	Fe	15 March 2016 (spring)	180	2 August 2016	36.9				
Lentil	Le		250	27 July 2016	29.5				
Lupin	Lu		70	12 August 2016	65.6				
Pea	Pe		80	13 July 2015	26.7				
Barley + N	Ba	350	20 July 2016	56.6					
Chickpea	Ch	17 May 2016 (summer)	55	12 September 2016	45.0	27 September 2016	24 October 2016	1 March 2017	6 July 2017
Common bean	Cb		30	12 September 2016	29.5				
Narbonne vetch	Nv		35	1 September 2016	12.6				
Soybean	So		70	12 September 2016	55.8				
Sorghum + N	Sg		30	14 September 2016	82.7				

### 2.1.3. Sampling and measurements

Pre-crop samplings: The above-ground biomass of legume and cereals pre-crops was sampled at physiological maturity (Table 2) on subplots of 1 m<sup>2</sup>. Straw was separated from grains and considered as crop residue left on the soil at maturity (except for chickpea in 2014 and Narbonne vetch in 2014 and 2016 where the whole plant was considered as crop residue).

Wheat samplings: At physiological maturity, wheat was manually harvested on subplots of 1 m<sup>2</sup> and straws were separated from grains. In order to obtain a better estimation of the wheat grain yield, grains were also harvested on 6.5 m<sup>2</sup> using a harvesting machine.

Measurements: Pre-crop residues and wheat straw and grain samples were oven-dried for 48 h at 80°C before dry matter was determined. Samples were milled and N and C concentrations were measured using an elemental analyser (ANCA-GLS, Sercon Ltd., Crewe, UK).

### 2.1.4. Calculations

The amount of N in pre-crop residues was calculated by multiplying pre-crop residue dry matter by N concentration of pre-crop residues.

Total wheat shoot dry matter was calculated by multiplying wheat grain yield measured on the 6.5 m<sup>2</sup> surface by total wheat dry matter/wheat grain dry matter ratio measured on the 1 m<sup>2</sup> subplot. The total amount of wheat shoot-N was then calculated by multiplying wheat shoot dry matter by N concentration of wheat shoot.

## 2.2. Estimation of N fluxes using STICS model

The STICS model (Simulateur multi disciplinaire pour les Cultures Standards) was developed at INRA (France) to simulate crop growth, soil water, carbon and nitrogen balances as influenced by climatic conditions, over either one crop cycle or several cultural successions at a daily time-step (Brisson et al. (2003)). The model STICS v8.50 was used to simulate N fluxes, such as N leaching, pre-crop residues and soil organic matter N mineralisation, between the pre-crop harvest and the winter wheat harvest in Experiments I and II.

### 2.2.1. Model inputs

To run the simulations, a number of input variables are required, such as soil characteristics, initial soil and residue states, crop characteristics, crop management and climatic conditions during the simulated period.

Soil Parameters: Permanent soil characteristics (clay, organic N, calcium, pH, etc.) were defined and fixed using measurements carried out at the beginning of Experiments I and II (Table 1). Soil moisture content at field capacity was estimated as the median value of water content measured on soil core samples in mid-winter. Soil moisture content at wilting point and bulk density was estimated according

to Ugarte Nano et al. (2016), who measured these soil characteristics in a neighbouring field experiment with standard reference farming practices as in the field prior to our experiment. Maximal rooting depth was set at 60 cm because of the presence of an alluvial coarse layer, greatly limiting root exploration below this layer. The thickness of the biological active layer for soil and pre-crop residue mineralisation was set at ploughing depth.

Soil initialisation: soil inorganic N and soil moisture measurements from soil core samplings performed shortly before or after pre-crop harvest were used to initiate the soil profile. In Experiment I, soil core samplings were performed on August 5<sup>th</sup> 2014 for spring pre-crops and on September 3<sup>rd</sup> 2014 for summer pre-crops. In Experiment II, soil core samplings were performed on August 26<sup>th</sup> 2016 for spring pre-crops and on September 23<sup>rd</sup> 2016 for summer pre-crops.

Crop residue inputs: Pre-crop residue dry matter and its physicochemical characteristics (C:N ratio, C concentrations, water content) at pre-crop harvest were used to initiate the simulations.

Wheat management: Winter wheat is one of several crops parametrised in STICS, using physiological and morphological traits. Crop management specified dates and methods of soil tillage, wheat sowing dates, sowing depth, sowing densities, row spacing, and date and amounts of water applied by irrigation.

Climatic inputs: Climatic conditions were measured by a weather station located at the INRA experimental site of Bretenière. Minimum and maximum temperatures, rainfalls, global radiation and Penman evapotranspiration were specified in the model at a daily time-step.

### *2.2.2. Model simulations and evaluation*

A simulation was performed for each pre-crop treatment and for Experiments I and II focusing on the ON wheat treatment, leading to a total of 23 simulations. The model was evaluated for its ability to predict the daily amount of inorganic-N and water content in the soil profile. Soil core samplings in the 0-60 cm soil layer were performed monthly on wheat plots for all pre-crop treatments, between January and July 2015 in Experiment I, and between October 2016 and July 2017 in Experiment II, with a 5 cm diameter auger.

The amounts of soil inorganic-N and soil moisture measured from the soil samples were expressed in kg N ha<sup>-1</sup> and mm, respectively and compared with the simulated data on the same date and for the same pre-crop treatment.

Three statistical criteria were used (Wallach et al., 2013) based on the comparison between model predictions and observed values: RRMSE, Bias and maximal error (ME):

$$\text{RRMSE} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}}{\bar{y}} \quad (3)$$

$$\text{Bias} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i) \quad (4)$$

$$\text{ME} = \max |y_i - \hat{y}_i|_{i=1}^n \quad (5)$$

where  $y_i$  is the observed value;  $\hat{y}_i$  the simulated value;  $\bar{y}$  the mean observed values and  $n$  the number of observations (sampling dates x pre-crop treatments).

From the simulations, the cumulative amounts of N leached under the soil profile, crop residue-N and soil organic-N mineralisation were calculated.

In order to understand the effect of pre-crop treatments on the N fluxes and their link with wheat performances, wheat shoot-N was plotted as a function of the cumulative amount of pre-crop residue-N mineralisation calculated with the STICS model.

The amount of inorganic-N actually available for wheat during wheat growth cycle was calculated as follows (6):

$$\text{N available for wheat} = \text{Nharv} + \text{Nminr} + \text{Nminsoil} - \text{Nleached} \quad (6)$$

with the amount of soil inorganic-N at pre-crop harvest (Nharv), the cumulative amounts of pre-crop residue-N mineralisation (Nminr) of soil organic-N mineralisation (Nminsoil) and of N leached (Nleached) between pre-crop harvest and wheat harvest.

Wheat shoot-N measured in the field experiments was then plotted as a function of N available for wheat.

### 2.3. Data analysis

Statistical analyses were performed with R software version 3.4.2. (R Core Team, 2016) on the following variables: 1) wheat yield, shoot N concentration and shoot-N, and 2) Nleaching. Analysis of variance (ANOVA) was used to study the effect of pre-crop treatments, N fertilisation and year. The homoscedasticity and normality of the residuals of the variables were tested using a Bartlett and Shapiro-Wilk test, respectively. If the effects were significant, Tuckey's Honest Significant Difference (HSD) test ( $p < 0.05$ ) was performed for multiple means comparison, using agricolae package (R Core Team, 2016).

A multivariate analysis was performed to determine the relation between pre-crop characteristics, N fluxes, environmental conditions and wheat performances. Pre-crop treatments were ordered through

a Principal Component Analysis (PCA) using the Canoco 5.10 program (ter Braak and Šmilauer, 2012). The variables were standardised to obtain equal weights in the PCA.

### 3. Results

For both Experiments I and II, once the grains were harvested, the crop residues were incorporated in the soil at two different dates for spring and summer pre-crops (Table 2). Because of the timespan between the two incorporation dates, crop residues from spring and summer pre-crops were subjected to different environmental conditions that may have affected their N mineralisation and therefore the performances of the following wheat. Hence, in the following section, the performances of wheat cultivated after spring and summer pre-crops are presented separately.

#### 3.1. Effect of pre-crop treatments and year on unfertilised wheat performances

In 2015, even if wheat after spring legumes pre-crops tended to have higher grain yields and shoot N compared to wheat after barley, there were no statistical differences among spring pre-crop treatments (Table 3). Conversely, in 2017 wheat grain yield, and shoot-N were significantly affected by spring pre-crop treatments (Table 3). Except for pea, wheat grain yields after legume pre-crop were significantly higher compared to wheat cultivated after barley with on average an increase of  $0.8 \text{ t ha}^{-1}$ . Wheat highest grain yields were measured when cultivated after faba bean ( $4.7 \text{ t ha}^{-1}$ ), common vetch ( $4.2 \text{ t ha}^{-1}$ ) and lentil ( $4.2 \text{ t ha}^{-1}$ ). Wheat shoot-N was also higher after faba bean, common vetch, and lentil compared to wheat cultivated after barley (on average  $79 \text{ kg N ha}^{-1}$  vs  $64 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). Conversely, wheat shoot N-concentration presented no differences among spring pre-crop treatments.

For summer pre-crops, and for both years (2015 and 2017), all legume pre-crops induced higher wheat grain yields and shoot-N compared to wheat cultivated after sorghum. On average wheat grain yield and shoot N were respectively  $1.6 \text{ t ha}^{-1}$  and  $23 \text{ kg N ha}^{-1}$  higher after legume pre-crops compared to wheat cultivated after sorghum. For both experiments, Narbonne vetch pre-crop treatment always induced the higher wheat grain yield and shoot N. Conversely, for both years, wheat cultivated after sorghum, presented a slightly higher shoot-N concentration compared to wheat after legume summer pre-crop treatments.

Compared to sorghum summer legume pre-crops induced higher wheat grain yield and shoot-N benefits than spring legumes pre-crop compared to barley. This was explained by the choice of reference cereal pre-crop. Indeed, wheat after sorghum always presented lower grain yields than wheat after barley for both years (2015 and 2017) (Table 3).

**Table 3** Grain yields, shoot N concentration and shoot-N of unfertilised (0N) and fertilised (40N) wheat in 2015 (Experiment I) and in 2017 (Experiment II) as affected by spring and summer pre-crop treatments. Values are mean (n=4)  $\pm$  sd (standard deviation). Mean value sharing the same letter ('a' and / or 'b') are not different according to Tukey's HDS test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

	SPRING PRE-CROPS			SUMMER PRE-CROPS			
	Wheat yield 0% humidity (t ha <sup>-1</sup> )	Wheat shoot N concentration (%N)	Wheat shoot-N (kg N ha <sup>-1</sup> )	Wheat yield 0% humidity (t ha <sup>-1</sup> )	Wheat shoot N concentration (%N)	Wheat shoot-N (kg N ha <sup>-1</sup> )	
<b>2015 - 0N</b>				<b>2015 - 0N</b>			
Common vetch	4.1 (0.5)	0.74 (0.03)	67 (6)	Common bean	3.6 (0.4) b	0.75 (0.02) bc	60 (5) b
Pea	4.3 (0.2)	0.74 (0.02)	70 (3)	Chickpea	3.9 (0.2) b	0.76 (0.02) b	64 (3) b
Lupin	4.5 (0.1)	0.74 (0.04)	73 (4)	Soybean	3.9 (0.9) b	0.76 (0.02) b	67 (12) ab
Lentil	4.7 (0.3)	0.74 (0.01)	77 (6)	Narbonne vetch	4.6 (0.1) a	0.72 (0.02) c	76 (2) a
Faba bean	4.7 (1.3)	0.75 (0.01)	78 (20)	Sorghum +N	2.3 (0.2) c	0.86 (0.02) a	43 (3) c
Barley +N	3.8 (0.3)	0.74 (0.01)	62 (5)	significance <i>p</i>	***	***	***
significance <i>p</i>							
<b>2017 - 0N</b>				<b>2017 - 0N</b>			
Fenugreek	4.0 (0.5) bc	0.78 (0.02)	70 (7) bcd	Common bean	3.9 (0.4) b	0.75 (0.02) b	67 (4) b
Common vetch	4.2 (0.1) b	0.84 (0.02)	79 (4) ab	Chickpea	3.7 (0.0) b	0.79 (0.06) b	64 (1) b
Pea	3.6 (0.4) cd	0.84 (0.04)	66 (7) cd	Soybean	3.5 (0.7) b	0.79 (0.01) b	62 (8) b
Lupin	3.8 (0.1) bc	0.78 (0.04)	65 (3) d	Narbonne vetch	5.3 (0.1) a	0.80 (0.04) b	93 (3) a
Lentil	4.2 (0.2) b	0.82 (0.04)	75 (3) abc	Sorghum +N	2.6 (0.4) c	0.89 (0.03) a	49 (4) c
Faba bean	4.7 (0.5) a	0.77 (0.01)	84 (8) a	significance <i>p</i>	***	**	***
Barley +N	3.3 (0.1) d	0.84 (0.03)	64 (2) d				
significance <i>p</i>	***		***				
<b>2017 - 40N</b>				<b>2017 - 40N</b>			
Fenugreek	4.7 (0.1) e	0.90 (0.05) b	86 (4) d	Common bean	5.8 (0.3) b	0.82 (0.01)	102 (7) a
Common vetch	5.7 (0.3) ab	0.92 (0.03) b	109 (7) ab	Chickpea	5.2 (0.4) c	0.84 (0.04)	92 (6) b
Pea	5.3 (0.3) bc	1.01 (0.06) a	105 (5) ab	Soybean	5.3 (0.0) c	0.84 (0.04)	92 (3) b
Lupin	5.1 (0.2) cd	0.92 (0.02) b	99 (5) bc	Narbonne vetch	6.5 (0.3) a	0.90 (0.07)	123 (9) b
Lentil	4.9 (0.6) de	0.91 (0.03) b	93 (13) cd	Sorghum +N	4.2 (0.2) d	0.82 (0.01)	71 (2) c
Faba bean	5.8 (0.3) a	0.87 (0.08) b	114 (8) a	significance <i>p</i>	***		***
Barley +N	4.9 (0.1) de	0.86 (0.03) b	88 (4) cd				
significance <i>p</i>	***	*	***				

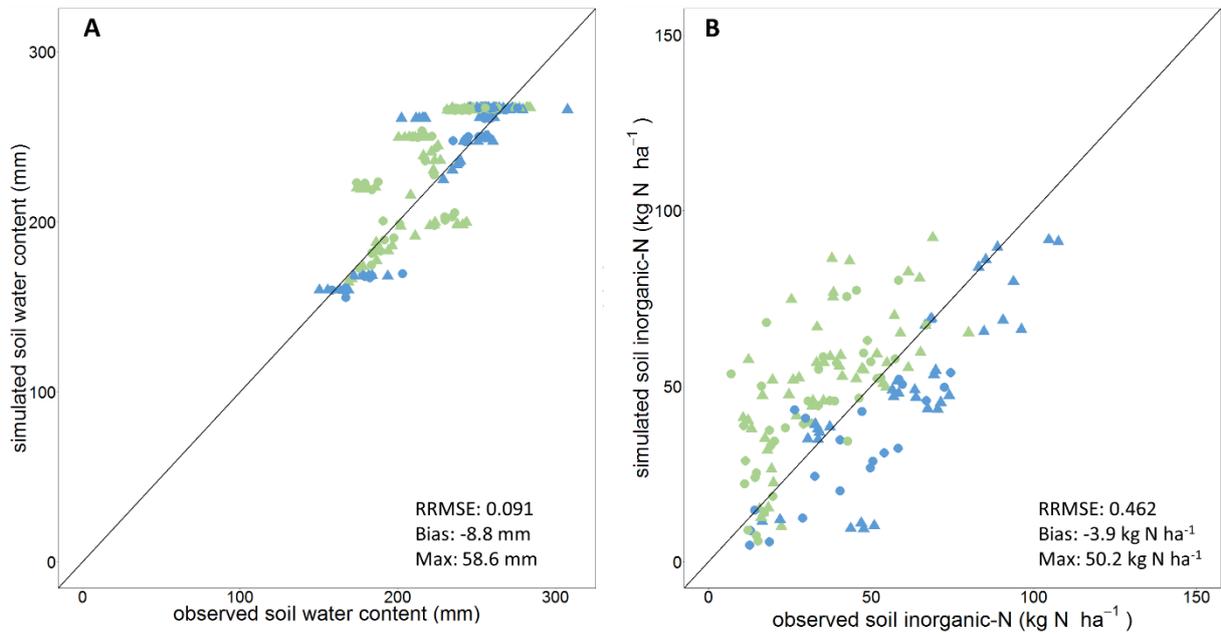
### 3.2. Effect of N fertilisation on wheat performances

In 2017, N fertilisation significantly increased grain yield, shoot N concentration and shoot-N of wheat cultivated after all spring and summer pre-crops (Tables 3). On average, for wheat cultivated after legume and cereal spring pre-crops, N fertilisation increased grain yield, shoot N concentration and shoot-N by  $1.2 \text{ t ha}^{-1}$ , 0.10% and  $27 \text{ kg N ha}^{-1}$ , respectively. Considering all summer pre-crops, wheat N fertilisation increased wheat grain yield by  $1.6 \text{ t ha}^{-1}$ , shoot N concentration by 0.04% and shoot-N by  $29 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Grain yield, shoot N concentration and shoot-N were also significantly affected by pre-crop treatments. For spring pre-crop treatments, grain yields and shoot-N of fertilised wheat cultivated after pea, common vetch and faba bean were significantly higher than fertilised wheat cultivated after barley (on average  $+ 0.7 \text{ t ha}^{-1}$  and  $+ 21 \text{ kg N ha}^{-1}$ , respectively). For summer pre-crop treatments, fertilised wheat cultivated after legumes had significantly higher grain yields and shoot-N compared to fertilised wheat cultivated after sorghum (on average  $1.5 \text{ t ha}^{-1}$  and  $31 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) with the highest values measured for the Narbonne vetch pre-crop treatment.

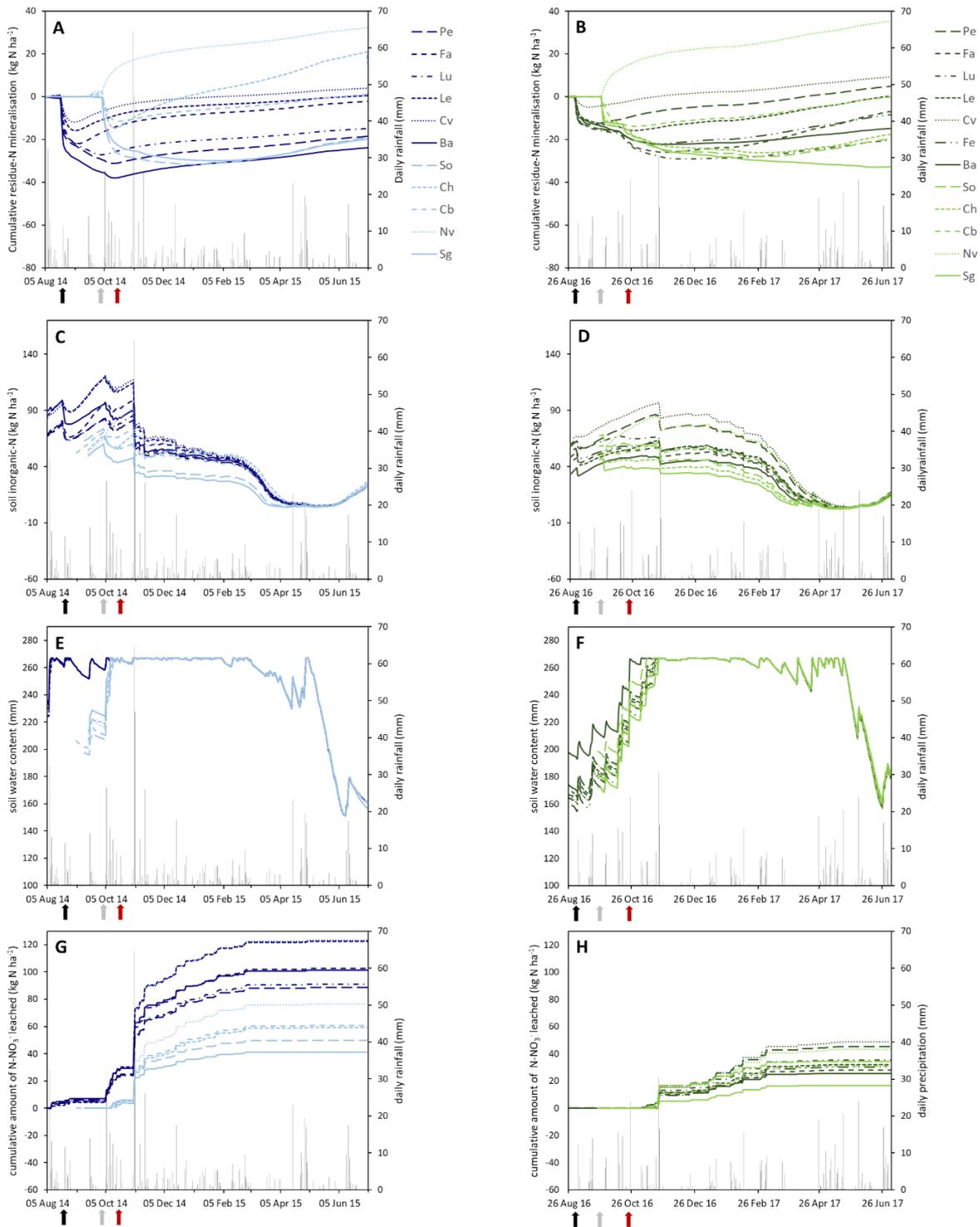
### 3.3. Estimation of residue and soil N fluxes between pre-crop harvest and wheat harvest

In order to evaluate the model's predictive performance in our pedoclimatic conditions, simulated data were compared with measured soil water content and soil inorganic-N, which are known to be strong drivers of  $\text{NO}_3^-$  leaching, and residue and soil organic matter N mineralisation (Fig. 2). The STICS model was efficient for predicting soil water content, leading to a small RRMSE (0.092) (Fig. 2A). The RRMSE (0.462) was higher for soil inorganic-N (Fig. 2B).

There was a slight tendency to over-estimate both variables, as we obtained an overall negative bias but with small absolute values:  $-8.9 \text{ mm}$  for soil water (Fig. 2A) and  $-3.9 \text{ kg N ha}^{-1}$  for soil inorganic-N (Fig. 2B). However, soil inorganic-N was systematically under-estimated in Experiment I (bias =  $+12.2 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) while it was always over-estimated in Experiment II (bias =  $-14.2 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). However, the classification between pre-crop species according to soil inorganic-N was correctly simulated in both experiments. Therefore, for a given experiment, simulations can be used to compare pre-crop treatments but absolute values need to be considered with caution when comparing experiments.



**Fig. 2** Simulated vs. observed soil water content (0 - 60cm) (**A**) and soil inorganic-N (0 – 60 cm) (**B**) in Experiment I (blue) and Experiment II (green) between pre-crop harvest and wheat harvest. Wheat was cultivated after spring pre-crops (▲) and summer pre-crops (●). The solid line corresponds to the 1:1 line. See Appendix 8 for observed and simulated values over time.



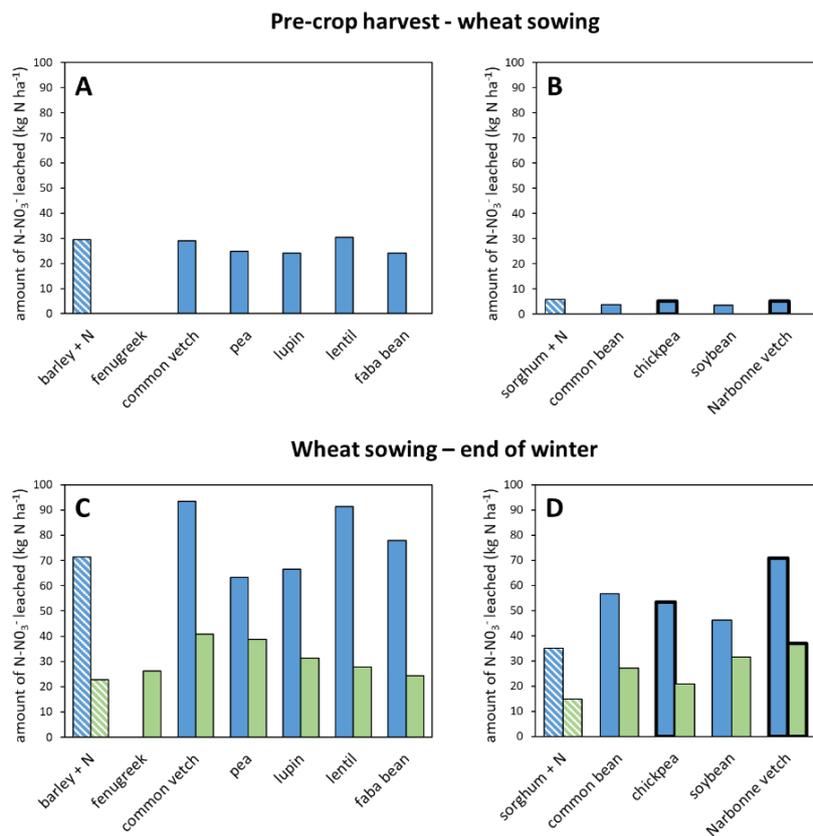
**Fig. 3** Cumulative amounts of N mineralised from crop residues (A, B), soil inorganic-N (C, D), soil water content (E, F) and cumulative amounts of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leached (G, H) simulated with STICS for Experiment I (A, C, E, G) and Experiment II (B, D, F, H). Simulations were performed for the period between pre-crop harvest and winter wheat harvest. Dark blue and dark green curves are the simulations performed for the spring pre-crop treatments and light blue and light green curves are the simulations performed for summer pre-crops treatments. Black and grey arrows indicate the incorporation dates of spring and summer pre-crop residues, respectively. The red arrows indicate the sowing dates of wheat. Pre-crop ID are specified in Table 2. See Appendix 7 for the amount of soil residual inorganic nitrogen at pre-crop harvest (values used for soil initialisation).

Crop residue-N mineralisation was simulated for all pre-crops and both experiments (Fig. 3A: Experiment I and 3B: Experiment II). Cumulative amounts of N mineralised from residues followed a similar trend for all pre-crop species and for both experiments. Rapid N immobilisation occurred just after the incorporation of crop residues in the soil, followed by net N mineralisation a few weeks later. Because summer pre-crop residues were incorporated several weeks after spring pre-crop residues, we observed a delay in the dynamics of crop residue-N mineralisation between spring (Fig. 3: dark colours) and summer (Fig. 3: light colours) pre-crop residues. At the end of the simulations, the cumulative amounts of crop residue-N mineralisation ranged from  $-24 \text{ kg N ha}^{-1}$  (barley) to  $+32 \text{ kg N ha}^{-1}$  (Narbonne vetch) in Experiment I and from  $-33 \text{ kg N ha}^{-1}$  (sorghum) to  $+35 \text{ kg N ha}^{-1}$  (Narbonne vetch) in Experiment II.

The total amount of soil inorganic-N over time was also simulated (Fig 3C: Experiment I and 3D: Experiment II). At the beginning of the simulation, it was higher after spring pre-crops compared to summer pre-crops in Experiment I. Consequently, soil inorganic-N was higher during the whole simulation period for spring pre-crop treatments compared to summer pre-crops in Experiment I. In Experiment II the mean amount of soil inorganic-N at the beginning of the simulation was on average  $53 \text{ kg N ha}^{-1}$ .

The simulated amounts of soil water (Fig. 3E: Experiment I and 3F: Experiment II), were also higher at simulation initiation for spring pre-crop treatments compared to summer pre-crops in Experiment I and for barley in Experiment II. Once rainfalls had filled the soil profile up to full water capacity, the amount of soil water was identical for all pre-crop treatments. However, in Experiment I, soil reached field water capacity almost immediately after initiating the simulations for spring pre-crop treatments while it was reached 2 months later for summer pre-crops (October 12<sup>th</sup> 2014). In Experiment II, field soil water capacity was reached even later for all pre-crop treatments (between November 4<sup>th</sup> 2016 for barley pre-crop treatment and November 21<sup>th</sup> 2016 for chickpea, common bean and sorghum).

In both experiments, most of the N leaching occurred between wheat sowing and the end of winter (Fig. 4) as the soil remained at maximum water capacity almost throughout the period (Fig 3E and F). The soil profile was regularly filled by rainfall. During this period, N leaching in Experiment I was on average 77 kg N ha<sup>-1</sup> for spring pre-crop treatments, with values ranging from 63 kg N ha<sup>-1</sup> (pea) to 93 kg N ha<sup>-1</sup> (common vetch) (Fig. 4C). For summer pre-crop treatments the average value of N leaching during the same period was 52 kg N ha<sup>-1</sup> (Fig 4D). In Experiment II, the average amounts of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leached between wheat sowing and the end of winter were lower than in Experiment I for both spring (30 kg N ha<sup>-1</sup>) and summer (26 kg N ha<sup>-1</sup>) pre-crop treatments, because of lower rainfall in Experiment II, especially in November (Fig. 1). Hence, climatic conditions and pre-crop harvest positioning in the year mainly explained the differences of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leached throughout the simulation period between both experiments. Based on all pre-crop treatments, N leaching was higher in Experiment I compared to experiment II ( $F(1,19)=55.51$ ,  $p < 0.001$ ) and considering both experiments N leaching was higher after spring pre-crops compared to summer pre-crops ( $F(1,19)=14.68$   $p < 0.01$ ), especially in Experiment I.

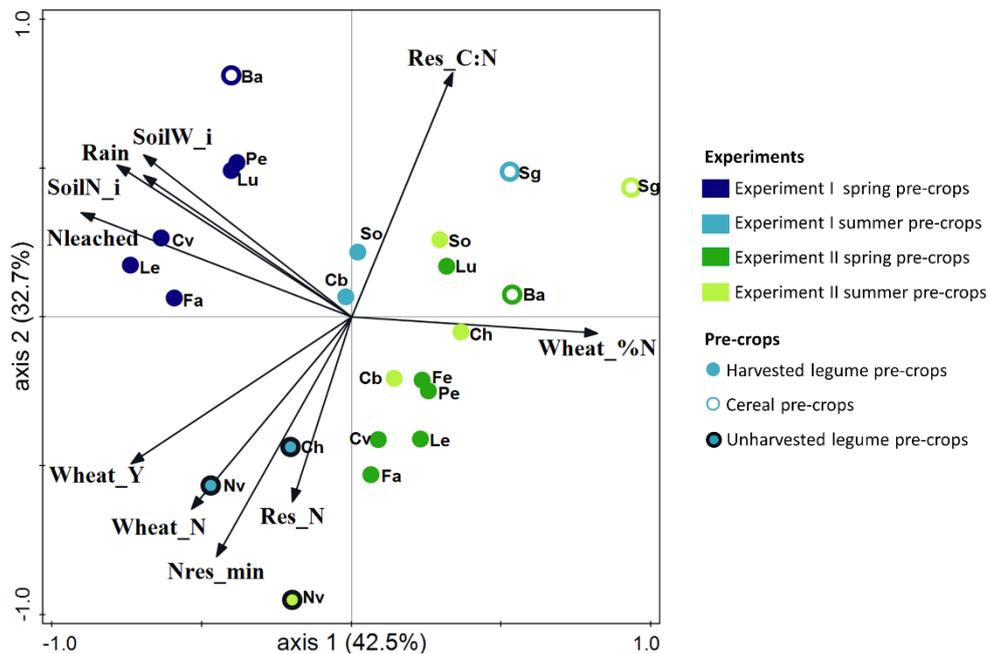


**Fig. 4** STICS model simulations obtained for the cumulative N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leached between pre-crop harvest and wheat sowing (**A, B**) and between wheat sowing and the end of winter (1<sup>st</sup> March) (**C, D**) in Experiment I (blue bars) and II (green bars). Simulations were performed for spring pre-crops (**A, C**) and summer pre-crops (**B, D**). Legume pre-crops: solid bars; cereal pre-crops: hatch bars. Bars with a heavy dark border indicate legumes for which the whole plant was considered as crop residues since there was no grain production.

3.4. Relationships between wheat performances, pre-crop characteristics, and pedoclimatic conditions

A principal component analysis (PCA) was performed to better understand the links between wheat performances (yield, shoot-N and shoot N concentration) and the soil N fluxes occurring after pre-crop harvest (pre-crop residues-N mineralisation, N leaching) as affected by pre-crop (residue-N, residue C:N ratio, soil inorganic-N and water content after pre-crop harvest), and how they were influenced by climatic conditions (rainfalls).

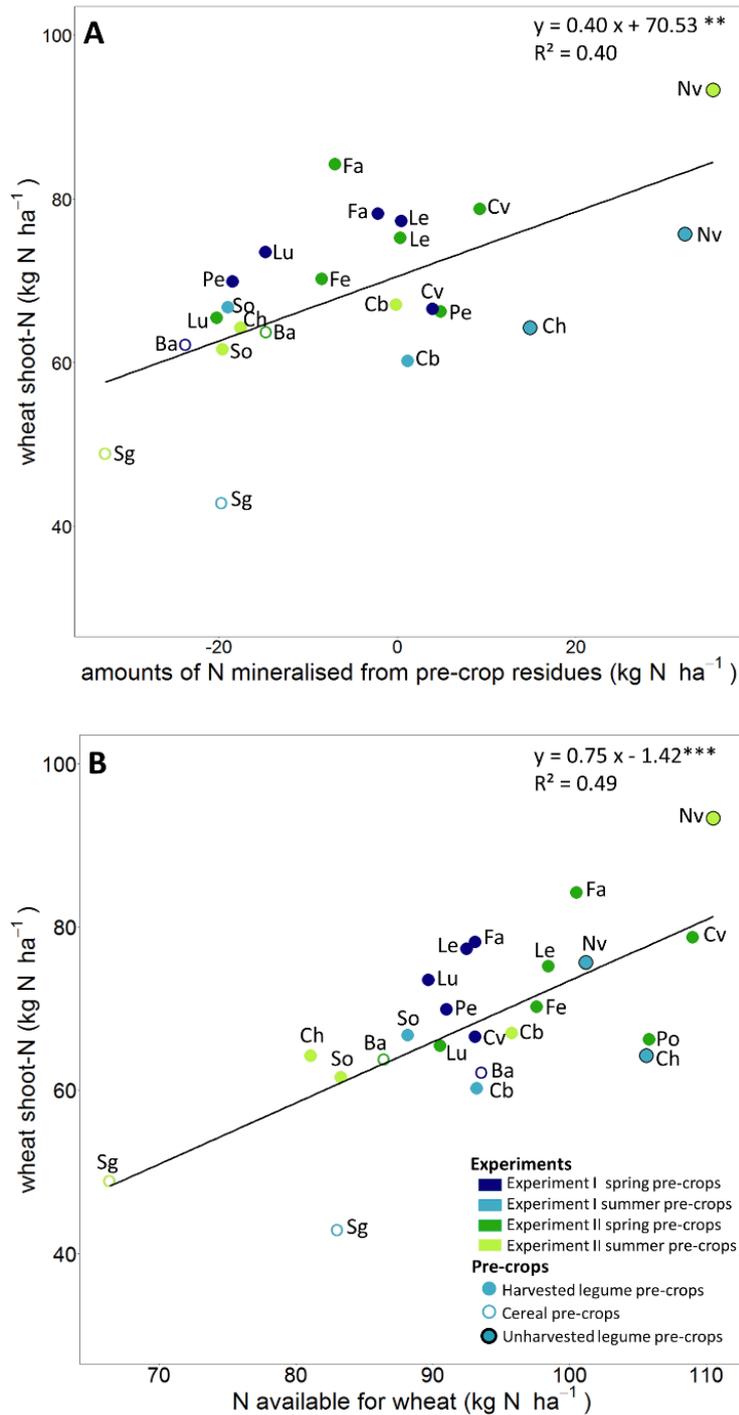
The first and second axes of the PCA accounted for 42.5 and 32.7%, respectively, of the total variance (Fig. 5). The cumulative amounts of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leached between pre-crop harvest and wheat harvest (19%), cumulative rainfalls during the simulation period (14%), water content in the soil profile (11%) and soil inorganic-N content (11%) at the beginning of the simulation accounted the most for the first axis. These four variables were positively correlated but all four were correlated negatively with wheat shoot N concentration. Pre-crop residue C:N ratio (21%) and the cumulative amounts of N mineralised from pre-crop residues (20%) contributed the most to the second axis and were correlated negatively. Conversely, the cumulative amounts of N mineralised from pre-crop residues was positively correlated with wheat grain yield and wheat shoot-N.



**Fig. 5** Biplot PCA showing the distribution of pre-crop species according to environmental conditions, crop residue proprieties and wheat performances. Amounts of N in pre-crop shoot residues (Res\_N); pre-crop residues C:N ratio (Res\_C:N); soil inorganic-N at the start of simulation (SoilN\_i); water content in the soil profile at the start of simulation (SoilW\_i); cumulative rainfalls during the simulation period (Rain); cumulative amounts of N mineralised from pre-crop residues during the simulation period (Nres\_min); cumulative amounts of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leached during the simulation period (Nleached); wheat grain yield (Wheat\_Y); wheat shoot-N (Wheat\_N); wheat shoot N concentration (Wheat\_%N). Pre-crop ID are specified in Table 2.

A clear distinction between pre-crop treatments could be made on the first axis of the PCA. Firstly, according to the year of the experiment and, secondly, between spring and summer pre-crop treatments, especially in Experiment I (Fig. 5). The distinction between both experiments was mainly explained by contrasting rainfall conditions leading to different amounts of leached  $\text{N-NO}_3^-$ . Experiment I was characterised by high rainfalls, especially between August and November 2014, which rapidly reached the maximum water capacity and led to N losses by leaching. This was mostly the case for spring pre-crop treatments. Rainfalls were lower in Experiment II, especially between August and November 2016, leading to lower N losses by leaching compared to Experiment I.

The second axis of the PCA separated pre-crops species according to their effect on wheat yield and wheat shoot-N. Pre-crops for which the whole plant was considered as crop residues since no grains were harvested (chickpea in Experiment I and Narbonne vetch in Experiment I and II) led to the highest amounts of N mineralised from pre-crop residues ( $\text{Nres}_{\text{min}}$ , Fig. 5) and to the highest wheat grain yield ( $\text{Wheat}_Y$ ) and shoot N ( $\text{Wheat}_N$ ). For harvested grain pre-crops, the highest amounts of N mineralised from pre-crop residues was measured for faba bean, lentil and common vetch, and associated with high wheat grain yield and shoot-N. Conversely, cereal pre-crops always had low crop residue-N mineralisation rates and were associated with the lowest wheat grain yield and shoot-N. Figure 6A shows the positive linear relationship between wheat shoot-N and cumulative amounts of N mineralised from pre-crop residues throughout the simulation period. However, for a given amount of pre-crop residue N mineralisation (for example  $0 \text{ kg N ha}^{-1}$ ), wheat shoot-N still varied widely (between 60 and  $77 \text{ kg N ha}^{-1}$  in our example) according to the year of the experiment and between summer and spring pre-crops. Hence, climatic conditions affected the N losses by leaching, and may also have influenced soil organic-N mineralisation (as it depends on soil temperature and moisture). Moreover, at pre-crop harvest, the amounts of soil inorganic-N left in the soil ( $\text{N sparing}$ ) were variable and clear differences could be observed between spring and summer pre-crops in experiment I. The amount of N actually available during the wheat growth cycle was therefore calculated, taking into account N inputs (soil inorganic-N at pre-crop harvest, crop residue-N mineralisation and soil organic-N mineralisation) and N outputs (N leaching). It was plotted versus wheat shoot-N measured in Experiments I and II (Fig. 6B). A unique positive linear relationship was found between both variables for Experiments I and II and for spring and summer pre-crops. Generally, spring pre-crops and unharvested legume pre-crops (chickpea in Experiment I and Narbonne vetch in Experiment I and II) led to the highest amounts of N available for the following wheat and were associated with the highest wheat shoot-N. Conversely, the rest of summer pre-crops led to the lowest amounts of N available for the following wheat and were associated with the lowest wheat shoot-N. However, the relationship did not entirely explain the variability of wheat shoot-N.



**Fig. 6** Relationships between wheat shoot-N at harvest and the amount of N mineralised from pre-crop residues estimated by the STICS model (A) and the amounts of N available for wheat (soil inorganic-N at pre-crop harvest + crop residue-N mineralisation + soil organic-N mineralisation – amount of N leached) (B). The significance of the linear regression is shown as \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001. Pre-crop ID are specified in Table 2.

## 4. Discussion

### 4.1. Response of wheat performances to pre-crops and N fertilisation

Our study confirmed the positive effect of a wide variety of grain legumes on the yield of the following unfertilised cereal except in 2015 for spring legume pre-crops. In 2017, the additional 0.3 – 1.4 t ha<sup>-1</sup> grain yield of wheat after spring legume pre-crops compared to wheat after barley led to increased grain yields ranging from 8 to 42% (on average 21%). For summer legume pre-crops and considering both experiments, the additional 1.1 – 2.7 t ha<sup>-1</sup> grain yield of wheat compared to wheat after sorghum was much higher and led to increased grain yields ranging from 50 to 103% (on average 66%). The increases of wheat grain yields after spring legume pre-crops were slightly lower than the average yield response of cereals cultivated after legumes reported by Angus et al. (2015) (on average 1.2 t ha<sup>-1</sup> representing an increase of 33%) and Cernay et al. (2017) (on average a 29% increase). Conversely, increases of wheat grain yields after summer legume pre-crops were close to values reported by Preissel et al. (2015) (0.9 – 2.8 t ha<sup>-1</sup> representing 27 – 110% improvement) and Espinoza et al. (2012) (0.74 – 2.75 t ha<sup>-1</sup> representing an increase from 23 to 152%). Higher increases of wheat grain yields after summer legume pre-crops were mainly due to the difference of wheat yields depending on the reference cereal pre-crop.

Benefits to wheat grain yields showed large variations between spring and summer pre-crops, reflecting differences in legume pre-crops. For spring pre-crops, wheat grain yields were highest after faba bean and lentil. Williams et al. (2014) obtained similar results with higher wheat grain yields after faba bean compared to lupin. However, Wright (1990) measured similar wheat grain yields after pea, lentil and faba bean. Surprisingly, wheat grain yields after pea were not significantly different from those of wheat after barley, while several studies measured increases in cereal grain yields after pea (Kirkegaard and Ryan, 2014; Miller et al., 2003; Strong et al., 1986). For summer legume pre crops, Narbonne vetch led to the highest increases in wheat grain yields.

For a given year, only wheat after sorghum led to a higher shoot N concentration compared to wheat after summer pre-crops. These results can certainly be explained by higher N availability per unit of biomass, since wheat after sorghum always presented the lowest grain yields. Consequently, the increases in wheat shoot-N after spring legume pre-crops (on average 15%) were within the same range as the increases in wheat grain yields (on average 21%). For summer legume pre-crops wheat shoot-N increases (on average 51%) were slightly lower than the increases in grain yield (on average 66%).

Although wheat was supplied with small amounts of N fertilisation (40 kg N ha<sup>-1</sup>), grain yield, shoot N concentration and shoot-N increased for all pre-crop treatments. It reflected the limitation of N for all the pre-crop treatments when wheat was unfertilised. For spring pre-crops, N fertilisation reduced

grain yield benefits of fenugreek, lupin and lentil pre-crop treatments compared to barley. Similar results were found by Preissel et al. (2015) for pea, faba bean and lupin pre-crops. However for summer pre-crops, grain yield and shoot N benefits after summer legume pre-crops compared to sorghum were unchanged when wheat was N fertilised. An average N fertilisation threshold of 153 kg N ha<sup>-1</sup> was calculated in the meta-analysis of Cernay et al. (2017) above which legume pre-crops no longer had a positive effect on the subsequent cereal grain yield compared to cereal pre-crops. As the amount of N fertiliser applied in our experiment was far below this threshold, most legume pre-crops still induced an increase in wheat grain yields compared to cereal pre-crops.

#### 4.2. N fluxes simulated by the STICS model

Maximum differences between the lowest and the highest amounts of N mineralised from pre-crop residues were 56 kg N ha<sup>-1</sup> in Experiment I and 68 kg N ha<sup>-1</sup> in Experiment II. The STICS crop residue-N mineralisation module is based on the crop residue C:N ratio (Justes et al., 2009; Nicolardot et al., 2001). A single negative logarithmic relationship between the cumulative amount of N mineralised from pre-crop residues at the end of the simulation period and the pre-crop residue C:N ratio was established for the two experiments ( $y = -31.87 \ln(x) + 111.66$ ;  $R^2 = 0.92$ ) (Fig. S1). Most pre-crop residues induced soil inorganic-N immobilisation during their decomposition, but the highest amounts of N immobilised were measured for barley, sorghum soybean and lupin pre-crop residues, which had the highest C:N ratios. Conversely, the highest amounts of N mineralised from pre-crop residues were found for legume pre-crops for which the whole plant was considered as crop residues (chickpea in Experiment I and Narbonne vetch in Experiment II) and for which C:N ratios were the lowest.

Higher amounts of soil inorganic-N were measured at pre-crop harvest and simulated afterwards by the STICS model for spring pre-crops compared to summer pre-crops in Experiment I. Likewise, at the beginning of the simulation period, soil water contents were in general higher after spring pre-crops. Part of the differences may probably have been due to the growth cycle delay between spring and summer pre-crops. Since summer pre-crops were harvested after spring pre-crops, they may have retrieved inorganic-N and water from the soil later in the season compared to spring pre-crops which had already reached their physiological maturity. Therefore, once spring pre-crops reached physiological maturity, soil water and inorganic-N resulting from rainfall and soil organic-N mineralisation, respectively, accumulated in the soil while summer pre-crops may have retrieved these resources to fulfil their requirements for growth. Hence, soil water and inorganic-N contents were not only affected by pre-crop treatments, but also by their growth period (spring vs summer) and the positioning of their water and N requirements according to the pedoclimatic conditions which drive the dynamics of resource availability.

A part of soil inorganic-N was lost by leaching during the autumn-winter period because of a lack of synchronisation between N uptake by the subsequent wheat and soil inorganic-N dynamics. During this period, on the one hand, wheat development was very low, thus inducing low inorganic-N and water uptake, whereas on the other hand, there were large amounts of soil inorganic-N and high water contents remaining in the soil after the pre-crop harvest combined with rainfall during autumn. This was particularly the case in Experiment I due to very high rainfalls at the end of summer and during autumn and for spring pre-crops for which high soil inorganic-N and water content were measured at harvest.

The amounts of N leached were certainly slightly under-estimated in Experiment I and over-estimated in Experiment II since the amounts of soil inorganic-N were on average under-estimated by 12 kg N ha<sup>-1</sup> and over-estimated by 14 kg N ha<sup>-1</sup> by the STICS model, respectively. Several studies (Beaudoin et al., 2008; Constantin et al., 2012; Coucheney et al., 2015) also highlighted the difficulty of accurately predicting soil inorganic-N with the STICS model and Coucheney et al. (2015) found an RRMSE close to our own value (0.52 vs 0.46). Soil N dynamics results from multiple and simultaneous processes in interaction with the plant and water fluxes, often making prediction more difficult compared to soil water dynamics (De Willigen, 1991). In the case of a maximum under-estimation of 12 kg N ha<sup>-1</sup> in Experiment I and a maximum over-estimation of N leaching by +14 kg N ha<sup>-1</sup> in Experiment II, it supports the fact that in Experiment II N leaching was much lower than in Experiment I, especially because of lower rainfalls between August and November.

#### 4.3. Link between N fluxes and wheat shoot-N

One of our objectives was to better understand increases in wheat shoot-N due to legume pre-crops N benefits. Legume crop residues can provide substantial amounts of inorganic-N to the soil during their decomposition. N mineralised from pre-crop residues allowed distinguishing pre-crop treatments based on the pre-crop residue C:N ratio. Conversely, the amount of N available for the subsequent wheat was mainly distinguished between the experiments according to climatic conditions that generated N losses by leaching, and spring and summer pre-crops as a function of the amount of soil inorganic-N left after pre-crop harvest, especially in Experiment I.

A positive relationship was established between the amount of N available for the subsequent crop and wheat shoot-N. However, in all situations, wheat shoot-N could have been increased as wheat growth was limited by N availability. Thus, higher amounts of inorganic-N could have been available for wheat if N losses had been reduced during the autumn-winter period. Our study points out the necessity of synchronisation between soil inorganic-N availability and the N demand of the subsequent crop to maximise its growth and fulfil its N requirements.

The amount of N available for the subsequent wheat accounted for 49% of wheat shoot-N variability. Several N fluxes were not taken into account in our calculation. Pre-crop residue-N mineralisation only took into account aboveground crop residues while ignoring below-ground residues and N rhizodeposition. Nor were nitrogen losses by nitrous oxide emissions taken into account. Furthermore, improvements of shoot-N after legume pre-crops may not be solely attributable to N benefits (Peoples et al., 2009a). Introducing legumes in a cereal based rotation can significantly reduce cereal soil borne diseases (Angus et al., 2015; Kirkegaard et al., 2008) and enhance microbial diversity and activity (McDaniel et al., 2014; Tiemann et al., 2015). These factors were not measured in the present study but may have improved wheat shoot-N and grain yields after legume pre-crops compared to cereal pre-crops.

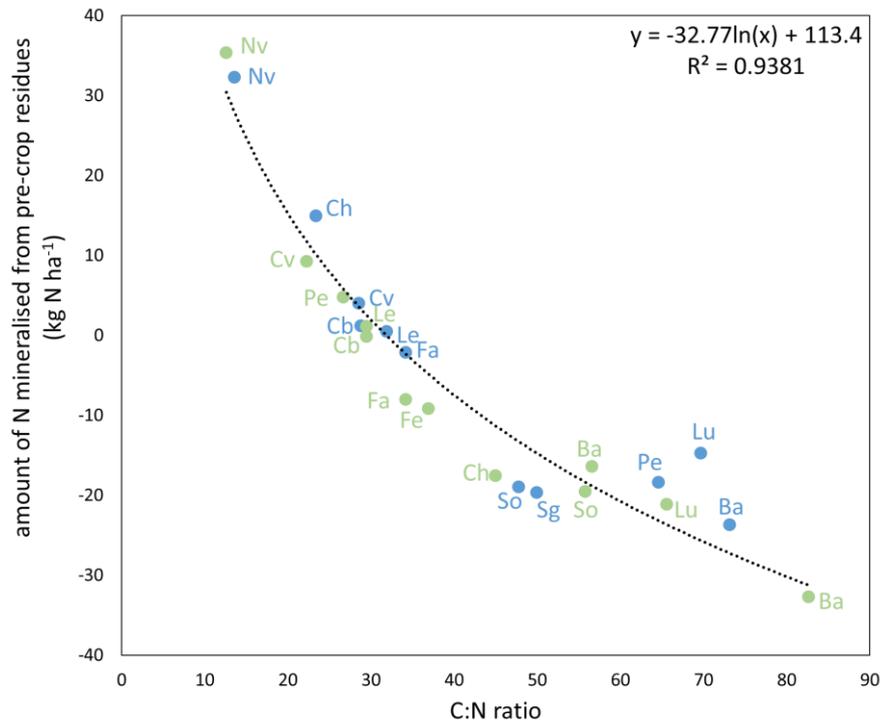
## 5. Conclusion

This study confirmed the relevance of reintroducing grain legumes in cereal- based cropping systems in Europe, due to the positive effect of a wide range of legume pre-crops on the yield and shoot-N of the subsequent wheat. Differences between legume pre-crops were however highlighted according to: i) the amount of N mineralised from their residues, ii) the amount of inorganic-N left in the soil at harvest, and iii) the amount of N lost after legume harvest. These differences between pre-crop legumes need to be taken into account to increase the efficiency of subsequent crop use of N provided by legumes while limiting N losses. Higher amounts of inorganic-N derived from residue mineralisation were found for species with low residue C:N ratios and were positively correlated to the amounts of N in the subsequent wheat. Legume growth cycle positioning in the year in relation to soil inorganic-N dynamics also modulated the amount of N left in the soil at harvest and the risks of N leaching when high precipitation occurs during the autumn-winter period. A longer fallow period, especially after spring legumes with earlier harvesting compared to summer legumes, increase the risk of N leaching due to inorganic-N accumulation in the soil and the more frequent rainfall during this period. Adapted management practices, such as the establishment of cover-crop during the fallow period (Constantin et al., 2012; Tribouillois et al., 2015a), especially for long fallow period, are crucial to reduce N losses by stocking soil nitrogen before the establishment of the subsequent crop. Finally, the choice of the subsequent crop with an earlier sowing date than wheat and with a high capacity to retrieve soil inorganic-N during the early stages (for example, oilseed rape) might also be a sensible choice for reducing N losses after legume harvest (Dejoux et al., 2003).

### **Acknowledgements**

M. Guinet received a grant from INRA and the Ministry of Agriculture. This experimental work was supported by the ANR LEGITIMES, INRA Bourgogne-Franche-Comté Region (PSDR project ProSys), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme [No 727247 - SolACE project] and Terres Inovia. We also thank L. Andriot, F. Bizouard, A. Coffin, M. Dourneau, C. Ducourtieux, V. Durey, L. Lebeigle, F. Lombard, E. Pinet, B. Serbource, J. Welter for their excellent technical assistance and L. Falchetto for the agronomic management of the field experiments. Lastly, we thank the STICS team for their help in showing how to use the model correctly.

**Fig. S1** The amount of N mineralised from pre-crop residues (calculated by STICS model) as related to residue C:N ratios. Residues from the first field experiment (2014) are in blue and residues from the second field experiment (2016) are in green.



*Ba: Barley; Ch: Chickpea; Cb: Common bean; Cv: Common vetch; Fa: Faba bean; Fe: Fenugreek; Le: Lentil; Lu: Lupin; Nv: Narbonne vetch; Pe: Pea; Sg: Sorghum; So: Soybean*



## Chapitre 4 : Comparaison de la multifonctionnalité relative aux flux azotés induits par dix espèces de légumineuses à graines



## Comparaison de la multifonctionnalité relative aux flux azotés induits par dix espèces de légumineuses à graines

### Résumé

Les légumineuses sont à l'origine de fonctions uniques et/ou complémentaires à celles d'autres groupes d'espèces (céréales, oléagineux) sur lesquelles reposent des services écosystémiques. Pourtant, le choix des légumineuses à graines selon leur aptitude à fournir des services écosystémiques relatifs à l'azote reste difficile compte tenu du manque de références sur une diversité d'espèces.

Dans les chapitres précédents, plusieurs flux azotés induits par les dix espèces de légumineuses, et utilisés comme indicateurs des fonctions génératrices de services écosystémiques ou d'impacts négatifs, ont été quantifiés au cours de deux successions culturales de deux ans (légumineuse –blé) : quantité d'azote dans les graines de légumineuses, quantité d'azote atmosphérique fixée au cours du cycle, quantité d'azote des légumineuses issue du prélèvement d'azote minéral, quantité d'azote minéral perdue par lixiviation après la récolte des légumineuses, et quantité d'azote prélevée par le blé suivant sur la totalité de son cycle. Un travail d'identification des traits de plantes déterminants dans l'obtention des différents flux azotés a également été initié. En étudiant simultanément cinq flux azotés et les traits de plantes considérés comme explicatifs de ces flux azotés, l'objectif de ce chapitre est de dresser le **profil fonctionnel des dix espèces de légumineuses**. Il s'agit de comprendre les synergies et les antagonismes entre les flux azotés et les traits de plantes, afin de caractériser les espèces quant à leur aptitude à délivrer les services écosystémiques recherchés et limiter des impacts négatifs.

Nos résultats indiquent que la quantité d'azote accumulée dans les graines de légumineuses et la quantité d'azote fixée sont deux flux azotés positivement corrélés et liés à la biomasse aérienne des légumineuses, à l'indice de récolte azoté, au poids moyen d'une graine, à la teneur en azote des graines de légumineuses et à la teneur en cellulose des pailles. A ces traits s'opposent le rapport azote / carbone des pailles positivement associé à la quantité d'azote dans le blé suivant. Il existe un clair antagonisme entre la quantité d'azote perdue par lixiviation après la récolte des légumineuses et la quantité d'azote minéral prélevée par les légumineuses durant leur cycle, ce dernier flux azoté étant positivement associé à la vitesse d'expansion latérale du système racinaire et au rapport entre la biomasse nodulaire et la biomasse souterraine totale. Ces profils permettent de distinguer les espèces avec de fortes capacités de prélèvement d'azote minéral pendant leur cycle et de faibles pertes par lixiviation après leur récolte (haricot, pois chiche et soja), par rapport aux espèces avec de plus faibles capacités de prélèvement de l'azote minéral et pour lesquelles il existe de plus grands risques de lixiviation de l'azote (vesce de Narbonne, vesce commune, fenugrec, lentille, féverole). Ces dernières espèces ont par contre tendance à engendrer de plus grandes quantités d'azote dans le blé suivant par rapport au haricot, pois chiche et soja. Enfin la féverole en 2016 et le soja en 2014 présentaient en les plus grandes quantités d'azote fixées ainsi que les plus grandes quantités d'azote dans les graines par rapport aux autres espèces et années.

A partir de cette approche, la caractérisation des espèces par les traits identifiés comme déterminants dans l'obtention des flux azotés donne des indications qualitatives sur le potentiel des différentes espèces de légumineuses à graines à fournir des services écosystémiques relatifs à l'azote.

## 1. Introduction

Face aux problèmes environnementaux (pollution de l'eau, de l'air, érosion de la biodiversité, ...), à la raréfaction des ressources et dans un contexte de changement climatique (Steffen et al., 2015), les nouveaux systèmes de culture doivent assurer la production de denrées alimentaires par une utilisation efficiente des ressources tout en minimisant leurs impacts négatifs sur l'environnement (Tilman et al., 2002). Ainsi, un accent particulier est porté sur la fourniture de services écosystémiques, c'est-à-dire les avantages socio-économiques retirés par l'homme de son utilisation durable des fonctions écologiques des écosystèmes (EFESE, 2017). Les systèmes agricoles ont trop longtemps été considérés pour leur seule aptitude à produire des biens agricoles mais sont récemment de plus en plus reconnus pour leur capacité à également fournir des services écosystémiques (Power, 2010; Zhang et al., 2007).

L'essor d'une agriculture durable nécessite de maximiser la production des biens agricoles reposant sur des services écosystémiques afin de limiter le recours aux intrants de synthèse tels que les fertilisants azotés ou les pesticides (Tibi and Therond, 2017). La fourniture de services écosystémiques repose notamment sur la réintroduction de la biodiversité spatiale et temporelle (Isbell et al., 2011) dans les paysages agricoles ainsi qu'au sein même des parcelles agricoles. En effet, la diversité des espèces constitutives des agroécosystèmes est à l'origine de différentes fonctions, qui résultent de processus écologiques, et sur lesquelles reposent un certain nombre de services écosystémiques. Ces services peuvent être des services de régulation des stress biotiques et abiotiques qui fournissent des conditions propices au développement des cultures, en favorisant par exemple la fourniture de nutriments aux plantes cultivées, ou en régulant les ravageurs des cultures. Il peut également s'agir de services de régulation qui contribuent à atténuer le changement climatique ou la diffusion de polluants dans différents compartiments de l'environnement, en atténuant par exemple l'émission de gaz à effet de serre ou en régulant la qualité de l'eau vis-à-vis des éléments minéraux ou pesticides de synthèse (Kremen, 2005; Tibi and Therond, 2017). La complémentarité entre les fonctions induites par les différentes espèces permet : i) une meilleure valorisation des ressources, ii) une fourniture simultanée d'un plus grand nombre de services écosystémiques, et iii) une meilleure capacité d'adaptation aux perturbations environnementales. Au sein des parcelles agricoles, plusieurs travaux ont cherché à caractériser les espèces selon leur capacité à remplir des fonctions associées à la fourniture de services écosystémiques. La majorité des études ont porté sur les prairies multi-spécifiques (Tilman et al., 1996), les cultures associées (Corre-Hellou et al., 2006), les plantes de service associées à des cultures de rente (Lorin et al., 2016; Lorin et al., 2015; Tardy et al., 2015) ou encore sur les couverts implantés durant l'interculture (Couëdel et al., 2018; Tribouillois et al., 2015a), afin de favoriser le prélèvement des ressources du sol, participer à la fertilité du sol, réduire les pertes d'eau et de nutriments ou limiter la compétition liée à la présence d'adventices. Les légumineuses sont à l'origine de fonctions uniques

et/ou complémentaires avec d'autres cultures, et ont dans ce sens un rôle prépondérant à jouer dans la fourniture de services écosystémiques lors de leur réintroduction dans les systèmes de culture majoritairement composés de céréales ou d'oléagineux. En effet, les légumineuses permettent non seulement d'assurer la production de biens agricoles grâce à la production de graines riches en protéines, mais également de fournir des services de régulation grâce à l'acquisition d'azote pendant la croissance des légumineuses via le processus de fixation symbiotique ou grâce à la fourniture d'azote à culture suivante via le processus de minéralisation de leurs résidus de culture plus ou moins riches en azote. Au contraire, des impacts négatifs peuvent également résulter de l'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture. La plus faible capacité des légumineuses à prélever l'azote minéral du sol par rapport aux céréales ainsi que la désynchronisation entre l'apport d'azote au sol par les légumineuses et les besoins en azote de la culture suivante, peuvent générer des risques de pertes d'azote par lixiviation pendant la culture des légumineuses ou après leur récolte durant la période automne-hiver. Ces risques sont malgré tout très dépendants des précipitations durant ces périodes. Dans les chapitres précédents, de grandes différences entre les dix espèces de légumineuses ont été mises en avant en termes de fonctions relatives à l'azote, étudiées sous l'angle des principaux flux azotés générés par ces cultures : quantité d'azote issue de la fixation symbiotique, quantité d'azote minéral du sol prélevée, quantité d'azote apportée à la culture suivante et quantité d'azote perdue par lixiviation après la récolte des légumineuses. De même, des différences en termes de quantités d'azote exportées par les graines, permettant la fourniture de graines végétales riches en protéines peuvent être attendues entre espèces. Par ailleurs, l'un des enjeux consiste à identifier les synergies ou les antagonismes entre les différentes fonctions associées aux légumineuses et donc les flux azotés utilisés comme indicateurs des fonctions, afin de déterminer l'aptitude des différentes espèces de légumineuses à fournir simultanément plusieurs services (Bennett et al., 2009; Lescourret et al., 2015). La caractérisation des espèces selon leur capacité à remplir les fonctions associées aux services recherchés constitue un moyen d'aider aux choix des espèces les plus appropriées selon les usages recherchés (Damour et al., 2014; Tribouillois et al., 2015a).

Cependant, la mesure systématique des différents flux azotés induits par les espèces de légumineuses dans différentes conditions environnementales peut être fastidieuse et coûteuse en moyens et en temps, surtout lorsqu'un grand nombre d'espèces sont comparées. Pour pallier à ces limites, un travail sur les caractéristiques de plantes déterminantes dans l'obtention des fonctions relatives à l'azote, a été initié dans les chapitres précédents. Les espèces peuvent en effet être décrites par leurs « traits », c'est-à-dire des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou phénologiques mesurables à l'échelle individuelle, de la cellule à l'organisme entier, sans référence à l'environnement ou tout autre niveau d'organisation (Violle et al., 2007). L'approche par les traits, longtemps utilisée en écologie, consiste à caractériser les espèces par des traits relatifs au fonctionnement des espèces et à leur

interaction avec l'environnement (Garnier and Navas, 2012; Violle et al., 2009). Les espèces peuvent donc être caractérisées et classées selon une combinaison d'attributs de traits similaires (valeurs prises pour chaque trait mesuré dans un environnement et à un temps donné), utilisés comme prédicteurs de fonctions de l'écosystème et des services écosystémiques qui en découlent. De plus en plus d'études en agronomie font appel à cette approche, notamment pour comparer un grand nombre d'espèces (Damour et al., 2014; Tardy et al., 2015; Tribouillois et al., 2015b). Cette approche n'a cependant jamais été utilisée pour caractériser et comparer une diversité d'espèces utilisées comme cultures de rente, telles que les légumineuses à graines pourtant à même de délivrer des services écosystémiques.

A partir d'une approche traits – fonctions (étudiées sous l'angle des flux d'azote utilisés comme indicateurs des fonctions) – services écosystémiques ou impacts négatifs, ce chapitre cherche à faire une synthèse autour de cinq flux azotés induits par les dix espèces de légumineuses au cours d'une succession culturale de deux ans légumineuse-blé. Ces flux azotés sont à l'origine de la production de biens agricoles (quantité d'azote exportée dans les graines de légumineuses), de services écosystémiques de fourniture d'azote aux légumineuses et au blé suivant (quantité d'azote des légumineuses issue de la fixation symbiotique, quantité d'azote prélevée par le blé suivant suite à la minéralisation de l'azote des résidus de légumineuses), de services écosystémiques de régulation de la qualité de l'eau vis-à-vis de l'azote en limitant les pertes d'azote par lixiviation pendant la culture des légumineuses (quantité d'azote minéral du sol prélevée par les légumineuses), ou encore d'impacts négatifs de pollution de l'eau par les nitrates après la culture des légumineuses (quantité d'azote minéral lixiviée après la récolte des légumineuses). Des différences notables pour chacun de ces flux ont été mises en évidence entre espèces de légumineuses et céréales (Annexe 9). Dans les chapitres précédents, pour analyser la variabilité existant au sein des espèces de légumineuses étudiées, un travail d'identification des traits de plantes ou propriétés du couvert de légumineuses (équivalent des traits mesurés à l'échelle du couvert) associés aux différents flux azotés a été réalisé. Dans le chapitre 1, nous avons identifié l'effet de la croissance aérienne de la plante sur la quantité d'azote symbiotique fixée ainsi que l'importance de la vitesse d'expansion latérale du système racinaire pour le prélèvement de l'azote minéral du sol. Dans les chapitres 2 et 3, différentes caractéristiques biochimiques des résidus aériens ont été identifiées comme explicatives des différences de minéralisation des résidus de culture, elles-mêmes positivement reliées aux quantités d'azote prélevées par le blé suivant. Dans ce chapitre, nous nous proposons de poursuivre ce travail en nous intéressant simultanément à cinq flux d'azote engendrés par les cultures de légumineuses et aux déterminants de ces flux, afin de caractériser la multifonctionnalité des espèces de légumineuses relative à l'azote.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Expérimentations mobilisées

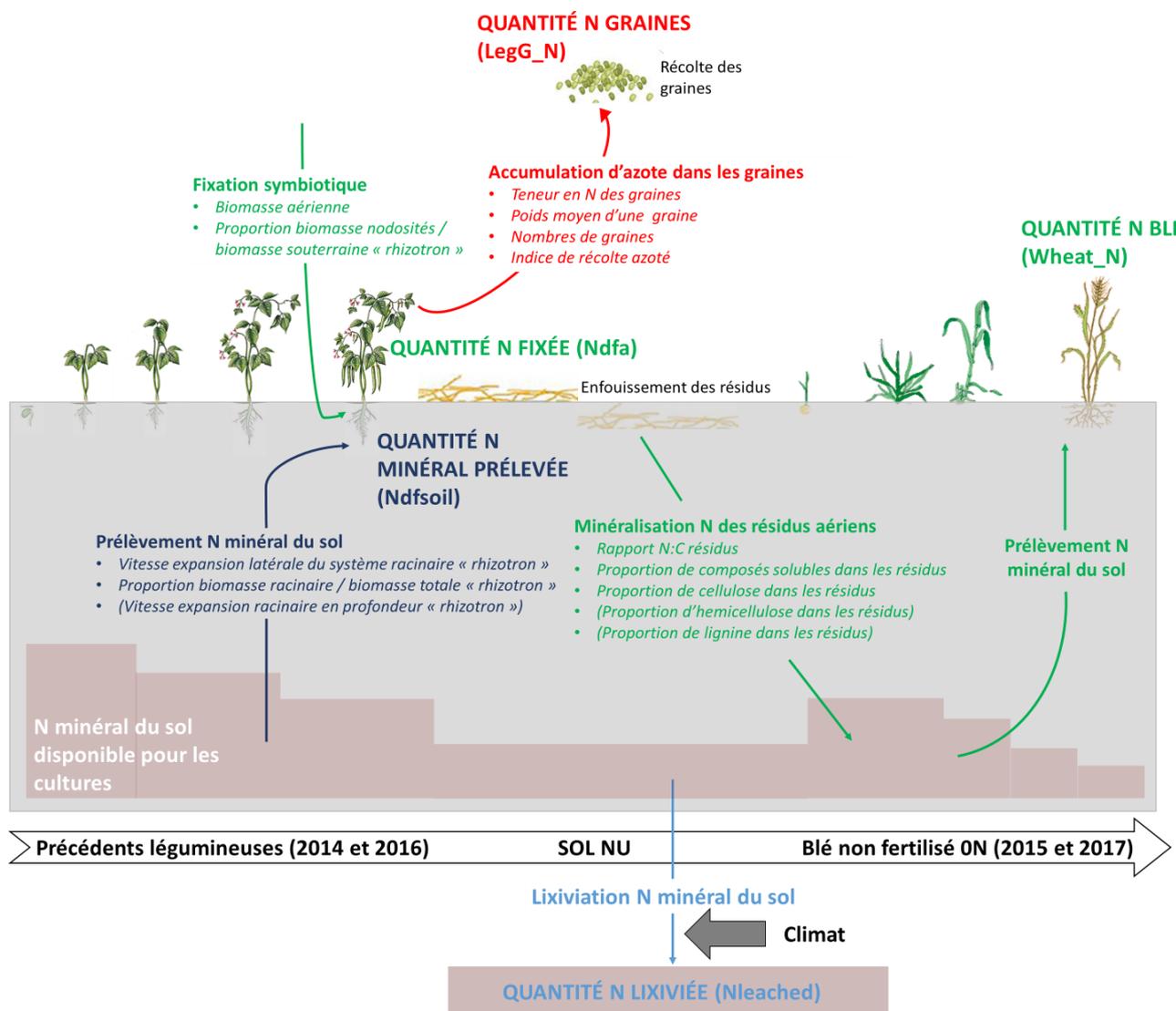
Les deux expérimentations de deux ans menées au champ et décrites dans le chapitre 3 ont été mobilisées pour quantifier les flux d'azote associés aux légumineuses et mesurer certains de leurs déterminants (traits de plantes ou propriétés du couvert). Pour rappel, neuf espèces de légumineuses ont été cultivées en 2014 et 2016 en l'absence de fertilisation azotée (féverole, haricot, lentille, lupin, pois, pois chiche, soja, vesce commune et vesce de Narbonne). En 2016, une dixième espèce, le fenugrec, a également été cultivée. Une fois les graines récoltées, les résidus de culture de légumineuses ont été broyés et enfouis dans le sol. Les graines n'ont cependant pas été récoltées pour la vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pour le pois chiche en 2014, du fait de conditions climatiques non favorables à la production de graines pour ces espèces. Ces situations seront considérées dans la suite de ce chapitre comme « engrais verts ». A l'automne, un blé d'hiver, conduit sans fertilisation azotée, a été semé à la suite de tous les précédents légumineuses. Le blé a ensuite été récolté en juillet de l'année suivante (2015 et 2017) (Fig.1).

L'essai en rhizotrons conduit en serre en 2016, décrit dans le chapitre 1, a également été mobilisé pour mesurer des traits de plantes associés aux flux d'azote. Pour rappel, les dix espèces de légumineuses (fenugrec, féverole, haricot, lentille, lupin, pois, pois chiche, soja, vesce commune et vesce de Narbonne) ont été cultivées pendant 27 jours en rhizotrons (RhizoTubes) pour observer plus aisément leur croissance racinaire. Seule la modalité non fertilisée en azote (-N) a été utilisée dans ce chapitre.

## 2.2. Flux azotés mobilisés

Afin d'évaluer les biens agricoles, les services écosystémiques et les impacts négatifs relatifs à l'azote associés aux cultures de légumineuses, différents flux azotés (utilisés comme indicateurs des fonctions) induits par les dix espèces légumineuses ont été quantifiés à l'issue des deux d'expérimentation au champ (Fig. 1, Tableau 1) :

- La quantité d'azote exportée par les graines (Legume Grain Nitrogen : LegG\_N), qui caractérise **la production de biens agricoles** via le processus d'accumulation d'azote dans les graines, a été mesurée à maturité des légumineuses et des céréales en 2014 et 2016 ;
- La quantité d'azote dans les parties aériennes des légumineuses, issue du processus de fixation symbiotique (Nitrogen derived from air : Ndfa), à l'origine du service de « **fourniture d'azote** » **aux légumineuses**. Ce flux a été mesuré à maturité des légumineuses en 2014 et 2016 ;
- La quantité totale d'azote dans les parties aériennes du blé non fertilisé (Wheat\_N) cultivé après les légumineuses rend compte du service de « **fourniture d'azote** » **au blé suivant**. Ce flux a été mesuré à maturité du blé en 2015 et 2017. La quantité d'azote dans le blé ne renseigne pas directement la quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus de légumineuses. Cependant, le blé n'étant pas fertilisé en azote, les différences entre les espèces de légumineuse en tant que précédent peuvent être révélées, car les différences de quantités d'azote dans le blé entre modalités proviennent en partie du processus de minéralisation de l'azote des résidus des précédents légumineuses ;
- La quantité d'azote minéral du sol prélevée par les légumineuses durant leur cycle (Nitrogen derived from soil : Ndfsoil) rend compte de la capacité des légumineuses à valoriser l'azote du sol. Cette quantité a été considérée comme un indicateur de la quantité d'azote minéral non lixiviée pendant leur culture, à l'origine du service de « **régulation de la qualité de l'eau vis-à-vis de l'azote** ». Ce flux a été mesuré à maturité des légumineuses en 2014 et 2016.
- La quantité d'azote lixiviée (Nleached) entre la récolte des précédents légumineuses et la récolte du blé l'année suivante caractérise l'impact négatif de « **pollution de l'eau par les nitrates** ». La quantité d'azote lixiviée a été estimée par modélisation avec le modèle STICS pour les dix précédents légumineuses et pour les deux expérimentations au champ.



**Fig. 1** Représentation des flux azotés à l'origine de la fourniture de services écosystémiques relatifs à l'azote au cours d'une succession culturale de deux ans légumineuse - blé.

Les **FLUX AZOTES (MAJUSCULE EN GRAS)** sont ici considérés comme des indicateurs des **fonctions** qui résultent de processus (**minuscule en gras**) ; le niveau du flux azoté varie selon les *traits de plantes ou propriétés du couvert (minuscule en italique)*. **En rouge** : flux azotés à l'origine de biens agricoles ; **en vert** : flux azotés à l'origine de services écosystémiques de fourniture d'azote aux plantes cultivées ; **en bleu foncé** : flux azotés à l'origine de services écosystémiques de régulation de la qualité de l'eau vis-à-vis de l'azote ; **en bleu clair** : flux azotés à l'origine d'impacts négatifs de pollution de l'eau par les nitrates.

« rhizotron » indique les traits qui ont été mesurés sur des plantes cultivées en rhizotrons. Les propriétés du couvert ont été mesurées en champs. Les traits de plantes ou propriétés du couvert entre parenthèses ont été mesurés mais n'ont pas été utilisés dans l'analyse.

### 2.3. Traits de plantes et propriétés du couvert associés aux flux d'azote

A l'issue des deux expérimentations au champ en 2014 et 2016 et de l'essai en rhizotron conduit en serre en 2016, plusieurs propriétés du couvert ou traits de plantes ont été mesurés pour les dix espèces de légumineuses. Ces propriétés du couvert ou traits de plantes étaient considérés comme déterminants dans l'obtention de flux azotés à l'origine de biens agricoles et de services écosystémiques.

Au champ, ces propriétés du couvert ont été mesurés sur des prélèvements aériens sur une surface de 1 m<sup>2</sup> effectués à maturité des légumineuses avec quatre répétitions par espèce. Pour l'expérimentation en rhizotron des images du système racinaire ont été prises au cours du temps. Vingt-sept jours après le semis, les plantes (quatre répétitions par espèce) ont été prélevées et les parties aériennes, les racines et les nodosités ont été séparées afin de déterminer les biomasses sèches de ces différents organes.

#### 2.3.1. Propriétés du couvert associées aux flux azotés à l'origine de la production de biens agricoles

Afin d'expliquer la quantité d'azote dans les graines de légumineuses à l'origine de la production de biens agricoles, des propriétés de couverts supposées comme déterminantes pour la production de graines riches en protéine, ont été mesurées (Fig. 1, Tableau 1). La quantité d'azote dans les graines de légumineuses varie selon l'accumulation **en carbone et en azote dans les graines** par la plante. L'accumulation en carbone dans les graines par la plante a été associée à priori à deux propriétés de couvert mesurées au champ, à savoir le nombre de graines récoltées par unité de surface (Number of seeds : S\_num) et le poids moyen d'une graine récoltée (mean Seed Weight : mSW). L'investissement en azote dans les graines par la plante par rapport aux parties végétatives (pailles) a été associé à priori à deux autres propriétés de couvert mesurées au champ. Il s'agit de la teneur en azote des graines (Seed Nitrogen Concentration : SNC) et de l'indice de récolte azoté (Nitrogen Harvest Index : NHI), défini comme le rapport entre la quantité d'azote des graines et la quantité d'azote totale des parties aériennes à la récolte.

**Tableau 1** Approche services écosystémiques – fonction – trait appliquée à la comparaison de dix espèces de légumineuses à graines.

Biens, services écosystémiques ou impacts négatifs	Flux azotés (indicateurs des fonctions)	Fonctions	Processus	Traits de plantes et propriétés du couvert
<b>Biens agricoles</b>				
Production de graines végétales riches en protéines	N dans les graines de légumineuses (LegG_N)	Produire des graines riches en azote	Accumulation d'azote dans les graines	<b>Nitrogen Harvest Index (NHI)</b> <i>Indice de récolte azoté</i> <b>Seed Nitrogen Concentration (SNC)</b> <i>Teneur en azote des graines</i> <b>mean Seed Weight (mSW)</b> <i>Poids moyen d'une graine</i> <b>number of Seeds (S_num)</b> <i>Nombre de graines</i>
<b>Services écosystémiques de fournitures d'azote aux plantes cultivées</b>				
Fourniture d'azote aux légumineuses	N des parties aériennes des légumineuses issu de la fixation symbiotique (Ndfa)	Apporter de l'azote biologique au système	Fixation symbiotique de N <sub>2</sub>	<b>shoot Dry Matter (DMs)</b> <i>Biomasse sèche aérienne</i> <b>belowground Nodule Mass Fraction (NMFb)</b> <i>Proportion de biomasse nodulaire sur biomasse souterraine</i>
Fourniture d'azote à la culture suivante	N des parties aériennes du blé suivant non fertilisé (Wheat_N)	Accroître le pool d'azote disponible pour la culture suivante	Minéralisation des résidus de légumineuses	<b>Residue Nitrogen Carbon ratio (Res_N:C)</b> <i>Rapport azote / carbone des résidus</i> <b>Residue Cellulose fraction (Res_CEL)</b> <i>Proportion de cellulose dans les résidus</i> <b>Residue Soluble Compounds fraction (Res_SC)</b> <i>Proportion de composés solubles dans les résidus</i>
<b>Services écosystémiques de régulation de la qualité de l'eau vis-a-vis de l'azote</b>				
Régulation des pertes d'azote par lixiviation pendant la culture de légumineuse	N des parties aériennes des légumineuses issu du prélèvement d'azote minéral du sol (Ndfsoil)	Conserver de l'azote dans le système sol-plante	Prélèvement d'azote minéral du sol	<b>root Lateral Expansion Rate (Ler)</b> <i>Vitesse d'expansion latérale du système racinaire</i> <b>Root Mass Fraction (RMF)</b> <i>Proportion de biomasse racinaire sur biomasse totale</i>
<b>Impacts négatifs de pollution de l'eau par les nitrates</b>				
Génération de pertes d'azote par lixiviation après la culture de légumineuse	N lixivié après la récolte des légumineuses (NLeached)	Perdre de l'azote en dehors du système agricole	Lixiviation de l'azote minéral du sol	<b>Residue Nitrogen Carbon ratio (Res_N:C)</b> <b>Residue Cellulose fraction (Res_CEL)</b> <b>Residue Soluble Compounds fraction (Res_SC)</b> <b>root Lateral Expansion Rate (Ler)</b> <b>Root Mass Fraction (RMF)</b>

2.3.2. *Traits de plantes et propriétés du couvert associées aux flux azotés à l'origine de services écosystémiques de fourniture d'azote aux cultures*

Dans le chapitre 1, **la demande en azote** a été identifiée comme déterminante pour la quantité d'azote fixée. Ainsi, la biomasse sèche aérienne (shoot Dry Matter : DMs) a été mesurée au champ à maturité afin de caractériser la demande du couvert (Fig. 1, Tableau 1). Un trait de plante supplémentaire, non étudié dans les chapitres précédents et mesuré sur les plantes cultivées en rhizotrons, a été sélectionné pour expliquer les quantités d'azote fixées. Il s'agit du rapport biomasse nodulaire sur la biomasse souterraine totale (racines + nodosités) (belowground Nodule Mass Fraction : NMFb) qui renseigne sur le **compromis de répartition de biomasse entre les deux organes d'acquisition de l'azote** chez les légumineuses : les racines (organe de prélèvement de l'azote minéral du sol) et les nodosités (organes de la fixation symbiotique). Pour le trait NMFb une valeur moyenne des quatre répétitions a été attribuée à chacune des espèces de légumineuses.

Dans les chapitres 2 et 3, des **propriétés biochimiques des résidus aériens** ont été identifiées comme explicatives des différences de minéralisation des résidus de culture. La minéralisation de l'azote des résidus a également pu être identifiée comme déterminante pour comprendre les quantités d'azote dans le blé suivant à maturité. Trois propriétés biochimiques des résidus aériens ont été retenues comme les plus explicatives des différences de minéralisation des résidus aériens et donc des quantités d'azote dans le blé suivant (Fig. 1, Tableau 1) : le rapport azote/carbone (Residue Nitrogen Carbon ratio : Res\_N:C), la proportion de composés solubles (Residue soluble compounds fraction : Res\_SC) et la proportion de cellulose (Residue cellulose fraction : Res\_CEL). Pour chacune des deux expérimentations au champ, les proportions de composés solubles et de cellulose correspondent à une valeur moyenne des quatre répétitions par espèce.

Les proportions d'hémicellulose et de cellulose dans les résidus aériens de légumineuses n'ont pas été retenues car celles-ci étaient très peu variables entre les espèces de légumineuses et donc beaucoup moins explicatives des différences entre espèces de minéralisation de l'azote des résidus aériens par rapport aux trois propriétés biochimiques retenues (voir chapitre 2). D'autre part, d'après les résultats du chapitre 2, les racines représentaient une très faible proportion de l'azote total des résidus et engendrent donc de très faibles quantités d'azote potentiellement minéralisées. Pour cette raison les racines n'ont pas été considérées dans ce chapitre.

2.3.3. *Traits de plantes associés aux flux azotés à l'origine de services écosystémiques de régulation de la qualité de l'eau vis-à-vis de l'azote*

Dans le chapitre 1, les traits racinaires caractérisant la **capacité du système racinaire à explorer le volume de sol** ont été identifiés comme déterminants dans le prélèvement d'azote minéral. La capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol par les cultures de légumineuses limite les

potentielles pertes par lixiviation pendant la culture de légumineuses et contribuent ainsi au service de régulation de la qualité de l'eau vis-à-vis de l'azote. La vitesse d'expansion latérale du système racinaire (root Lateral expansion rate : Ler), indiquant la capacité d'exploration du sol horizontalement, a été identifiée comme particulièrement explicative des différences de prélèvement de l'azote minéral du sol entre les espèces de légumineuses (Fig. 1, Tableau 1). Au contraire, la vitesse d'expansion du système racinaire en profondeur n'a pas été retenue, car ce trait était beaucoup moins discriminant entre les espèces de légumineuses et n'a pas permis d'expliquer les différences de prélèvement d'azote minéral du sol entre espèces. Un trait supplémentaire mesuré en rhizotron a par contre été ajouté. Il s'agit du rapport biomasse racinaire sur biomasse totale (Root Mass Fraction : RMF) qui renseigne sur l'**investissement de la biomasse dans les racines**. Pour les deux traits racinaires considérés (RMF et Ler) une valeur moyenne des quatre répétitions a été attribuée à chacune des espèces de légumineuses.

La quantité d'azote lixiviée après la récolte des légumineuses a été montrée comme très dépendante des conditions climatiques (précipitations qui entraînent l'azote minéral non utilisé vers les aquifères) et du positionnement du cycle des légumineuses dans l'année (espèces de printemps vs espèces d'été). La date de récolte des légumineuses marque le début de la période de sol nu pendant laquelle aucune plante ne prélève l'azote minéral disponible avant que la culture suivante ne puisse le valoriser. Ainsi, les différentes dates de récolte entre espèces de légumineuses modulent la durée de cette période. Par ailleurs, la quantité d'azote minéral disponible après la récolte des légumineuses et sujette à la lixiviation varie selon le reliquat azoté après la récolte des légumineuses (potentiellement modulé par la capacité des légumineuses à prélever l'azote minéral du sol pendant leur cycle) et selon la minéralisation de l'azote des résidus de légumineuses. Ainsi au-delà des conditions climatiques et du positionnement du cycle des légumineuses dans l'année, les traits de plantes et propriétés du couvert identifiés ci-dessus comme déterminants dans le prélèvement d'azote minéral et dans la minéralisation des résidus de culture sont également considérés déterminants pour les quantités d'azote lixiviées après la récolte des légumineuses (Fig. 1, Tableau 1).

#### 2.4. Calcul de la multifonctionnalité

A partir des cinq flux azotés étudiés (LegG\_N, Ndfa, Wheat\_N, Ndfsoil, NLeached), la méthode des seuils multiples proposée par Byrnes et al. (2014) a été appliquée afin d'évaluer la multifonctionnalité des différentes espèces de légumineuses. Il s'agit d'attribuer une note unique aux différentes espèces de légumineuses pour rendre compte de leur capacité à engendrer de grandes quantités d'azote pour les cinq flux azotés considérés.

Dans le cas du flux azoté Nleached, une grande valeur d'azote perdue par lixiviation indique un fort niveau d'impact négatif. Les données de Nleached ont donc été transformées afin d'appréhender ce flux azoté dans le sens de la minimisation de l'impact négatif de pollution de l'eau par les nitrates, en

suivant la méthode proposée par Byrnes et al. (2014). Pour y parvenir la quantité d'azote lixiviée maximale entre la récolte des dix espèces de légumineuses et la récolte du blé suivant a été déterminée pour chacune des deux expérimentations au champ (expérimentation 2014-2015 : 123 kg N ha<sup>-1</sup> pour le précédent cultural vesce commune, expérimentation 2016-2017 : 49 kg N ha<sup>-1</sup> pour le précédent cultural vesce commune). Par la suite, pour les deux expérimentations au champ, la différence entre la quantité d'azote lixiviée après chacun des précédent légumineuses et la quantité d'azote lixiviée maximale a été calculée telle qu'indiqué par l'équation 1 :

$$Nleached_{tr\ i,x} = -1 \times Nleached\ i,x + \max(Nleached\ x) \quad (1)$$

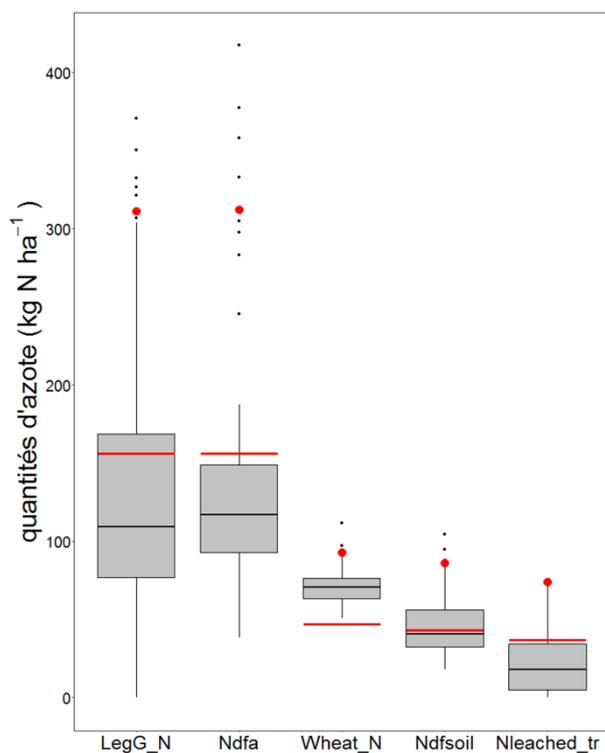
avec  $Nleached\ i,x$  la quantité d'azote lixiviée entre la récolte de la légumineuse  $i$  et la récolte du blé suivant au cours de l'expérimentation  $x$ , et  $\max(Nleached\ x)$  la quantité d'azote maximale lixiviée parmi l'ensemble des précédents légumineuses de la même expérimentation  $x$ .

Les valeurs de quantités d'azote lixiviées transformées ( $Nleached_{tr\ i,x}$ ) renseignent sur les quantités d'azote lixiviées en moins entre la récolte des légumineuses et la récolte du blé suivant par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées. En prenant l'exemple du précédent féverole de l'expérimentation 2014-2015 au champ, 103 kg N ha<sup>-1</sup> ont été estimés comme lixiviés par le modèle STICS entre la récolte de la féverole et la récolte du blé suivant. Ainsi, la valeur de quantité d'azote lixiviée transformée est égale à 20 kg N ha<sup>-1</sup> ( $-1 \times 103 + 123$ ) et indique qu'après la féverole 20 kg N ha<sup>-1</sup> d'azote ont été lixiviés en moins par rapport à la modalité qui a engendré le plus de lixiviation d'azote au cours de la même expérimentation au champ (soit la vesce commune dans notre exemple).

Afin de déterminer un **index de multifonctionnalité basé sur des dépassements de seuils**, le niveau maximal de chacun des flux azotés a été calculé (Fig. 2). Pour chacun **des flux azotés**, il s'agit de la valeur moyenne des 9 valeurs les plus élevées parmi l'ensemble des 76 valeurs provenant des mesures sur les dix espèces légumineuses, avec quatre répétitions par espèce dans les deux expérimentations au champ (sauf le fenugrec qui n'a été cultivé que dans la deuxième expérimentation au champ).

Différents seuils définis comme des pourcentages du niveau maximal des flux azotés, peuvent être alors être considérés. Pour un seuil donné, une valeur de 1 est attribuée à chacun des flux azotés ayant une valeur supérieure au seuil considéré. Dans le cas contraire une valeur de 0 est attribuée. L'index de multifonctionnalité correspond à la somme des flux azotés ayant une valeur supérieure au seuil considéré. Par exemple, une modalité (c.à.d. une espèce de légumineuse, une répétition et une expérimentation au champ) recevra un score de 5 pour un seuil de 50% si la valeur des flux azotés est supérieure à 50 % de la valeur maximale calculée pour chaque flux : c'est à dire, si la quantité d'azote dans les graines (LegG\_N) est supérieure à 156 kg N ha<sup>-1</sup>, la quantité d'azote issue de la fixation symbiotique (Ndfa) est supérieure à 156 kg N ha<sup>-1</sup>, la quantité d'azote du blé suivant (Wheat\_N) est

supérieure à  $47 \text{ kg N ha}^{-1}$ , la quantité d'azote minéral du sol prélevée par la légumineuse (Ndfsoil) est supérieure à  $43 \text{ kg N ha}^{-1}$  et la quantité d'azote lixiviée en moins après la récolte des légumineuses par rapport à la modalité avec la plus grande quantité d'azote lixiviée (Nleached\_tr) est supérieure à  $34 \text{ kg N ha}^{-1}$  (Fig. 2). Un index moyen par espèce de légumineuse (moyenne des quatre répétitions et des deux expérimentations au champ) a été calculé pour les seuils allant de 1 à 100 %.



**Fig. 2** Box plot des différents flux azotés mesurés sur les dix espèces de légumineuses au cours des deux expérimentations au champ de deux ans. Les points rouges indiquent la valeur maximale retenue pour chacun des flux azotés (moyenne des 9 valeurs les plus élevées). Les barres rouges indiquent les quantités d'azote pour l'exemple du seuil 50% de l'index de multifonctionnalité. N dans les graines de légumineuses (LegG\_N) ; N dans les parties aériennes des légumineuses issu de la fixation symbiotique (Ndfa) ; N dans les parties aériennes du blé suivant (Wheat\_N) ; N des parties aériennes des légumineuses issu du prélèvement d'azote minéral du sol (Ndfsoil) ; N lixivié en moins après la récolte des légumineuses par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées (Nleached\_tr).

## 2.5. Calcul du solde azoté apparent

Le solde azoté apparent renseigne sur la modification du stock azoté du sol après une culture de légumineuse. Il a été calculé comme la différence entre la quantité d'azote biologique ( $N_2$ ) fixée dans les parties aériennes via le processus de fixation symbiotique (Ndfa) et la quantité d'azote exportée par les graines de légumineuses (LegG\_N). Un solde apparent positif traduit une entrée d'azote issu de la fixation symbiotique dans le système de culture. Le solde azoté apparent a été calculé pour les années 2014 et 2016.

## 2.6. Analyses statistiques

Afin d'identifier les relations positives ou négatives entre les traits de plantes, une analyse des données par corrélations linéaires basées sur le coefficient de Pearson a été réalisée à l'aide du logiciel R version 3.4.2. (R Core Team, 2016) à partir des packages *corplot* et *hmisc*.

Une analyse de Redondance (RDA) a été réalisée afin d'évaluer les synergies et les antagonismes entre flux azotés et déterminer les traits de plantes et propriétés du couvert les plus explicatifs de ces flux azotés. Dans cette analyse les flux azotés ont été utilisés comme variables de réponse tandis que les traits de plantes et propriétés du couvert ont été utilisés comme variables explicatives. Le solde azoté apparent a été ajouté comme variable supplémentaire. La RDA a été couplée avec des tests de permutation de Monte Carlo (999 permutations) afin d'expliquer la variabilité des flux azotés par les traits de plantes et les propriétés du couvert. La RDA a été réalisée à l'aide du logiciel Canoco 5.10 (ter Braak and Šmilauer, 2012) et l'ensemble des flux azotés, traits de plantes et propriétés du couvert ont préalablement été centrés réduits.

## 3. Résultats

### 3.1. Caractérisation et corrélations entre les traits de plantes et propriétés du couvert

Les dix espèces légumineuses présentent une relativement grande variabilité de valeurs pour l'ensemble des traits ou propriétés mesurés au champ et en rhizotrons (Tableau 2). Les valeurs moyennes sont cependant assez proches pour les propriétés mesurées au champ en 2014 et 2016.

Par la suite, une analyse par corrélations linéaires entre les traits ou propriétés a été réalisée afin de déterminer les relations entre ces variables (Fig. 3). Il existe des relations positives entre NHI, SNC, SW, DMs et Res\_CEL tandis que l'ensemble de ces propriétés sont négativement corrélées à Res\_N:C et Res\_SC (Fig. 3). Ainsi les plantes avec de grandes biomasses aériennes à maturité (grandes DMs) ont tendance à exporter une plus grande proportion de leur azote dans les graines (grand NHI) et à avoir des graines de grande taille (grandes valeurs de mSW) riches en azote (grandes valeurs de SNC). Au contraire, les résidus de ces plantes ont de faibles rapports azote / carbone (faible Res\_N:C), de faibles proportions de composés solubles, mais des proportions de cellulose élevées (grande Res\_CEL). Par ailleurs, NMFb et Ler ont tendance à être positivement corrélés entre eux, tandis que NMFb est négativement corrélé à RMF. Ainsi, des plantes avec une grande biomasse de nodosités par rapport à la biomasse souterraine totale (NMFb) ont tendance à avoir une faible biomasse racinaire par rapport à la biomasse totale (RMF).

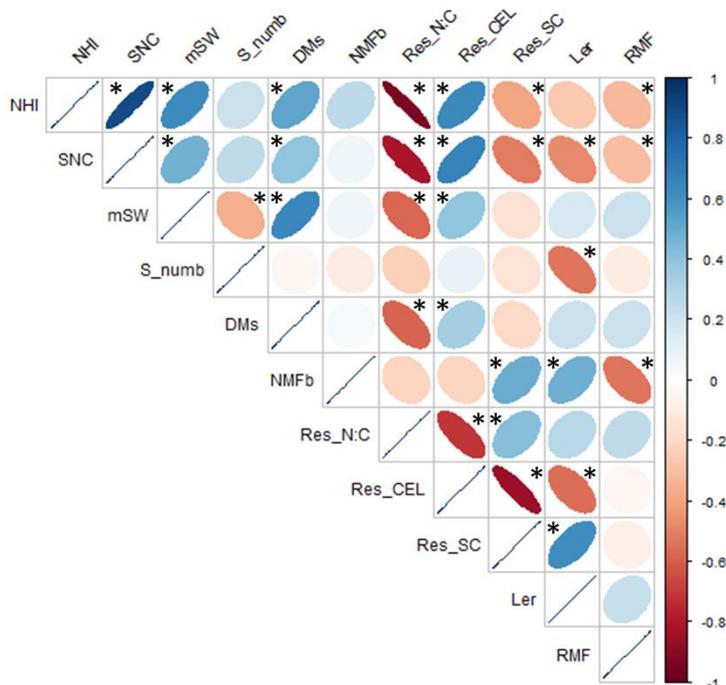
**Tableau 2** Valeurs des traits de plantes et des propriétés du couvert, mesurés au cours des expérimentations au champ et en rhizotrons.

Mesures au champ	Unité	2014			2016		
		Moyenne	Min	Max	Moyenne	Min	Max
NHI	kg N kg N <sup>-1</sup>	0.60	0.00	0.93	0.62	0.00	0.92
SNC	g N 100 g <sup>-1</sup>	3.7	0.0	7.1	4.0	0.0	6.8
mSW	g graine <sup>-1</sup>	0.153	0.000	0.408	0.136	0.000	0.388
S_num	graines m <sup>-2</sup>	2 138	0	12 507	2 406	0	10 461
DMs	g m <sup>-2</sup>	643	172	1068	659	245	1441
Res_N:C	g g <sup>-1</sup>	0.033	0.011	0.083	0.035	0.014	0.075
Res_CEL	g g <sup>-1</sup>	0.31	0.23	0.43	0.34	0.21	0.49
Res_SC	g g <sup>-1</sup>	0.44	0.32	0.53	0.38	0.25	0.52

Mesures en Rhizotrons				
Ler	mm day <sup>-1</sup>	0.97	0.32	1.50
RMF	g g <sup>-1</sup>	0.25	0.17	0.35
NMFb	g g <sup>-1</sup>	0.22	0.14	0.63

Les abréviations des traits de plantes et des propriétés du couvert sont spécifiées dans le Tableau 1.



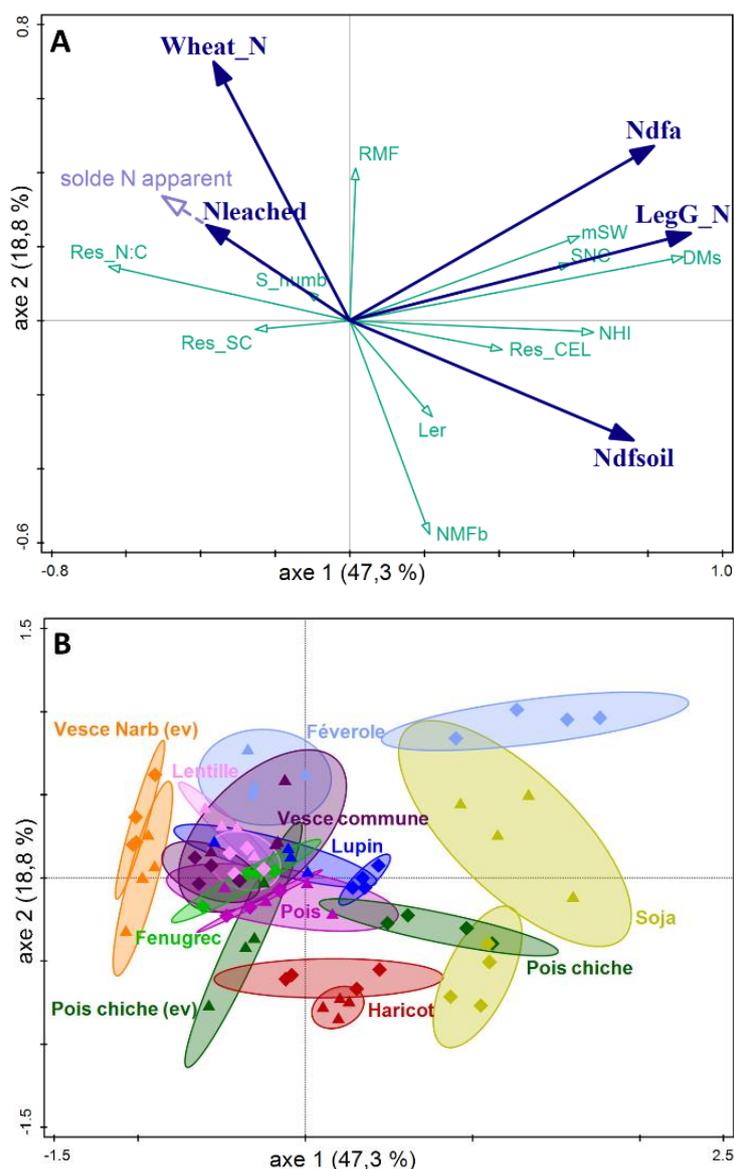
**Fig. 3** Matrice de corrélation entre les traits de plantes et propriétés du couvert. La largeur des ellipses renseigne sur les valeurs des coefficients de corrélation de Pearson (faible largeur : coefficient de corrélation proche de 1, grande largeur : coefficient de corrélation proche de 0). Les corrélations positives sont en bleu tandis que les corrélations négatives sont en rouge. La significativité des corrélations est indiquée par \* ( $p < 0.01$ ). Indice de récolte azoté (NHI) ; Teneur en azote des graines (SNC) ; Poids moyen d'une graine (mSW) ; Nombre de graines (S\_num) ; Biomasse sèche aérienne (DMs) ; Proportion de biomasse nodulaire sur biomasse souterraine (NMFb) ; Rapport azote / carbone des résidus (Res\_N:C) ; Proportion de cellulose dans les résidus (Res\_CEL) ; Proportion de composés solubles dans les résidus (Res\_SC) ; Vitesse d'expansion latérale du système racinaire (Ler) ; Proportion de biomasse racinaire sur biomasse totale (RMF).

## 3.2. Synergies et antagonismes entre les flux azotés et étude des traits explicatifs

L'analyse de Redondance indique que les traits et propriétés expliquent 76.1 % de variabilité totale des flux azotés (Tableau 3). La Figure 4 indique que sur les deux premiers axes, les traits et propriétés expliquent 66.1 % de la variabilité totale (respectivement, 47.3 et 18.8 % pour les axes 1 et 2).

Une grande part de la variabilité est expliquée par la biomasse aérienne (DMs : 38.4 %, p-value < 0.001) tandis que la proportion de biomasse nodulaire sur biomasse souterraine (NMFb), la teneur en azote des graines (SNC), la proportion de composés solubles dans les résidus (Res\_SC) et le rapport azote / carbone des résidus (Res\_N:C) expliquent chacun entre 6 et 11 % de la variabilité (Tableau 3). Le reste des traits et propriétés expliquent chacun moins de 5 % de la variabilité et seule la vitesse d'expansion latérale du système racinaire (Ler), l'indice de récolte azoté (NHI), et la proportion de biomasse racinaire sur biomasse totale (RMF) expliquent significativement la variabilité des flux azotés.

Les résultats de la RDA mettent en avant une forte corrélation positive entre la quantité d'azote dans les graines de légumineuses (LegG\_N) et la quantité d'azote des parties aériennes des légumineuses issue de la fixation symbiotique (Ndfa) avec l'axe 1 (0.90 et 0.82, respectivement) et dans une moindre mesure avec l'axe 2 (0.28 et 0.45, respectivement) (Fig. 4A). Les flux LegG\_N et Ndfa sont aussi positivement corrélés avec la biomasse aérienne (DMs), la teneur en azote des graines (SNC), le poids moyen d'une graine (mSW) et l'indice de récolte azoté (NHI). Par ailleurs, la quantité d'azote des parties aériennes des légumineuses issue du prélèvement d'azote minéral du sol (Ndfsoil) est positivement corrélée avec l'axe 1 (0.72) et dans une moindre mesure négativement corrélée avec l'axe 2 (-0.24). Le flux Ndfsoil est également positivement corrélé avec la proportion de biomasse nodulaire sur la biomasse souterraine (NMfb) et en moindre mesure avec la vitesse d'expansion latérale du système racinaire (Ler). Il existe cependant une corrélation négative entre, d'une part le flux Ndfsoil, et d'autre part la quantité d'azote des parties aériennes du blé suivant (Wheat\_N) et la quantité d'azote lixiviée après la récolte des légumineuses (Nleached). Ces deux derniers flux azotés sont positivement corrélés avec le rapport azote / carbone des résidus (Res\_N:C).



**Fig. 4 (A)** Biplot de l'analyse de redondance (RDA) afin d'identifier les relations entre les flux azotés (variables de réponse : flèches épaisses bleu foncé) et les traits de plantes et propriétés du couvert (variables explicatives : flèches fines bleu clair). Le solde azoté apparent correspond à une variable supplémentaire (flèche violette en pointillée). Indice de récolte azoté (NHI) ; Teneur en azote des graines (SNC) ; Poids moyen d'une graine (mSW) ; Nombre de graines (S\_num) ; Biomasse sèche aérienne (DMs) ; Proportion de biomasse nodulaire sur biomasse souterraine (NMFb) ; Rapport azote / carbone des résidus (Res\_N:C) ; Proportion de cellulose dans les résidus (Res\_CEL) ; Proportion de composés solubles dans les résidus (Res\_SC) ; Vitesse d'expansion latérale du système racinaire (Ler) ; Proportion de biomasse racinaire sur biomasse totale (RMF). N dans les graines de légumineuses (LegG\_N) ; N des parties aériennes des légumineuses issu de la fixation symbiotique (Ndfa) ; N des parties aériennes du blé suivant (Wheat\_N) ; N des parties aériennes des légumineuses issu du prélèvement d'azote minéral du sol (Ndfsoil) ; N lixivié après la récolte des légumineuses (Nleached). **(B)** Projection des individus sur la RDA. Les ellipses représentent les intervalles de confiance à 95 % pour chacune des espèces et chaque année de culture des légumineuses : 2014 (▲) ; 2016 (◆). Les espèces pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines sont indiquées par (ev : engrais vert) : vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pois chiche en 2014.

**Tableau 3** Synthèse des résultats de l'analyse de Redondance (RDA) indiquant la part de variabilité des flux azotés expliquée par les différents traits de plantes et propriétés du couvert et les valeurs de p-values associées selon le test de Monte Carlo.

Traits	% variation expliquée	p-value
DMs	38.4	0.001
NMFb	8.4	0.001
SNC	8.3	0.001
Res_SC	6.9	0.001
Res_N:C	6.3	0.001
Ler	3.1	0.001
NHI	2.2	0.003
RMF	1.0	0.049
Res_CEL	0.6	0.209
mSW	0.5	0.232
S_num	0.4	0.344

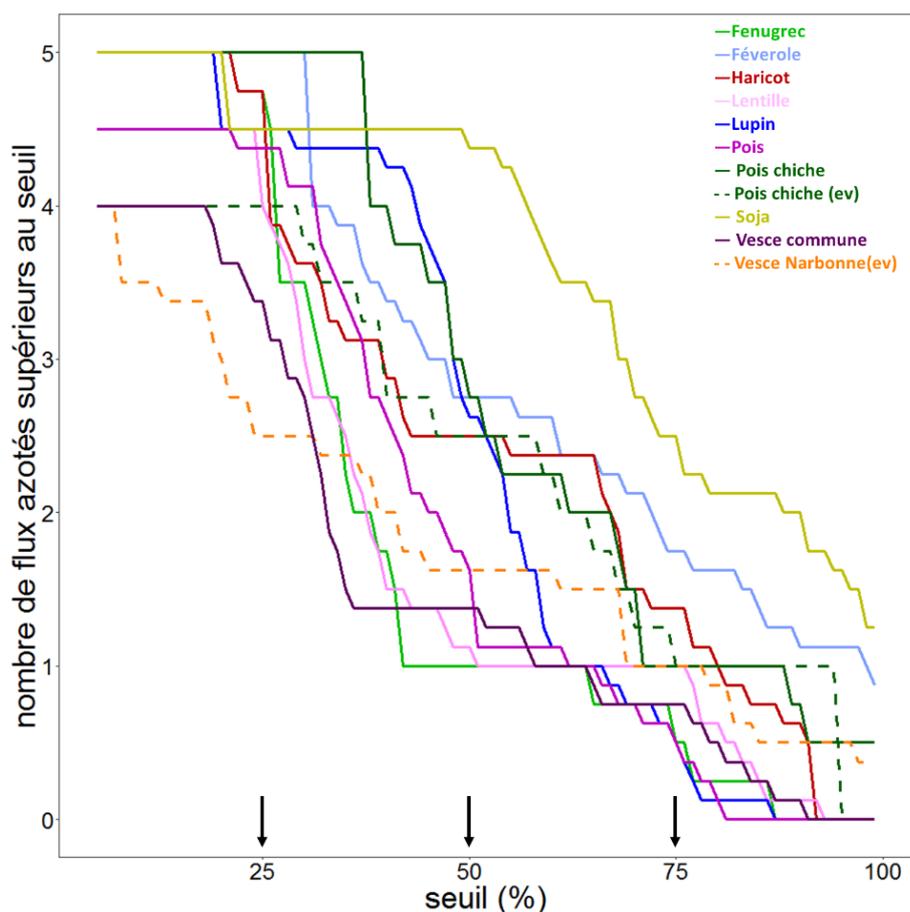
Les abréviations des traits de plantes et propriétés du couvert sont spécifiées dans le Tableau 1

### 3.3. Multifonctionnalité des espèces

La projection des individus sur le plan factoriel de la RDA (axes 1 et 2) permet de caractériser les dix espèces de légumineuses selon leurs traits ou propriétés et les flux azotés qu'elles induisent (Fig. 4B). La **féverole** est caractérisée par une forte quantité d'azote exportée par les graines (LegG\_N) et une grande quantité d'azote fixée (Ndfa) notamment en 2016 du fait d'une grande biomasse aérienne (DMs) et d'un grand indice de récolte azoté (NHI) (Fig. 4B). Cette espèce a aussi tendance à engendrer de grandes quantités d'azote dans le blé suivant. Par contre, de relativement grandes quantités d'azote sont perdues par lixiviation après la récolte de la féverole notamment en 2014 (Nleached). Le **haricot**, le **pois chiche** (avec production de graines) et le **soja** sont caractérisés par de fortes capacités à prélever l'azote minéral du sol pendant leur cycle (Ndfsoil). Ces trois espèces sont notamment caractérisées par une grande vitesse d'expansion latérale du système racinaire (Ler). Le haricot est également caractérisé par une forte biomasse nodulaire par rapport à biomasse souterraine totale (NMFb). De grandes quantités d'azote sont également fixées (Ndfa) et exportées dans les graines (LegG\_N) par le soja, notamment en 2014. De plus, après la culture de ces trois espèces de légumineuses peu d'azote est perdu par lixiviation. Par contre, le haricot, le pois chiche et le soja ont tendance à engendrer de relativement faibles quantités d'azote dans le blé suivant (Wheat\_N). Le **vesce de Narbonne** engendre des quantités d'azote exportées dans les graines (LegG\_N) nulles et de faibles quantités d'azote fixées (Ndfa) ainsi que de faibles quantités d'azote minéral prélevées pendant son cycle (Ndfsoil). De grandes quantités d'azote sont perdues par lixiviation après la culture de la vesce de Narbonne (Nleached). Par contre, cette espèce engendre de grandes quantités d'azote dans le blé suivant, du fait notamment d'un faible rapport azote / carbone des résidus (Res\_N:C). Le **fenu grec**, la **lentille**, le **lupin**, le **pois** et la

**vesce commune** se caractérisent par une situation intermédiaire avec des valeurs moyennes pour l'ensemble des cinq flux azotés.

L'étude de la capacité des espèces de légumineuses à fournir simultanément plusieurs biens agricoles et services écosystémiques tout en minimisant les impacts négatifs via les flux azotés qu'elles engendrent a été complétée à partir du calcul d'un index de multifonctionnalité. Pour des faibles niveaux de seuil (25 %) l'ensemble des espèces ont un index de multifonctionnalité supérieur à 3 c'est-à-dire qu'au moins 3 flux azotés sont supérieurs à 25 % du maximum mesuré pour chacun des flux azotés (Fig. 5, Tableau 4).



**Fig. 5** Index de multifonctionnalité (moyenne du nombre de flux azotés supérieurs au seuil) en fonction du seuil. Les flèches indiquent les seuils (25, 50 et 75 %) plus finement étudiés dans le Tableau 4. Les espèces pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines sont indiquées par (ev : engrais vert) : vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pois chiche en 2014. L'index de multifonctionnalité a été calculé pour le pois chiche sans production de graines en 2014 et pour le pois chiche avec production de graines en 2016.

Au seuil 25 %, la vesce de Narbonne, et la vesce commune présentent les plus faibles index de multifonctionnalité, du fait de l'absence de production de graines ou de faibles quantités d'azote dans les graines et de quantités d'azote fixées inférieures à 78 kg N ha<sup>-1</sup> pour la Vesce de Narbonne (Tableau

4). Le pois et la lentille présentent un index légèrement plus grand associé à une quantité d'azote dans les graines quasiment systématiquement supérieure à  $78 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Par contre, dans la totalité ou la moitié des situations, ces espèces engendrent de grandes quantités d'azote perdues par lixiviation après leur récolte (moins de  $17 \text{ kg N ha}^{-1}$  sont lixiviés en moins par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées). Le lupin, le soja, le fenugrec, le haricot, la féverole et le pois chiche en 2016 (avec production de graines) ont un index de multifonctionnalité proche de 5 pour le seuil 25 %. Parmi ces six espèces, seul le fenugrec présente une quantité d'azote dans les graines inférieure à  $78 \text{ kg N ha}^{-1}$  dans un quart des situations étudiées. Par ailleurs, dans un quart des situations étudiées le haricot fixe des quantités d'azote inférieures à  $78 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Par ailleurs, le lupin et le soja présentent dans la moitié des situations des quantités d'azote lixiviées en moins par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées inférieures à  $17 \text{ kg N ha}^{-1}$  (seuil 25 %).

Pour toutes les espèces de légumineuses, l'index de multifonctionnalité décroît lorsque le seuil augmente (Fig. 5). Les plus faibles index de multifonctionnalité sont mesurés pour la vesce de Narbonne, la vesce commune, le pois chiche en 2014 (engrais vert), le pois, la lentille et le fenugrec. L'ensemble de ces espèces ont des quantités d'azote dans les graines inférieures à  $156 \text{ kg N ha}^{-1}$  et fixent moins de  $156 \text{ kg N ha}^{-1}$  (Tableau 4, seuil 50 %). Cependant, la vesce de Narbonne et la lentille engendrent une quantité d'azote dans le blé suivant supérieure à  $70 \text{ kg N ha}^{-1}$  (seuil 75 %), tandis qu'après la culture du pois chiche en 2014 (engrais vert) plus de  $56 \text{ kg N ha}^{-1}$  ne sont pas lixiviés par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées (seuil 75 %). Au contraire, le soja, la féverole et le haricot maintiennent de plus grands index de multifonctionnalité lorsque le seuil augmente (Fig. 5). Cependant les flux azotés dépassant le seuil ne sont pas les mêmes entre ces trois espèces (Tableau 4). Dans la moitié des situations, la féverole et le soja présentent des quantités d'azote dans les graines supérieures à  $233 \text{ kg N ha}^{-1}$  et fixent plus de  $234 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Dans la majorité des situations, la féverole engendre également de grandes quantités d'azote dans le blé suivant ( $> 70 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) contrairement au soja et au haricot. Par contre, dans la grande majorité des situations le soja et le haricot limitent les pertes par lixiviation pendant leur cycle, du fait de quantités d'azote minéral prélevées pendant leur cycle souvent supérieures à  $65 \text{ kg N ha}^{-1}$ , mais également après leur récolte avec plus de  $56 \text{ kg N ha}^{-1}$  lixiviés en moins après leur récolte par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées dans la moitié des situations. Le lupin présente une situation intermédiaire avec de grands index de multifonctionnalité pour les seuils inférieurs à 50 % et une rapide diminution de l'index lorsque le seuil dépasse 50 %.

**Tableau 4** Evaluation de la multifonctionnalité basée sur cinq flux azotés : N dans les graines de légumineuses (LegG\_N) ; N des parties aériennes des légumineuses issu de la fixation symbiotique (Ndfa) ; N des parties aériennes du blé suivant (Wheat\_N) ; N des parties aériennes des légumineuses issu du prélèvement d'azote minéral du sol (Ndfsoil) ; N lixivié en moins après la récolte des légumineuses par rapport à la modalité avec les plus grandes quantités d'azote lixiviées (Nleached\_tr). Le niveau maximal pour chacun de ces flux azotés est donné (moyenne des 9 valeurs les plus élevées parmi l'ensemble des modalités) ainsi que les valeurs pour trois différents seuils (25, 50 et 75 %). Pour les cinq flux azotés, la moyenne des notes de dépassement de seuil est renseignée pour chacune des espèces de légumineuses.

**SEUIL 25 %**

Flux azotés (kg N ha <sup>-1</sup> )	Quantités N maximales	Quantités N pour le seuil 25 %	Vn (ev)	Vc	Pc (ev)	Le	Po	Lu	So	Fen	Ha	Fev	Pc
LegG_N	311	78	0	0.37	0	1	0.87	1	1	0.75	1	1	1
Ndfa	312	78	0.13	1	1	1	1	1	1	1	0.75	1	1
Wheat_N	93	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ndfsoil	86	22	0.87	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Nleached_tr	68	17	0.5	0.0	1	0	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1
<b>Index de multifonctionnalité</b>			<b>3</b>	<b>3.37</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4.37</b>	<b>4.5</b>	<b>4.5</b>	<b>4.75</b>	<b>4.75</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

**SEUIL 50 %**

Flux azotés (kg N ha <sup>-1</sup> )	Quantités N maximales	Quantités N pour le seuil 50 %	Vn (ev)	Vc	Pc (ev)	Le	Po	Lu	So	Fen	Ha	Fev	Pc
LegG_N	311	156	0	0	0	0	0	0.87	1	0	0	0.5	0.75
Ndfa	312	156	0	0	0	0	0	0.63	1	0	0	0.5	0
Wheat_N	93	47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ndfsoil	86	43	0.13	0.37	0.5	0.13	0.13	0.13	1	0	1	0.75	1
Nleached_tr	68	34	0.5	0	1	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0
<b>Index de multifonctionnalité</b>			<b>1.63</b>	<b>1.37</b>	<b>2.5</b>	<b>1.13</b>	<b>1.63</b>	<b>2.63</b>	<b>4.4</b>	<b>1</b>	<b>2.5</b>	<b>2.75</b>	<b>2.75</b>

**SEUIL 75 %**

Flux azotés (kg N ha <sup>-1</sup> )	Quantités N maximales	Quantités N pour le seuil 75 %	Vn (ev)	Vc	Pc (ev)	Le	Po	Lu	So	Fen	Ha	Fev	Pc
LegG_N	311	233	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0
Ndfa	312	234	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0.5	0
Wheat_N	93	70	1	0.75	0	1	0.5	0.5	0.13	0.5	0.25	0.75	0
Ndfsoil	86	65	0	0	0	0	0	0	0.63	0	0.63	0	1
Nleached_tr	68	51	0	0	1	0	0	0	0.5	0	0.5	0	0
<b>Index de multifonctionnalité</b>			<b>1</b>	<b>0.75</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0.50</b>	<b>0.50</b>	<b>2</b>	<b>0.5</b>	<b>1.38</b>	<b>1.75</b>	<b>1</b>

L'index de multifonctionnalité correspond à la somme des notes de dépassement pour les cinq flux azotés.

Vn : Vesce de Narbonne ; Vc : Vesce commune, Pc : Pois chiche ; Po : Pois ; Le : Lentille, Fen : Fenugrec ; Ha : Haricot ; Lu : Lupin ; Fev : Féverole ; So : Soja.

(ev : engrais vert) : espèces pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines : vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pois chiche en 2014.

### 3.4. Apport d'azote symbiotique au système de culture

Le solde azoté apparent pour le sol est très variable selon les espèces de légumineuses et l'année. En 2014, le solde azoté apparent moyen était de  $10 \text{ kg N ha}^{-1}$  avec des valeurs comprises entre  $-37$  et  $117 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Les plus fortes valeurs ont été mesurées pour le pois chiche et la vesce de Narbonne (en moyenne  $89 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) du fait de l'absence de production de graines tandis que des valeurs négatives ont été mesurées pour le soja, le haricot le lupin et le pois (en moyenne  $-28 \text{ kg N ha}^{-1}$ ). La féverole, la vesce commune et la lentille avaient un solde azoté apparent proche de  $10 \text{ kg N ha}^{-1}$ . En 2016, le solde azoté apparent moyen était de  $13 \text{ kg N ha}^{-1}$  avec des valeurs comprises entre  $-44$  et  $48 \text{ kg N ha}^{-1}$ . Hormis le soja et le pois chiche, le reste des légumineuses avaient en 2016 un solde azoté apparent supérieur en moyenne de  $+23 \text{ kg N ha}^{-1}$  par rapport à celui de 2014. Sans prendre en compte le pois chiche et le soja, les plus grandes valeurs en 2016 sont associées d'une part aux plus grandes proportions d'azote issu de la fixation symbiotique (en moyenne 69 % en 2014 et 75 % en 2016), et d'autre part aux plus faibles indices de récolte azotés en 2016 (en moyenne 58 %) par rapport à 2014 (en moyenne 64 %). Du fait de la récolte des graines, le pois chiche présentait un solde azoté apparent négatif en 2016 contrairement à 2014. Le solde apparent négatif du soja était similaire entre 2014 et 2016 (en moyenne  $-41 \text{ kg N ha}^{-1}$ ).

**Tableau 5** Origine et répartition de l'azote dans les parties aériennes des légumineuses et quantification du solde azoté apparent

Le solde azoté apparent a été calculé de la manière suivante : Solde azoté apparent = N des parties aériennes issu de la fixation symbiotique (Ndfa) - N dans les graines exportées à la récolte (LegG\_N). Les valeurs correspondent aux moyennes des 4 répétitions  $\pm$  (écart-type).

	<b>N total des parties aériennes (kg N ha<sup>-1</sup>)</b>		<b>N des parties aériennes issu de la fixation symbiotique : Ndfa (kg N ha<sup>-1</sup>)</b>		<b>N des parties aériennes issu du prélèvement de l'azote minéral du sol : Ndfsoil (kg N ha<sup>-1</sup>)</b>		<b>N des graines : LegG_N (kg N ha<sup>-1</sup>)</b>		<b>% Ndfa des parties aériennes (%)</b>		<b>Indice de récolte azoté (%)</b>		<b>Solde N apparent (kg N ha<sup>-1</sup>)</b>	
<b>Année 2014</b>														
Pois chiche (ev)	<b>161</b>	(30)	<b>117</b>	(20)	<b>41</b>	(12)	<b>0</b>	(0)	<b>73</b>	(4)	<b>0</b>	(0)	<b>117</b>	(20)
Vesce de Narbonne (ev)	<b>94</b>	(23)	<b>60</b>	(15)	<b>30</b>	(9)	<b>0</b>	(0)	<b>64</b>	(3)	<b>0</b>	(0)	<b>60</b>	(15)
Féverole	<b>177</b>	(17)	<b>129</b>	(14)	<b>45</b>	(6)	<b>116</b>	(12)	<b>73</b>	(3)	<b>66</b>	(2)	<b>13</b>	(7)
Vesce commune	<b>144</b>	(19)	<b>100</b>	(10)	<b>43</b>	(10)	<b>91</b>	(12)	<b>69</b>	(3)	<b>63</b>	(1)	<b>9</b>	(4)
Lentille	<b>139</b>	(15)	<b>99</b>	(11)	<b>39</b>	(5)	<b>93</b>	(11)	<b>71</b>	(2)	<b>67</b>	(2)	<b>6</b>	(3)
Pois	<b>158</b>	(19)	<b>112</b>	(15)	<b>44</b>	(9)	<b>130</b>	(14)	<b>71</b>	(4)	<b>82</b>	(2)	<b>-17</b>	(5)
Lupin	<b>188</b>	(24)	<b>147</b>	(16)	<b>38</b>	(10)	<b>168</b>	(21)	<b>78</b>	(3)	<b>89</b>	(1)	<b>-21</b>	(7)
Haricot	<b>159</b>	(7)	<b>90</b>	(12)	<b>69</b>	(6)	<b>126</b>	(4)	<b>56</b>	(5)	<b>79</b>	(1)	<b>-36</b>	(9)
Soja	<b>360</b>	(23)	<b>290</b>	(36)	<b>67</b>	(25)	<b>327</b>	(20)	<b>81</b>	(7)	<b>91</b>	(1)	<b>-37</b>	(27)
<b>Année 2016</b>														
Pois chiche	<b>227</b>	(18)	<b>140</b>	(10)	<b>84</b>	(9)	<b>167</b>	(16)	<b>62</b>	(1)	<b>74</b>	(4)	<b>-27</b>	(12)
Vesce de Narbonne (ev)	<b>112</b>	(28)	<b>71</b>	(20)	<b>39</b>	(9)	<b>0</b>	(0)	<b>64</b>	(3)	<b>0</b>	(0)	<b>71</b>	(20)
Féverole	<b>426</b>	(52)	<b>364</b>	(47)	<b>58</b>	(6)	<b>316</b>	(45)	<b>86</b>	(1)	<b>74</b>	(2)	<b>48</b>	(4)
Vesce commune	<b>115</b>	(11)	<b>87</b>	(9)	<b>27</b>	(3)	<b>62</b>	(5)	<b>75</b>	(1)	<b>54</b>	(5)	<b>25</b>	(7)
Fenugrec	<b>148</b>	(20)	<b>119</b>	(15)	<b>29</b>	(6)	<b>93</b>	(18)	<b>80</b>	(1)	<b>63</b>	(5)	<b>26</b>	(6)
Lentille	<b>153</b>	(8)	<b>123</b>	(8)	<b>29</b>	(4)	<b>93</b>	(13)	<b>80</b>	(3)	<b>61</b>	(6)	<b>30</b>	(6)
Pois	<b>147</b>	(23)	<b>113</b>	(20)	<b>31</b>	(3)	<b>88</b>	(17)	<b>77</b>	(2)	<b>60</b>	(3)	<b>25</b>	(3)
Lupin	<b>217</b>	(12)	<b>174</b>	(9)	<b>39</b>	(2)	<b>177</b>	(10)	<b>80</b>	(2)	<b>82</b>	(1)	<b>-4</b>	(1)
Haricot	<b>146</b>	(27)	<b>81</b>	(17)	<b>65</b>	(10)	<b>99</b>	(23)	<b>55</b>	(2)	<b>68</b>	(4)	<b>-19</b>	(6)
Soja	<b>257</b>	(11)	<b>172</b>	(15)	<b>82</b>	(6)	<b>216</b>	(6)	<b>67</b>	(3)	<b>84</b>	(3)	<b>-44</b>	(15)

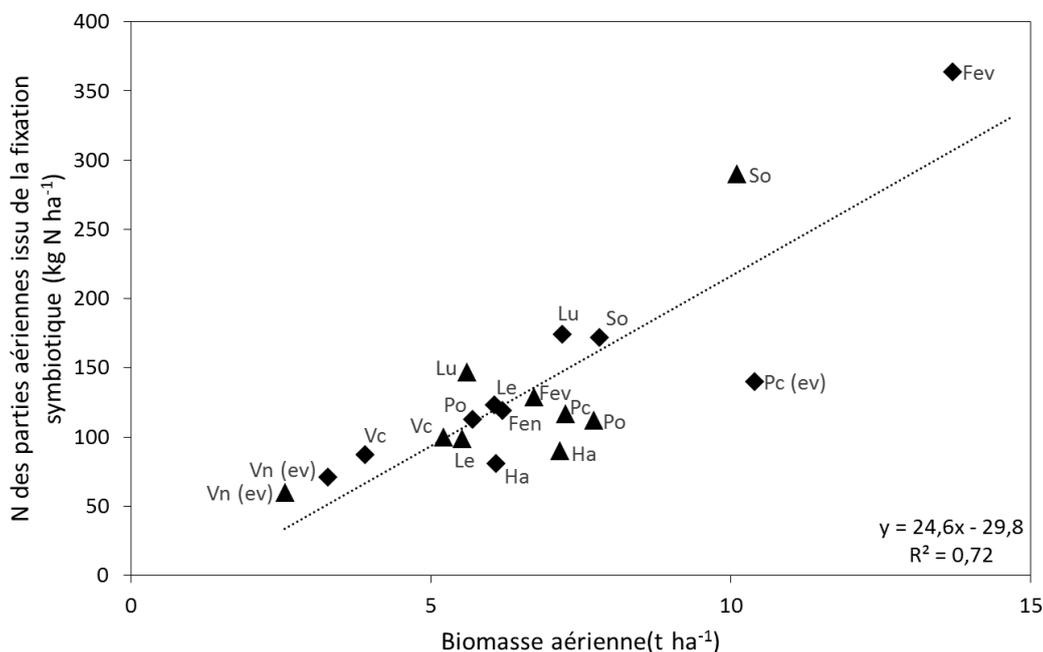
(ev : engrais vert) : espèces pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines : vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pois chiche en 2014.

## 4. Discussion

### 4.1. Synergie entre la production de graines et la fixation symbiotique

Une relation positive entre la quantité d'azote dans les graines et la quantité d'azote fixée a été obtenue sur la base de mesures sur dix espèces de légumineuses et deux expérimentations au champ (Fig. 4A).

Les différences de quantités d'azote dans les graines entre espèces dépendent dans un premier temps de différences de croissance (biomasse) entre espèces. En effet, le niveau de croissance définit la demande azotée et donc la capacité de la plante à accumuler de l'azote. Sur la base des variations entre espèces et années, une relation positive entre la biomasse aérienne à maturité et la quantité d'azote fixée a été mise en évidence avec en moyenne 25 kg N fixés par tonne de matière sèche aérienne (Fig. 6). Cette valeur est équivalente à la valeur maximale de 25 kg N fixés par tonne de matière sèche aérienne rapportée par Herridge et al. (2008). Par conséquent, compte tenu du rôle majeur joué par la croissance aérienne en tant que déterminant de l'activité fixatrice, l'amélioration des facteurs limitant la croissance est essentiel afin d'augmenter les quantités d'azote fixées tel que souligné par Crews and Peoples (2004).



**Fig. 6** Relation entre la quantité d'azote des parties aériennes issue de la fixation symbiotique et la biomasse aériennes mesurée au champ à maturité pour dix espèces de légumineuses et deux années de culture. Légumineuses cultivées en 2014 (▲) ; Légumineuses cultivées en 2016 (◆). Chaque point correspond à la moyenne des 4 répétitions. Fen : Fenugrec ; Fev : Féverole ; Ha : Haricot ; Le : Lentille, Lu : Lupin ; Po : Pois ; Pc : Pois chiche ; So : Soja ; Vc : Vesce commune ; Vn : Vesce de Narbonne. (ev : engrais vert : espèces pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines : vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pois chiche en 2014).

Par ailleurs, la quantité d'azote dans les graines dépend également de la part d'azote remobilisée des parties végétatives vers les graines durant la phase de remplissage des graines. Nos résultats indiquent que l'indice de récolte azoté (NHI) est d'autant plus grand que la teneur en azote des graines et la taille des graines sont importantes (Fig. 3 et 4A). D'autre part, la mise en place et le développement des graines ainsi que le transfert d'azote vers les graines sont largement influencés par les facteurs environnementaux au moment du remplissage des graines en fin de cycle (Larmure et al., 2005; Lecoer and Sinclair, 2001). Les conditions climatiques ont largement influencé le NHI du pois chiche, avec l'absence de production de graines en 2014 suite à d'importantes précipitations en juillet et août pendant la période de remplissage des graines, qui ont stimulé une reprise de la croissance végétative au lieu de la maturation des graines. Le NHI du pois était également très différent entre 2014 (82 %) et 2016 (60 %), malgré une teneur en azote des graines équivalente entre les deux années (3,8 % en moyenne). Ces différences pourraient découler de la plus faible biomasse de graines du pois en 2016 par rapport à 2014, résultant d'une plus forte disponibilité en azote par graines en 2016 par rapport à 2014 (pour une teneur en azote des graines similaire entre les deux années). Ainsi les besoins en azote des graines ont été facilement satisfaits et donc la remobilisation de l'azote des pailles vers les graines limitée. Les fréquentes précipitations du printemps 2016 ont probablement limité la production de graines du pois.

#### 4.2. Compromis entre production de graines et fourniture d'azote au sol

En considérant les dix espèces de légumineuses et les deux années d'expérimentation, une relation négative entre la teneur en azote des graines, et la teneur en azote des pailles a mise en évidence. Lorsqu'une grande partie de l'azote de la plante est accumulé dans les graines, les pailles laissées au sol sont au contraire pauvres en azote et présentent de faibles rapports azote sur carbone, (Fig. 3) et donc un plus faible potentiel de minéralisation (chapitre 2). Par ailleurs, l'azote non remobilisé des parties végétatives vers les graines correspond à des pools d'azote structural, tels qu'indiqués par la corrélation positive entre la teneur en azote des graines et la proportion de cellulose dans les résidus de culture (Fig. 3). Ainsi, l'accumulation d'azote dans les graines est le plus souvent antagoniste avec la restitution au sol de pailles riches en azote.

D'autre part, il est intéressant de raisonner en termes de **solde azoté** pour le sol, afin d'estimer la quantité d'azote apportée au sol par le processus de fixation symbiotique et d'identifier les différences entre les espèces de légumineuses. Le solde azoté varie selon le niveau de fixation symbiotique mais également selon la part de l'azote exporté par les graines.

Le solde azoté a tendance à être positif dans les situations dans lesquelles la fixation symbiotique est favorisée. C'est le cas dans des situations de faibles reliquats azotés au semis des légumineuses, dans lesquelles la nutrition azotée repose en grande partie sur la fixation symbiotique (fortes valeurs %

Ndfa) (Chapitre 1). D'autre part, pour un même niveau de disponibilité en azote minéral, de forts niveaux de croissance augmentent le niveau de fixation symbiotique tel qu'indiqué par la relation entre la biomasse aérienne et la quantité d'azote fixée (Fig. 6). Cependant, à niveau de croissance égal, certaines espèces de légumineuses reposent en moindre proportion sur la fixation symbiotique du fait d'une forte capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol telle que montrée dans le chapitre 1. C'est notamment le cas du haricot pour lequel de faibles proportions d'azote issu de la fixation symbiotique ont été mesurées les deux années (en moyenne 55 %).

De forts niveaux de fixation symbiotique ne sont pas suffisants pour assurer un solde azoté apparent positif. Des valeurs négatives de soldes azotés sont obtenues quand la part d'azote exporté par les graines (NHI) est supérieure à la proportion d'azote issu de la fixation symbiotique (% Ndfa), lorsque seules les parties aériennes sont prises en compte. Les très grandes valeurs de NHI mesurées pour le lupin et le soja lors des deux années d'expérimentations ont conduit à des valeurs négatives de soldes azotés. Une valeur moyenne similaire de  $-40 \text{ kg N ha}^{-1}$  sur le soja a été rapportée par Salvagiotti et al. (2008) à partir d'une méta-analyse sur une large gamme de situations pédoclimatiques. Au contraire, dans un grand nombre d'études australiennes des valeurs positives de soldes azotés apparents ont été mesurées pour le lupin (Armstrong et al., 1997; Evans et al., 1987a; Evans et al., 1989; Peoples et al., 2001). Dans ces études, la part d'azote récolté dans les graines était bien moins importante que celle mesurée dans notre étude (NHI en moyenne 44 vs 86 %). Pour un niveau de fixation symbiotique donné, il existe donc un antagonisme entre la maximisation du transfert d'azote dans les graines et la restitution d'azote au sol.

Notre étude ne prend cependant pas en compte l'azote issu de la fixation symbiotique et accumulé dans les parties souterraines, bien que lorsque celles-ci sont prises en compte le solde azoté est augmenté (Khan et al., 2003; Peoples et al., 2001). En effet, en prenant en compte la quantité d'azote dans les parties souterraines et en faisant l'hypothèse que la proportion d'azote issu de la fixation symbiotique est la même dans les parties aériennes et souterraines, la quantité d'azote fixée totale est augmentée tandis que la quantité d'azote exportée par les graines reste inchangée.

#### 4.3. Antagonisme entre les quantités d'azote minéral prélevées pendant le cycle des légumineuses et les quantités d'azote lixiviées après leur récolte

A partir des dix espèces de légumineuses et des deux expérimentations au champ, une relation négative entre la quantité d'azote prélevée pendant le cycle des légumineuses et la quantité d'azote lixiviée après leur récolte a été mise en évidence (Fig. 4A). Cette relation indique que les légumineuses, avec une grande capacité de prélèvement d'azote minéral, limitent non seulement le risque de lixiviation pendant le cycle des légumineuses mais également après leur récolte, en limitant le reliquat azoté à la récolte et donc les quantités d'azote minéral susceptibles d'être lixiviées après leur récolte.

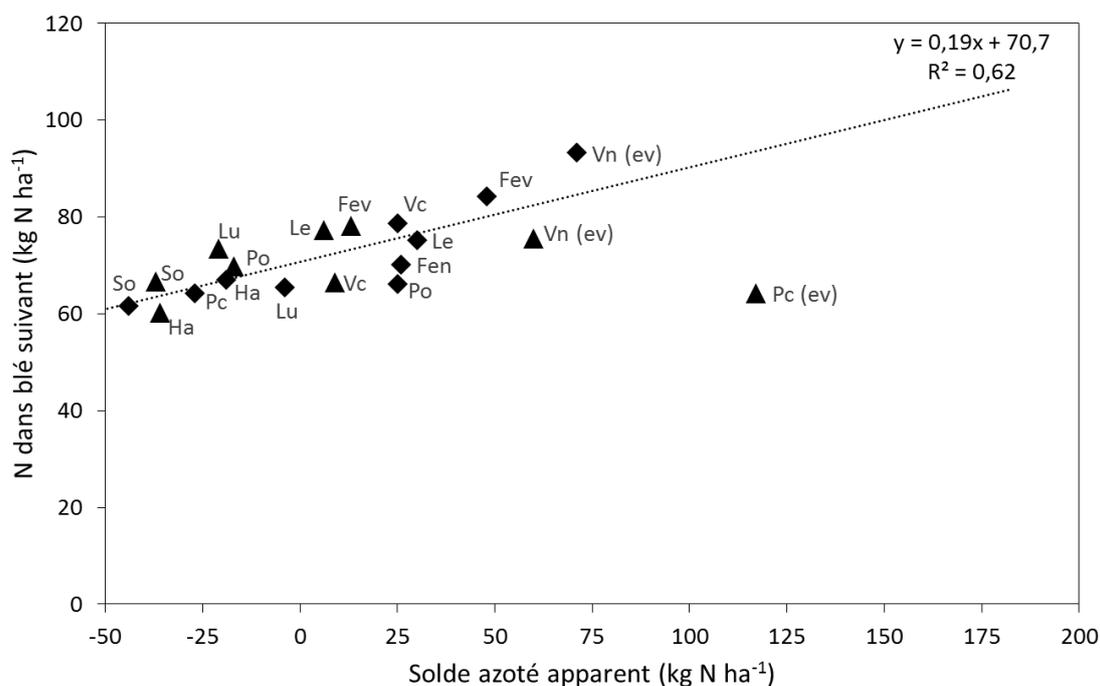
La quantité d'azote prélevée pendant le cycle des légumineuses est également positivement corrélée avec la vitesse d'expansion latérale du système racinaire (Ler). Par ailleurs, la relation positive entre ce flux azoté et la proportion de biomasse nodulaire par rapport à la biomasse souterraine totale peut sembler étonnante. En effet, ce trait est plutôt assimilé au coût en carbone de la symbiose par rapport aux racines rendant compte de l'allocation carbonée aux nodosités nécessaire à leur fonctionnement aux dépens des racines (Voisin et al., 2003a). Cependant, une très grande allocation de biomasse aux nodosités représente un fort coût carboné pour la plante, limitant à la fois le développement des racines et des parties aériennes (Bourion et al., 2007; Voisin et al., 2015). Ainsi, nous faisons l'hypothèse qu'en présence d'azote minéral dans le sol, les plantes pour lesquelles les nodosités engendrent un coût carboné important, favorisent au maximum le prélèvement d'azote minéral via le développement des racines, limitant ainsi le recours à la fixation symbiotique coûteuse en énergie pour la plante. C'est notamment le cas du haricot pour lequel les nodosités représentent 39 % de la biomasse souterraine en l'absence d'azote minéral (comparé à 14 % en moyenne pour les autres espèces). Ainsi, en présence d'azote minéral dans le sol (reliquat azoté au semis et minéralisation de l'azote du sol), le prélèvement d'azote minéral comble une partie non négligeable des besoins azotés du haricot tandis que la majorité des espèces de légumineuses prélèvent de bien plus faibles quantités d'azote minéral et maintiennent un niveau de fixation symbiotique plus élevé. La très forte réponse de la croissance racinaire du haricot en présence d'azote minéral par rapport à une situation sans azote minéral (chapitre 1) est cohérente avec l'hypothèse d'un coût élevé de la fixation symbiotique au détriment du développement des racines pour cette espèce.

Aucune relation n'a été établie entre le prélèvement d'azote minéral par les légumineuses et la proportion de biomasse totale de la plante allouée aux racines (RMF). La biomasse totale ne donne pas d'indication sur l'architecture racinaire qui détermine en partie la capacité de prélèvement des nutriments du sol telle qu'indiquée par Corre-Hellou et al. (2007), Garnett et al. (2009) et Moreau et al. (2017). Ainsi, pour une même proportion de biomasse allouée aux racines, la zone d'exploration racinaire en largeur et en profondeur ainsi que la densité racinaire peuvent fortement varier selon les espèces (Dunbabin et al., 2003) et moduler la capacité de prélèvement de l'azote minéral.

#### 4.4. Relation entre la quantité d'azote du blé suivant et les autres des flux azotés

Pris l'une sans l'autre, la quantité d'azote dans les graines de légumineuses et la quantité d'azote fixée dans les parties aériennes sont dé-corrélées de la quantité d'azote dans le blé suivant. Ainsi, l'exportation d'une grande quantité d'azote par les graines de légumineuses n'implique pas forcément de faibles quantités d'azote dans le blé suivant (Fig. 4A). La féverole en 2016 illustre bien ce cas avec l'exportation en moyenne de 316 kg N ha<sup>-1</sup> tandis que cette espèce engendre parmi les plus grandes quantités d'azote dans le blé suivant (84 kg N ha<sup>-1</sup>). De même, de grandes quantités d'azote fixées par

les légumineuses n'engendrent pas systématiquement de grandes quantités d'azote dans le blé suivant. C'est notamment le cas du soja en 2014, avec une quantité moyenne fixée de 290 kg N ha<sup>-1</sup> tandis que la quantité d'azote dans le blé suivant fait partie des plus faibles parmi l'ensemble des précédents légumineuses (67 kg N ha<sup>-1</sup>). Cependant, une relation positive a pu être établie entre la quantité d'azote dans le blé suivant et le solde azoté apparent pour le sol, qui combine à la fois la quantité d'azote dans les graines de légumineuses et la quantité d'azote fixée (Fig. 4A et Fig. 7). Ce résultat confirme la relation établie par Armstrong et al. (1997). Ainsi, en absence de fertilisation azotée, l'enrichissement du sol en azote issu du processus de fixation symbiotique est corrélé avec la quantité d'azote dans le blé suivant. Malgré un solde azoté apparent très élevé, le précédent pois chiche en 2014 présente de bien plus faibles quantités d'azote dans le blé suivant par rapport à la valeur prédite par la relation moyenne. Les faibles performances du blé suivant pourraient être associées à d'autres processus limitant le développement du blé cultivé après le pois chiche, indépendamment des flux azotés.



**Fig. 7** Relation entre la quantité d'azote dans le blé suivant et le solde azoté apparent des précédents légumineuses, pour dix espèces de légumineuses et deux expérimentations au champ. Légumineuses cultivées en 2014 et suivies par une culture de blé récoltée en 2015 (▲) ; Légumineuses cultivées en 2016 et suivies par une culture de blé récoltée en 2017 (◆). Chaque point correspond à la moyenne des 4 répétitions. Fen : Fenugrec ; Fev : Féverole ; Ha : Haricot ; Le : Lentille, Lu : Lupin ; Po : Pois ; Pc : Pois chiche ; So : Soja ; Vc : Vesce commune ; Vn : Vesce de Narbonne. (ev : engrais vert) : espèces pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines : vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pois chiche en 2014. La régression linéaire a été établie pour les deux expérimentations et l'ensemble des espèces de légumineuses sauf pour le précédent pois chiche en 2014.

Il existe au contraire un clair antagonisme entre la quantité d'azote minéral prélevée pendant le cycle des légumineuses et la quantité d'azote dans le blé suivant (Fig. 4A). La capacité de prélèvement d'azote minéral par les légumineuses peut en effet impacter à deux niveaux le stock d'azote du sol potentiellement disponible pour le blé suivant. Tout d'abord, la quantité d'azote minéral prélevé durant le cycle des légumineuses réduit directement le reliquat azoté à la récolte des légumineuses (N sparing). Ainsi, moins la légumineuse prélève d'azote durant son cycle, plus grandes sont les quantités d'azote minéral restant dans le sol à la récolte des légumineuses, à condition que cet azote n'ait pas été lixivié durant le cycle des légumineuses. Par ailleurs, de faibles capacités de prélèvement de l'azote minéral du sol augmentent les quantités d'azote à fixer nécessaires pour combler les besoins azotés subsistants. Le solde azoté apparent est par conséquent augmenté.

La relation positive entre la quantité d'azote lixiviée après la récolte des légumineuses et la quantité d'azote dans le blé suivant est étonnante (Fig.4A). Les précédents légumineuses qui ont engendré les plus grandes quantités d'azote dans le blé suivant sont également ceux pour lesquels les plus grandes pertes d'azote par lixiviations entre leur récolte et la récolte du blé suivant ont été mesurées. C'est notamment le cas des espèces de printemps (fenugrec, féverole, lentille, lupin, pois, vesce commune) pour lesquelles la durée d'interculture a été plus longue, compte tenu d'une récolte plus précoce par rapport aux espèces d'été (haricot, pois chiche, soja et vesce de Narbonne) (Chapitre 3). De grandes quantités d'azote lixiviées après la vesce de Narbonne ont également été mesurées malgré la plus courte durée d'interculture par rapport aux espèces de printemps. Pour cette espèce, la faible capacité de prélèvement d'azote minéral du sol ainsi que la minéralisation nette de l'azote des résidus, du fait de rapports azote/carbone élevés, ont engendré de grandes quantités d'azote minéral dans le sol après la récolte, et ainsi augmenté les pertes d'azote par lixiviation (chapitre 3, Fig. 4). Cependant, les plus grandes pertes par lixiviation de l'azote minéral du sol après la récolte des espèces de printemps et la vesce de Narbonne, n'ont pas engendré une plus faible disponibilité en azote minéral du sol pour le blé suivant par rapport aux espèces d'été. (Chapitre 3, Fig. 3C et D). Par ailleurs, même si une partie de l'azote minéral laissé au sol par les légumineuses est lixivié après leur récolte, la nutrition azotée du blé est également assurée par la minéralisation de l'azote organique du sol et des résidus de légumineuses. Ces deux derniers processus augmentent le pool d'azote minéral du sol surtout au printemps, période durant laquelle les risques de pertes par lixiviations sont bien plus faibles que pendant la période automne-hiver.

#### 4.5. Multifonctionnalité associée aux flux azotés induits par les légumineuses

La multifonctionnalité des espèces de légumineuses a été évaluée à partir de la méthode de dépassement de seuils définis comme un pourcentage du niveau maximal de chaque flux azoté. Pour l'ensemble des espèces de légumineuses, nos résultats indiquent que le nombre moyen de flux azotés

supérieurs au seuil considéré décroît avec l'augmentation du seuil. Les antagonismes et les décorrélatons qui existent entre certains flux azotés limitent ainsi la fourniture simultanée des flux azotés. Cette méthode seule ne permet cependant pas d'identifier les flux azotés les plus limitants pour atteindre l'index de multifonctionnalité maximal. Il est donc nécessaire de combiner cette méthode avec une étude plus approfondie des valeurs absolues des différents flux mesurés pour les différentes espèces de légumineuses. Ainsi, dans notre étude, la vesce de Narbonne, la lentille, la vesce commune et la féverole ont été identifiées comme de bons précédents permettant de maximiser la quantité d'azote dans le blé suivant. Au contraire le haricot, le soja et le pois chiche sont de bien moins bons précédents culturaux mais permettent une bonne valorisation de l'azote minéral du sol et limitent ainsi les risques de lixiviation pendant et après leur culture. Les plus grandes quantités d'azote fixées et exportées dans les graines ont été mesurées pour la féverole et le soja. La mise en évidence des synergies et des antagonismes entre les différents flux azotés permet d'identifier les compromis entre les services écosystémiques et ainsi d'aider au choix des espèces de légumineuses selon les services écosystémiques recherchés prioritairement.

Dans le cadre de cette étude un même seuil a été attribué pour l'ensemble des flux azotés. Cet outil pourrait être adapté à chaque situation agricole, en attribuant un seuil différent à chaque flux, selon la priorisation des services écosystémiques recherchés, et permettre le choix de l'espèce de légumineuse la plus adaptée aux objectifs de l'agriculteur.

Les indices de multifonctionnalité établis dans le cadre de cette étude sont cependant à considérer comme des points de référence. En effet, les fonctions azotées varient selon les conditions environnementales qui régissent les différents flux azotés de manière directe telle que la quantité d'azote lixiviée ou indirecte en impactant les traits de plantes déterminants dans l'obtention des flux azotés. Par ailleurs, les impacts négatifs induits par certaines cultures de légumineuses peuvent également être compensés par la mise en place de pratiques agricoles adéquates. Les associations légumineuses-céréales (Carton et al., 2018; Hauggaard-Nielsen et al., 2009) ou l'implantation de couverts après la culture des légumineuses (Plaza-Bonilla et al., 2015; Tribouillois et al., 2015a) peuvent notamment limiter les pertes par lixiviation pendant et après les cultures de légumineuses.

Enfin, certaines fonctions azotées des légumineuses, étudiées dans le cadre de cette étude, assurent des services écosystémiques directs pour l'agriculteur via la réduction du recours à la fertilisation azotée à l'échelle de la rotation de culture ainsi que des services écosystémiques indirects pour la société qui n'ont pas été étudiés dans le cadre de cette étude. La réduction de l'utilisation d'énergies fossiles associée à la fabrication, au transport et à l'utilisation des engrais azotés atténue les émissions de gaz à effet de serre et contribue à la régulation du climat.

## 5. Conclusion

A partir de cette étude, dix espèces de légumineuses à graines ont été classées selon leurs profils fonctionnels relatifs à des fonctions azotées. Ainsi, la caractérisation des espèces de légumineuses à graines par une combinaison de valeurs de traits de plantes ou de propriétés du couvert permet d'évaluer leur potentiel à délivrer des fonctions relatives à l'azote et des services écosystémiques qui en découlent. L'établissement de ces profils fonctionnels aide également au choix des espèces de légumineuses selon les objectifs recherchés dans un environnement donné.

Dans cette étude, les profils fonctionnels ont été établis dans la région de Bourgogne. La transposition de ces profils fonctionnels à d'autres conditions environnementales contrastées peut être hasardeuse compte tenu de l'effet des conditions pédoclimatiques sur les valeurs prises par les traits et l'impact sur les fonctions associées. Ainsi, la caractérisation des mêmes légumineuses à graines dans d'autres conditions environnementales pourrait demander une réévaluation des valeurs de traits et nécessiter l'intégration de nouveaux traits adaptés aux nouvelles contraintes environnementales de la situation considérée. Pour autant, les deux expérimentations aux conditions climatiques contrastées ont permis de distinguer des profils fonctionnels entre les dix espèces de légumineuses relativement stables entre les années étudiées.



## Discussion générale et perspectives

## 1. Retour sur les principaux résultats de thèse

L'objectif principal de la thèse a consisté à comparer dix espèces de légumineuses à graines quant aux flux d'azote qu'elles induisent pendant une succession culturale de deux ans légumineuse – blé, et d'identifier les déterminants de ces flux azotés, explicatifs des différences entre espèces de légumineuses. Ce travail a contribué à une meilleure compréhension du fonctionnement des légumineuses à graines en termes de flux azotés, en élargissant les connaissances jusqu'à présent principalement acquises sur le pois en Europe. Ce travail de recherche donne des éléments i) pour aider aux choix des espèces de légumineuses à graines en termes de flux azotés induits à l'origine de services écosystémiques recherchés, et ii) pour optimiser la gestion de l'azote lors de l'introduction des légumineuses dans les systèmes de culture.

### 1.1. Acquisition de l'azote atmosphérique et de l'azote minéral du sol au cours du cycle des légumineuses

L'un des objectifs de la thèse consistait à étudier la réponse de la croissance et de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral du sol et de comprendre les possibles différences de réponse entre les dix espèces de légumineuses :

**QUESTION 1 : La fixation symbiotique permet-elle de répondre aux besoins azotés de toutes les espèces de légumineuses en comparaison à une alimentation azotée reposant sur le prélèvement d'azote minéral?**

**QUESTION 2 : Existe-t-il des différences de réponse de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral dans le sol, pour une diversité d'espèces de légumineuses et quels en sont les facteurs explicatifs ?**

L'essai au champ conduit en 2014 a démontré que la **disponibilité en azote minéral du sol**, modulée par différents niveaux de fertilisation azotée au semis (0, 50, 150 et 300 kg N ha<sup>-1</sup>), **n'engendrait pas de différences de quantités d'azote dans les parties aériennes pour la majorité des espèces de légumineuses**. Seul le plus grand niveau de disponibilité en azote minéral du sol au semis (> 350 kg N ha<sup>-1</sup>) a généré une légère augmentation de la quantité d'azote des parties aériennes pour la féverole, le pois et le haricot. Le pois chiche est la seule espèce ayant répondu positivement à l'augmentation de la disponibilité en azote minéral du sol, avec une augmentation graduelle de la quantité d'azote dans les parties aériennes à maturité (Chapitre 1). Par ailleurs, pour l'ensemble des espèces, le pourcentage d'azote issu de la fixation symbiotique a diminué avec la quantité d'azote minéral disponible au semis (Chapitre 1). Ces résultats mettent en avant une complémentarité entre la fixation de l'azote atmosphérique par les nodosités et le prélèvement d'azote minéral par les racines afin de

subvenir aux besoins azotés de l'ensemble des légumineuses, hormis le pois chiche. Pour cette espèce, il est probable que le déficit de fixation symbiotique soit imputable à une souche de rhizobium non adaptée à la variété de plante ; en effet, la spécificité d'hôte est particulièrement grande pour cette espèce et le choix de la souche conditionne grandement l'efficacité de la fixation symbiotique.

En l'absence de fertilisation azotée, la disponibilité en azote minéral du sol au semis était au minimum de  $70 \text{ kg N ha}^{-1}$  pour l'ensemble des légumineuses. Ce pool d'azote minéral a certainement évité un stress azoté lors du passage de la phase d'hétérotrophie (utilisation de l'azote de la semence) à la phase d'autotrophie (mise en place de la fixation symbiotique) et a ainsi assuré une croissance et une nutrition azotée équivalente entre les légumineuses reposant en majorité sur la fixation symbiotique, et les légumineuses reposant exclusivement ou quasiment exclusivement sur le prélèvement d'azote minéral du sol. Au contraire, l'essai en rhizotron a mis en évidence un effet positif de la disponibilité en azote minéral sur la biomasse totale des légumineuses par rapport à une situation exempte d'azote minéral dans le milieu (Chapitre 1). Ces observations confirment l'importance de la présence d'un faible reliquat d'azote minéral dans le milieu au moment du semis des légumineuses afin d'assurer la mise en place de la fixation symbiotique et donc une croissance et une nutrition azotée optimale. En effet, en cas d'absence totale d'azote minéral dans le sol et suite à l'épuisement des ressources azotées de la semence, une désynchronisation entre la mise en place de la fixation symbiotique et les besoins azotés de la plante peut engendrer une carence azotée et limiter temporairement la croissance de la plante. Il est cependant intéressant de noter que la réponse de la biomasse à la présence d'azote minéral dans le milieu par rapport à une situation en l'absence totale d'azote minéral peut varier entre les espèces de légumineuses (cf essai en rhizotron, Chapitre 1). En présence d'azote minéral, la biomasse totale du haricot a fortement été augmentée, tandis que la biomasse totale du lupin, de la lentille et du fenugrec n'a que très légèrement été augmentée par rapport à la situation sans azote minéral dans le milieu. Certains traits de plantes pouvant moduler la synchronisation entre la mise en place de la fixation symbiotique et les besoins azotés de la plante, pourraient expliquer les différences de réponse de la croissance des légumineuses à la présence d'azote minéral. Il peut s'agir de la taille de la semence qui détermine le pool d'azote disponible avant la mise en place de la fixation symbiotique, du type de germination (épigée ou hypogée) qui détermine la répartition de l'azote de la semence entre les parties aériennes et les parties souterraines, et de la vitesse de croissance de la plante qui définit les besoins azotés. Ces traits de plantes n'ont cependant pas été étudiés dans le cadre de cette thèse puisqu'en situation de champ, la présence d'un reliquat au semis assure la mise en place de la fixation symbiotique sans engendrer de carence azotée précoce. Dans ce cas, l'effet de ces traits de plantes sur la nutrition azotée des légumineuses est négligeable.

Par ailleurs, **la fixation symbiotique est assurée par une symbiose entre la légumineuse et des bactéries du sol de type *Rhizobium***. Dans le cadre de notre étude, la présence des bactéries a été assurée par une inoculation au semis des légumineuses avec une souche de *Rhizobium* spécifique à chaque espèce. Malgré un travail préliminaire de sélection des souches, l'efficacité de la fixation symbiotique (quantité d'azote fixée par unité de biomasse de nodosités) a certainement pu varier entre les espèces de légumineuses. Dans l'essai en rhizotron en l'absence totale d'azote minéral dans le milieu, le haricot a été caractérisé par un rapport biomasse nodulaire sur biomasse souterraine élevé. Ce rapport élevé indique un investissement en carbone de la plante important dans la mise en place des nodosités. Pourtant, la biomasse totale du haricot a fortement augmenté en présence d'azote minéral par rapport à la modalité sans azote minéral, suggérant une faible efficacité de la fixation symbiotique du haricot. En conditions au champ, malgré l'utilisation de la même souche de *Rhizobium*, la présence d'un reliquat azoté au semis a permis de combler une grande partie des besoins azotés du haricot et de compenser la vraisemblablement faible efficacité de la fixation symbiotique. Par ailleurs, malgré la présence de souche de *Rhizobium* efficace dans le sol, la fixation symbiotique peut également être limitée par certaines conditions environnementales. Ainsi, les exemples du haricot et du pois chiche soulignent l'importance d'assurer la présence des souches spécifiques de *Rhizobium* dans le sol et d'optimiser leur efficacité afin d'assurer la fixation symbiotique.

Nos résultats confirment **l'effet inhibiteur de l'azote minéral sur la fixation symbiotique pour l'ensemble des dix espèces de légumineuses avec cependant de grandes différences d'intensité de la réponse entre les espèces** (Chapitre 1). La fixation symbiotique du haricot a rapidement été complètement inhibée lorsque la quantité d'azote minéral disponible au semis augmentait, tandis que le lupin et la féverole ont maintenu des niveaux de fixation symbiotique proches de 40 % même quand la quantité d'azote minéral au semis excédait 350 kg N ha<sup>-1</sup>. L'étude des différentes espèces de légumineuses dans la même expérimentation au champ nous a permis de décorrélérer deux facteurs majeurs qui modulent la quantité d'azote fixée : les besoins en azote de la plante et la capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol. Ainsi, pour une même quantité d'azote minéral du sol disponible au semis, les espèces avec de grands besoins azotés ont tendance à fixer de plus grandes quantités d'azote par rapport aux espèces avec de plus faibles besoins azotés, afin de satisfaire le reste des besoins azotés qui n'ont pas été comblés par le prélèvement d'azote minéral. Cependant, nos résultats indiquent qu'il existe une variabilité dans cette relation, associée à des différences de capacité de prélèvement de l'azote minéral entre les espèces de légumineuses. Ainsi, le haricot et le soja ont été identifiés comme des espèces avec de grandes capacités de prélèvement de l'azote minéral du sol tandis que la vesce de Narbonne, le fenugrec, la vesce commune, la féverole et le lupin ont présenté de bien plus faibles capacités de prélèvement de l'azote minéral. Ces capacités de

prélèvement de l'azote minéral ont par ailleurs été positivement corrélées avec la vitesse d'expansion latérale du système racinaire. De grandes vitesses d'expansion en largeur permettent en effet d'augmenter la zone d'exploration racinaire et donc le pool d'azote minéral du sol accessible pour les légumineuses. Tout comme dans les travaux de Dayoub et al. (2017), la vitesse d'expansion racinaire en profondeur semble avoir moins d'impact sur les différences de prélèvement d'azote minéral entre espèces de légumineuses par rapport à la vitesse d'expansion latérale du système racinaire.

Dans cette partie de l'étude, de très grandes quantités d'azote minéral ont été apportées au semis afin d'obtenir un gradient de disponibilité en azote minéral au semis et ainsi avoir une meilleure compréhension des différences de réponse des légumineuses à la présence d'azote minéral. Bien que non représentative des conditions agricoles, la modalité avec la plus grande disponibilité en azote minéral (300 kg N ha<sup>-1</sup> apporté par fertilisation au semis) nous a servi de situation de référence non limitante en azote pour l'ensemble des espèces. Elle a ainsi pu être comparée à la modalité sans fertilisation azotée afin d'étudier la capacité de la fixation symbiotique à répondre aux besoins azotés des différentes espèces de légumineuses. De plus, l'utilisation d'un gradient d'azote minéral disponible au semis nous a permis d'exacerber les différences de capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol entre les espèces. En effet, dans des situations de faible disponibilité en azote minéral, les différences de prélèvement d'azote minéral entre les espèces sont plus difficilement identifiables car elles nécessitent une très grande précision de mesure. Enfin, malgré l'absence de fertilisation azotée des légumineuses, certaines conditions agricoles présentent de grands reliquats azotés au semis des légumineuses. Dans ces situations les risques de lixiviation de l'azote peuvent être importants en cas de précipitations élevées pendant le cycle des légumineuses ou après leur récolte. Notre étude donne ainsi des indications quant aux espèces les plus susceptibles de valoriser l'azote minéral et de limiter les pertes par lixiviation. Dans le cas contraire, des pratiques agricoles adaptées doivent être mises en place afin de limiter le risque de pertes par lixiviation pour les espèces avec de faibles capacités de valorisation de l'azote minéral du sol. La mise en place d'association céréale-légumineuse souvent mise en avant pour les processus de facilitation d'un point de vue de l'azote peut s'avérer pertinente. La forte compétition des céréales pour l'azote minéral du sol permet la valorisation de celui-ci et accentue la nécessité des légumineuses à reposer leur nutrition azotée sur la fixation symbiotique (Li et al., 2009). Un potentiel risque de dominance des céréales sur les légumineuses est cependant à envisager en cas de trop forte disponibilité en azote minéral, tel que cela a été mis en avant par plusieurs études (Bedoussac and Justes, 2010; Hauggaard-Nielsen et al., 2009).

## 1.2. Devenir de l'azote après la culture des légumineuses

Dans le cadre de cette étude nous avons également étudié l'effet des légumineuses sur les performances agronomiques d'un blé suivant en focalisant notre étude sous l'angle de l'azote.

**QUESTION 3 : Les différentes espèces de légumineuses engendrent-elles les mêmes effets positifs sur les performances agronomiques du blé suivant?**

**QUESTION 4 : Est-ce que l'ensemble de l'azote fourni par les précédents légumineuses est valorisé par le blé suivant?**

Dans la majorité des cas, notre étude a mis en évidence, **l'effet positif des légumineuses sur le rendement et la quantité d'azote du blé suivant par rapport à des précédents céréales** (Chapitre 3). En 2017, le blé non fertilisé cultivé après les légumineuses de printemps (fenugrec, féverole, lentille, lupin, pois et vesce commune) présentait en moyenne des rendements de  $0.8 \text{ t ha}^{-1}$  supérieurs (21 % d'augmentation) et des quantités d'azote dans les parties aériennes de  $10 \text{ kg N ha}^{-1}$  supérieures (15 % d'augmentation) à ceux du blé précédé par de l'orge. De même, le blé non fertilisé cultivé après les légumineuses d'été (haricot, pois chiche, soja et vesce de Narbonne) présentait des rendements de  $1.6 \text{ t ha}^{-1}$  supérieurs (66 % d'augmentation) et des quantités d'azote dans les parties aériennes de  $23 \text{ kg N ha}^{-1}$  supérieures (51 % d'augmentation) à ceux du blé précédé par du sorgho. En l'absence de fertilisation azotée, le surplus d'azote dans le blé après des légumineuses par rapport aux céréales de référence et l'augmentation de rendement qui en découle, provient essentiellement des différences **de minéralisation des résidus de culture**. Une relation positive entre la quantité d'azote dans les parties aériennes du blé et la quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus des précédents culturaux estimée avec le modèle STICS a pu être mise en évidence (Chapitre 3). En effet, les résidus de légumineuses présentaient des rapports C/N souvent plus faibles par rapport aux céréales, avec cependant une grande variabilité entre les espèces de légumineuses. Cette caractéristique biochimique des résidus a été montrée comme prédominante pour expliquer les différences de minéralisation des résidus de culture. Cependant, contrairement aux légumineuses cultivées en tant que couvert (engrais vert), pour lesquelles l'ensemble de l'azote de la plante est restitué au sol, les légumineuses à graines exportent une grande proportion de l'azote dans les graines, limitant la quantité d'azote dans les résidus laissés au sol ainsi que leur teneur en azote. De fait, dans notre étude, le rapport C/N des résidus aériens de légumineuses (pailles) était souvent supérieur au rapport C/N seuil (souvent considéré à 25) à partir duquel une minéralisation nette de l'azote des résidus est mesurée (Chapitre 2). Ainsi, la plus grande disponibilité en azote minéral du sol après les cultures de légumineuses à graines par rapport aux précédents céréales découle essentiellement d'une plus faible organisation de l'azote par les microorganismes du sol pendant la décomposition des résidus de légumineuses par rapport à ceux des céréales.

Nous avons également cherché à caractériser la **contribution des résidus racinaire à l'apport d'azote par minéralisation**. Nos résultats indiquent une plus grande proportion de lignine dans les résidus racinaires par rapport aux résidus aériens des légumineuses (Chapitre 2). Cette plus grande fraction récalcitrante de la biomasse des résidus racinaires engendre une plus grande organisation de l'azote minéral du sol pendant la décomposition des résidus racinaires par rapport aux résidus aériens, malgré des rapports C/N équivalents entre les deux types de résidus. Les prélèvements de racines réalisés au champ ont révélé des quantités d'azote contenues dans les racines inférieures à 5 % de la quantité totale des résidus (aériens et racinaires). Ces résultats suggèrent une contribution négligeable des résidus racinaires par rapport aux résidus aériens, pour l'apport d'azote à la culture suivante. Il est néanmoins important de nuancer ces résultats puisque les prélèvements au champ engendrent souvent une sous-estimation de la quantité d'azote contenue dans les racines compte tenu de la difficulté d'accessibilité du système racinaire dans le sol, notamment dans nos conditions d'expérimentation avec un sol très argileux (> 40 % d'argile). L'expérimentation en pots extérieurs appuie ce constat avec des proportions d'azote dans les résidus racinaires par rapport à l'azote total des résidus de 18 % en moyenne. D'autre part, l'azote rhizodéposé au cours du cycle des légumineuses n'a pas été mesuré dans le cadre de cette thèse. Pourtant, les composés rhizodéposés par les légumineuses, riches en azote, pourraient augmenter le pool d'azote disponible pour la culture suivante et contribuer au surplus d'azote mesuré dans le blé cultivé après les légumineuses par rapport au blé cultivé après des céréales. D'autre part, la nature particulière des composés rhizodéposés par les légumineuses pourrait également engendrer un impact positif indirect sur la culture suivante, par la sélection de communautés microbiennes impliquées dans des processus de biodisponibilité de certains nutriments, ou de compétition vis-à-vis de microorganismes du sol nuisibles pour la culture suivante. Ce flux azoté reste cependant très difficile à estimer et à caractériser.

Malgré l'effet positif des précédents légumineuses sur la culture suivante, des **risques de lixiviation** des nitrates après la culture des légumineuses ont été mis en avant. Au-delà d'une distinction entre légumineuses et céréales, le risque de pertes par lixiviation varie principalement avec la position du cycle des précédents dans l'année relativement aux précipitations entre la récolte des précédents et la période automne-hiver. Une longue période d'interculture, telle que pour les précédents de printemps récoltés en juillet (fenugrec, féverole, lupin, lentille, pois, vesce commune), favorise les risques de lixiviation de l'azote entre la fin de l'été et l'automne, du fait de l'absence de prélèvement d'azote minéral par les cultures, et des précipitations plus fréquentes pendant cette période de l'année. Au contraire, les précédents d'été (haricot, pois chiche, soja et vesce de Narbonne) récoltés entre début et mi-septembre, limitent l'accumulation d'azote dans le sol en maintenant le prélèvement d'azote minéral par leurs racines plus tardivement dans l'année. Ces résultats soulignent

l'importance d'adapter la conduite des systèmes de culture incluant des légumineuses pour valoriser au mieux l'azote fourni par les cultures de légumineuses, en limitant les pertes par lixiviation et en maximisant son utilisation par les cultures suivantes. Ainsi, la mise en place de pratiques agricoles adaptées, telles que l'introduction de couverts végétaux pendant la période d'interculture, notamment en cas d'interculture longue, afin de réduire les risques de pertes d'azote en stockant l'azote minéral disponible avant la mise en place de la culture suivante. Enfin, le choix d'une culture valorisant bien l'azote à l'automne (comme le colza) peut être judicieux pour valoriser au mieux l'azote minéral du sol disponible.

### 1.3. Multifonctionnalité des espèces de légumineuses

La dernière partie de la thèse avait pour objectif de dresser le profil fonctionnel des espèces de légumineuses en étudiant simultanément cinq flux azotés induits au cours de la succession légumineuse – blé, ainsi que les traits de plantes identifiés comme des déterminants de ces flux azotés.

#### **QUESTION 5 : Peut-on identifier différents profils fonctionnels associés aux flux d'azote entre les espèces de légumineuses à graines?**

La prise en compte de cinq flux d'azote étudiés dans le cadre de cette étude a permis de dresser le profil fonctionnel des différentes espèces de légumineuses et de les comparer quant à leur aptitude à fournir plusieurs services écosystémiques tout en limitant les impacts négatifs. Du fait de l'existence d'antagonismes ou de décorrélation entre certains flux azotés, la majorité des espèces de légumineuses ne sont pas à même de fournir simultanément l'ensemble des services écosystémiques escomptés tout en limitant les impacts négatifs.

Nos résultats ont mis en évidence une forte corrélation positive entre la quantité d'azote fixée et la quantité d'azote exportée dans les graines. Ces deux flux azotés étaient positivement associés à la biomasse aérienne totale de la culture, à l'indice de récolte azoté, à la teneur en azote des graines, et au poids moyen d'une graine. Par ailleurs, nos résultats ont mis en avant une décorrélation entre d'une part la quantité d'azote exportée dans les graines et la quantité d'azote fixée, et d'autre part la quantité d'azote dans le blé suivant, ce dernier flux azoté étant positivement corrélée au rapport N/C des résidus de légumineuses. Ces relations indiquent que l'exportation de grandes quantités d'azote par les graines des précédents légumineuses n'engendre pas nécessairement de faibles quantités d'azote dans le blé suivant. De même, d'importantes quantités d'azote fixées par les précédents légumineuses n'engendrent pas nécessairement de grandes quantités d'azote dans le blé suivant. La quantité d'azote dans le blé suivant découle plutôt de la part relative de chacun des deux flux azotés. En effet la différence entre la quantité d'azote fixée et la quantité d'azote exporté par les graines des

précédents légumineuses (ou solde azoté apparent) était positivement associée à la quantité d'azote dans le blé suivant.

Par ailleurs, une relation positive entre la quantité d'azote dans le blé suivant et la quantité d'azote lixiviée entre la récolte des légumineuses et la récolte du blé suivant, a été mise en évidence. Cette relation indique paradoxalement que les espèces après lesquelles les plus grandes pertes par lixiviation ont été calculées, ont engendré les plus grandes quantités d'azote dans le blé suivant. Les fortes pertes d'azote par lixiviation découlent d'une plus grande disponibilité en azote minéral du sol après la récolte des légumineuses combinée à des précipitations fréquentes durant la période automnale. Pour autant, les précédents légumineuses avec les plus grandes pertes d'azote par lixiviation après leur récolte n'engendrent pas de moins grandes quantités d'azote minéral disponibles pour le blé suivant par rapport aux légumineuses avec de plus faibles pertes par lixiviations. En d'autres termes, les pertes d'azote par lixiviation après la récolte des légumineuses sont un manque à gagner en azote pour le blé suivant.

Enfin, une relation négative entre d'une part la quantité d'azote minéral prélevée par les légumineuses durant leur cycle, et d'autre part la quantité d'azote dans le blé suivant et la quantité d'azote lixiviée après la récolte des légumineuses a été mise en évidence. Ainsi, une plus grande capacité de prélèvement d'azote minéral par les précédents légumineuses, en fonction notamment de la vitesse d'expansion latérale de leur système racinaire, limite la disponibilité en azote minéral pour le blé suivant et les quantités d'azote perdues par lixiviation après leur récolte, en limitant certainement le reliquat azoté à la récolte des légumineuses.

L'analyse des corrélations entre les différents flux azotés engendrés par les légumineuses au cours d'une succession de deux ans légumineuse-céréale, nous a permis de caractériser les espèces quant à leur aptitude à fournir des services écosystémiques associés à l'azote et limiter les impacts négatifs lors de leur introduction dans les systèmes de culture. D'autre part, cette étude a permis d'identifier des traits de plantes et propriétés du couvert les plus explicatifs des flux azotés étudiés. Ainsi, la caractérisation des espèces de légumineuses selon une combinaison de traits de plantes, ou profil fonctionnel, permet de classer les espèces selon leur potentiel à fournir des services écosystémiques ou générer des impacts négatifs. Ces profils permettent de distinguer les espèces avec de fortes capacités de prélèvement d'azote minéral pendant leur cycle et de faibles pertes par lixiviation après leur récolte (haricot, pois chiche et soja), par rapport aux espèces avec de plus faibles capacités de prélèvement de l'azote minéral et pour lesquelles il existe de plus grands risques de lixiviation de l'azote (vesce de Narbonne, vesce commune, fenugrec, lentille, pois, lupin, et féverole). Ces dernières espèces ont par contre tendance à engendrer de plus grandes quantités d'azote dans le blé suivant par

rapport au haricot, pois chiche et soja. Enfin la féverole en 2016 et le soja en 2014 présentaient les plus grandes quantités d'azote fixées ainsi que les plus grandes quantités d'azote dans les graines

## 2. Démarches et cadres mobilisés

### 2.1. Recours à l'expérimentation au champ, en conditions contrôlées, et à la modélisation

Cette thèse a reposé sur plusieurs expérimentations menées au champ, complétées par des expérimentations en conditions contrôlées (essai en rhizotron, en pots extérieurs, incubation des résidus de culture), et a mobilisé la modélisation avec l'utilisation du modèle STICS. Chacune de ces approches a permis d'apporter des informations complémentaires sur la quantification et la compréhension des déterminants des flux azotés induits par les cultures de légumineuses. Il est cependant important de souligner les limites de chacune de ces approches à prendre en considération

#### *2.1.1. Mise en place d'essais au champ pluriannuels*

L'acquisition de références quant aux flux azotés induits par les différentes espèces de légumineuses s'est basée sur deux essais au champ bisannuels. Les deux répétitions climatiques et l'unique localisation géographique (domaine expérimental de Bretenièrre) sont loin d'assurer la généralité des résultats pour d'autres conditions pédoclimatiques. Néanmoins, les flux azotés ont été mesurés dans des conditions climatiques très contrastées notamment entre les premières années de chacune des expérimentations. En effet, l'année 2014 a été caractérisée par un printemps très sec et un été pluvieux tandis que l'année 2016 a été caractérisée par un printemps extrêmement pluvieux et un été chaud et sec.

L'objectif n'est cependant pas d'étendre ce dispositif expérimental à un grand nombre de situations géographiques, d'autant plus que les mesures de flux azotés réalisés une année donnée n'assurent pas la transposition des résultats à d'autres années climatiques. Pour autant, la mesure de traits de plantes ou propriétés du couvert nous ont permis d'acquérir une plus grande compréhension sur les déterminants des flux azotés et d'étudier l'effet des conditions climatiques sur les traits de plantes et les flux d'azote associés. Ainsi, il s'agit surtout de déterminer si les relations établies dans cette thèse entre les traits de plantes ou propriétés du couvert et les flux azotés sont maintenues dans différentes conditions pédoclimatiques.

La mobilisation de différents essais expérimentaux conduits chez des agriculteurs dans le cadre du projet ANR LEGITIMES, dont l'objectif était de construire et d'évaluer des scénarios territoriaux d'insertion de légumineuses dans les systèmes de culture pour répondre aux changements globaux,

peut contribuer à étendre la gamme de références à un plus grand nombre de situations agricoles. En effet, dans trois régions de France (Pays de la Loire, Midi-Pyrénées et Bourgogne) des essais bisannuels avec certaines des espèces de légumineuses mobilisées dans le cadre de cette thèse ont été conduits avec en première année la légumineuse suivie par une culture de céréale en seconde année. Plusieurs flux azotés, tels que la fixation symbiotique et le prélèvement d'azote minéral par les légumineuses ainsi que les performances de la culture suivante selon le précédent culturaux, ont été mesurés, mais de façon moins précise que dans notre étude, et sur un nombre restreint d'espèces dans chaque situation. De même, des propriétés du couvert simples ont également été mesurées sur les parties aériennes et correspondent pour quelques-unes à celles identifiées comme explicatives des différents flux azotés. Il serait donc intéressant de regrouper l'ensemble de ces données afin de valider ou non certaines des relations que nous avons établies entre les traits de plantes ou propriétés du couvert et les flux azotés et déterminer si les synergies et les antagonismes entre les flux azotés sont maintenus.

### *2.1.2. Traits racinaires mesurés en conditions contrôlées*

Le recours à des essais en serre a permis de mesurer finement des traits racinaires dont la mesure s'avère bien plus compliquée en conditions au champ du fait de la difficulté d'accessibilité du système racinaire dans le sol. L'essai en rhizotron a notamment rendu possible un suivi du système racinaire au cours du temps afin de mesurer de la vitesse d'expansion racinaire en largeur et en profondeur. Se pose alors la question d'extrapolation des mesures effectuées en rhizotrons pour des plantes cultivées champ. En rhizotrons, les racines sont soumises à un environnement relativement homogène en termes de répartition des nutriments et de l'eau, de contraintes physiques, avec une flore microbienne très faible voire absente. Au champ, la structure du sol, la répartition hétérogène des nutriments et de l'eau ainsi que la diversité microbienne peuvent fortement influencer le développement racinaire et son architecture. Malgré tout, l'essai en rhizotrons donne des indications quant au potentiel de croissance racinaire et permet de comparer les différentes espèces de légumineuses dans une même situation. D'autre part, la vitesse d'expansion latérale du système racinaire mesurée en rhizotrons a pu être positivement reliée à l'efficacité d'utilisation du fertilisant azoté mesuré au champ en 2014 (Chapitre 1), mais également à la quantité d'azote issue du prélèvement d'azote minéral du sol dans les parties aériennes des légumineuses, pour les deux années d'expérimentation au champ (2014 et 2016) en l'absence de fertilisation azotée (Chapitre 4). Ce résultat est par ailleurs appuyé par la relation établie par Dayoub et al. (2017) sur plusieurs espèces de légumineuses, entre la vitesse d'élongation latérale du système racinaire et la quantité d'azote minéral prélevée lors d'un essai en rhizotrons, au cours duquel les deux variables ont été mesurées.

### *2.1.3. Quantification des flux azotés au moyen de l'incubation des résidus et de la modélisation*

Certains flux azotés, tels que la minéralisation de l'azote des résidus et les pertes d'azote par lixiviation sont également difficilement quantifiables au champ. La quantification de la minéralisation de l'azote des résidus de culture requiert des techniques de marquage au  $^{15}\text{N}$  des résidus afin de déterminer la répartition de l'azote issu de leur minéralisation entre différents compartiments : sol, culture suivante, eau drainée. La quantification des pertes azotées par lixiviation nécessite l'installation de plaques lysimétriques afin de mesurer la quantité d'eau drainée et sa concentration en nitrates. Cependant la mise en place et le suivi de ces dispositifs expérimentaux demande un investissement en temps et en matériel ainsi qu'un coût analytique très important.

Afin de répondre à ces limitations, des incubations de résidus en conditions contrôlées ont été réalisées afin de suivre la dynamique de minéralisation de l'azote des résidus. Les incubations ne reflètent pas les conditions de minéralisation de l'azote des résidus en condition au champ, mais elles donnent des informations quant au potentiel de minéralisation des résidus en conditions d'humidité du sol et d'azote minéral non limitantes, et de température optimale, ce qui permet de comparer les différents résidus de légumineuses en s'affranchissant des biais et des difficultés de mesures liées au champ. D'autre part, les analyses biochimiques des résidus incubés nous ont permis d'identifier les caractéristiques des résidus les plus explicatives du potentiel de minéralisation des résidus.

Dans un second temps, des simulations ont été réalisées avec le modèle de culture STICS afin d'estimer la minéralisation des résidus aériens en conditions au champ ainsi que les quantités d'azote lixiviées entre la récolte des précédents culturaux et la récolte du blé suivant, en prenant en compte les conditions pédoclimatiques réelles. Malheureusement le modèle n'a pas pu être directement évalué quant à sa capacité à correctement simuler ces deux flux azotés, du fait de l'absence de mesure de ces flux au champ. Pour autant, une évaluation indirecte sur des variables qui affectent les deux flux azotés, a été réalisée. L'évaluation a porté sur la quantité d'eau et d'azote minéral dans le sol, qui influencent i) la dynamique de minéralisation des résidus, ii) la quantité d'eau drainée sous la profondeur d'enracinement et iii) la concentration en nitrates de cette lame drainante. Par ailleurs, le taux de minéralisation de l'azote des résidus dans le modèle STICS est entièrement basé sur le rapport C/N des résidus. Lors des incubations en conditions contrôlées, cette caractéristique des résidus a préalablement été identifiée comme la plus explicative des quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus. Ainsi, même si le modèle STICS ne prend pas en compte certaines caractéristiques de résidus à l'origine d'effets secondaires sur la minéralisation des résidus (proportion de cellulose, de composés solubles, de lignine,...) il permet de rendre compte des principales différences de minéralisation des résidus de culture entre espèces de légumineuses.

## 2.2. Mobilisation de l'approche traits - fonctions- services écosystémiques

### 2.2.1. *Elargir les services écosystémiques évalués*

Nous avons fait le choix de centrer cette thèse sur certains services écosystémiques relatifs aux flux azotés induits par les cultures légumineuses. D'autres services écosystémiques non étudiés dans le cadre de cette thèse, qui découlent de fonctions en lien avec le cycle de l'azote ou non, sont susceptibles d'être fournis par les légumineuses à graines. Les légumineuses sont souvent mises en avant pour leurs faibles émissions de N<sub>2</sub>O et de CO<sub>2</sub> et donc pour leur contribution à la régulation des émissions de gaz à effet de serre par rapport à des céréales fertilisées. Les faibles émissions de gaz à effet de serre pendant le cycle des légumineuses sont notamment associées à l'absence de fertilisation azotée en comparaison aux cultures de céréales (Carroué et al., 2012; Lemke et al., 2007). Suite à l'incorporation des résidus de légumineuses dans le sol, des quantités d'azote minéral sont libérées et sont susceptibles de produire du N<sub>2</sub>O. Des différences entre espèces selon la richesse en azote des résidus peuvent donc être envisagées.

Par ailleurs, l'intégration des légumineuses dans les systèmes de culture peut contribuer à la régulation des bioagresseurs par le levier de la diversification des cultures et ainsi réduire le recours aux produits phytosanitaires à l'échelle du système de culture. A l'échelle de la culture, les légumineuses à graines sont au contraire souvent considérées comme peu compétitives vis-à-vis des adventices (Corre-Hellou and Crozat, 2005; McDonald, 2003). Caractériser les différentes espèces de légumineuses à graines selon leur capacité à être compétitives vis-à-vis des adventices aussi bien au niveau aérien (compétition pour la lumière) que souterrain (compétition pour les nutriments et l'eau dans le sol) pourrait être intéressant à considérer.

Enfin, de grandes interrogations persistent sur l'effet des légumineuses sur la diversité microbienne du sol notamment via le processus de rhizodéposition.

### 2.2.2. *Elargir l'approche fonctionnelle pour l'étude de systèmes agricoles*

Dans le cadre de cette thèse, nous avons mobilisé l'approche fonctionnelle, en cherchant à caractériser les espèces de légumineuses par des traits de plantes ou propriétés de couvert directement impliqués dans l'obtention de flux azotés. Contrairement à de nombreuses études menées en écologie, nous n'avons pas focalisé notre étude sur des traits fonctionnels *sensu stricto* (de Bello et al., 2010; Lavorel et al., 2011; Pérez-Harguindeguy et al., 2013; Prieto et al., 2015), c'est-à-dire des traits de plantes qui impactent indirectement la fitness d'une espèce (c.à.d. la capacité de croissance, de reproduction et de survie) en affectant des traits de performances (Violle et al., 2007). En effet, nous avons mobilisé des traits de plantes ou propriétés de couverts au sens large, c'est-à-dire toute caractéristique morphologique, physiologique et phénologique mesurée à l'échelle de l'individu (ou du couvert pour

les propriétés de couvert). Malgré le fait que certains de ces traits ou propriétés ne soient pas considérés comme des indicateurs directs du fonctionnement de la plante, il nous a semblé essentiel de les intégrer compte tenu de leur importance dans la compréhension des flux azotés induits par les cultures de légumineuses. Il s'agit notamment de propriétés du couvert très souvent mesurées en agronomie, tel que la biomasse aérienne par unité de surface de sol ou encore de l'indice de récolte azoté. Certaines études ayant mobilisé le cadre de l'écologie fonctionnelle appliquée à l'agronomie ont également fait ce choix (Damour et al., 2014).

Par ailleurs, dans le cadre de l'approche fonctionnelle, seuls les traits de plantes sont considérés afin d'appréhender les fonctions et les services écosystémiques qui en découlent. Pourtant, dans les écosystèmes agricoles, les pratiques agricoles modulent également grandement le fonctionnement de l'écosystème et donc les services écosystémiques ou les impacts négatifs qui en découlent (Power, 2010). Les pratiques peuvent indirectement modifier le fonctionnement de l'écosystème en sélectionnant et en affectant des traits de plantes impliqués dans l'obtention de fonctions écologiques. Ces pratiques sont alors indirectement prises en compte via la mesure des traits de plantes qu'elles impactent. Pour autant, des pratiques agricoles peuvent également directement moduler certaines fonctions écologiques. Par exemple, les pertes d'azote par lixiviation pendant la période d'interculture sont en partie fonction de la durée de cette interculture. Ainsi certaines « caractéristiques de conduite » des cultures, telles que le choix de la date de semis de la culture suivante, peuvent être directement pertinentes dans l'obtention de services écosystémiques, ou pour limiter les impacts négatifs dans notre exemple. Dans le cas de la caractérisation des plantes constitutives des systèmes de culture, l'intégration de ces « caractéristiques de conduite » dans l'approche fonctionnelle peut s'avérer intéressante pour une meilleure compréhension de leur fonctionnement et de leurs performances, ainsi que pour l'identification de techniques culturales à associer pour l'obtention ou l'augmentation des services attendus.

### **3. Favoriser la réintroduction des légumineuses à graines comme culture de diversification dans les systèmes de culture**

#### **3.1. Apporter des références techniques nécessaires à la réintroduction des légumineuses à graines**

Dans le cas des espèces mineures (ou de diversification), des références techniques indispensables pour la réintroduction de ces cultures dans les systèmes de culture, et mobilisables par les agriculteurs, sont souvent partielles ou manquantes par rapport aux cultures majeures (Meynard et al., 2013). Des références sont notamment attendues sur la conduite des cultures, mais également sur leur « effet

précédent » et sur les causes d'accidents de rendement afin d'adapter les pratiques culturales et maximiser les potentiels bénéfiques de ces cultures.

### 3.1.1. Assurer la croissance des légumineuses

Les services écosystémiques délivrés par les légumineuses nécessitent d'assurer un développement optimal de celles-ci. Pour y parvenir la maîtrise technique de ces cultures est indispensable.

Dans le cas des légumineuses, la croissance est conditionnée par une fixation symbiotique efficiente, nécessitant la présence de *Rhizobium* dans le sol. Ainsi, l'inoculation peut être un élément clé de la réussite de la culture de légumineuse, en assurant la fixation symbiotique (ANNEXE 1).

Plusieurs études soulignent l'importance d'inoculer le soja (Salvagiotti et al., 2008) du fait de l'absence naturelle de la souche *Bradyrhizobium japonicum* dans les sol français (Crozat et al., 1994), et le lupin en cas de pH élevé ou quand aucune culture de lupin n'a été récemment cultivée sur la parcelle (Amarger et al., 1983). En France, pour les autres espèces de légumineuses, aucune inoculation n'est en général effectuée. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'inoculer avec des souches préalablement sélectionnées pour leur efficacité en prenant également en compte leur compétitivité (Bourion et al., 2018). Notre étude montre qu'une attention particulière doit être apportée à l'association entre le génotype de pois chiche et la souche bactérienne spécifique.

Face à des cultures de diversification, le choix de la variété et de la date de semis la plus adaptée pour assurer une bonne croissance de la culture peut s'avérer compliqué par manque de références régionalisées. Dans le cadre de cette thèse, ces choix ont reposé sur l'expertise technique des fournisseurs de semences et de conseillers agricoles. Cependant, pour quelques espèces de légumineuses, la région d'étude (Bourgogne) et le type d'utilisation (production de graines) s'éloignaient de leur territoire de production ou de leur utilisation principale. En effet, le pois chiche est principalement cultivé en France sur le pourtour méditerranéen. La vesce commune, la vesce de Narbonne ainsi que le fenugrec sont majoritairement utilisés comme plante de service. Ainsi pour ces espèces, le choix de la date de semis a reposé sur les quelques connaissances acquises dans d'autres régions françaises, pas toujours adaptées à la région Bourgogne. Suite à l'essai en champ en 2014, la date de semis du fenugrec a été modifiée en 2016 (mai en 2014 et mars en 2016). A posteriori, suite à des expérimentations additionnelles menées au domaine expérimental de Bretenière, il semble que le pois chiche, aurait pu être semé plus précocement par rapport aux dates choisies dans le cadre de notre étude.

Ces quelques exemples soulignent l'importance i) de références techniques régionalisées afin de répondre aux lacunes techniques autour d'espèces « mineures » comme les légumineuses, et ii) de la

phase d'apprentissage inhérente à leur réinsertion dans les systèmes de cultures actuels (Meynard et al., 2013).

### 3.2. L'introduction des légumineuses nécessite une gestion de l'azote à l'échelle des systèmes de culture

Afin de valoriser au mieux les services écosystémiques relatifs à l'azote fournis par les légumineuses, il est nécessaire d'avoir une gestion intégrée de l'azote à l'échelle du système de culture. En effet, l'insertion des légumineuses dans les systèmes de culture n'est pas à considérer comme un simple ajout ou substitution d'une culture dans la rotation, puisqu'elles affectent la fourniture d'azote au sol, avec des conséquences en termes de gestion de la fertilisation azotée à l'échelle de l'ensemble du système. Cette étude contribue à donner des indications génériques sur les techniques culturales à associer pour valoriser les flux azotés générés par les cultures de légumineuses.

La gestion de l'azote dans le système de culture à base de légumineuses devrait se raisonner avant même l'introduction des légumineuses de manière à favoriser la fixation symbiotique des légumineuses au détriment du prélèvement d'azote minéral. Chercher à limiter des reliquats azotés élevés au moment du semis des légumineuses permet de maximiser l'entrée d'azote par la voie symbiotique ; pour y parvenir, il est essentiel de raisonner le choix du précédent cultural et la fertilisation azotée de ce dernier.

Par ailleurs, après la récolte des légumineuses, l'objectif est de maximiser le prélèvement de l'azote apporté par les légumineuses par la culture suivante tout en limitant les pertes d'azote par lixiviation. La mise en place de couverts après la récolte des légumineuses peut constituer un levier de gestion de l'azote adapté, en limitant les pertes par lixiviation, surtout en cas d'interculture longue. Il est également indispensable de chercher à synchroniser l'apport d'azote par les légumineuses avec la demande en azote de la culture suivante. La caractérisation de la culture suivante quant à son aptitude à valoriser l'azote après les cultures de légumineuses, par l'identification et la mesure de traits de plantes et de « caractéristiques de conduite » (date de semis par exemple) impliqués dans cette valorisation, pourrait s'avérer une piste intéressante.

Par ailleurs, il est indispensable de raisonner la fertilisation azotée de la culture suivante afin de maximiser l'effet précédent des légumineuses. Raisonner la fertilisation azotée a priori, en se basant sur certains traits de plantes, tel que le C/N des résidus, peut s'avérer délicat puisqu'il donne une indication sur la quantité d'azote potentiellement disponible et non sur la quantité d'azote valorisée par la culture suivante. Aujourd'hui, de nouvelles méthodes sont en cours de développement de manière à ajuster au mieux la fertilisation azotée du blé d'hiver par un suivi régulier de son indice de

nutrition azotée (Ravier et al., 2017). Grâce à ces méthodes, la fertilisation de la culture suivante selon le précédent légumineuse pourrait être raisonnée selon l'indice de nutrition azotée qui intègre directement l'azote fourni par le précédent cultural.



## Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Abera, G., Wolde-Meskel, E., and Bakken, L. R. (2012). Carbon and nitrogen mineralization dynamics in different soils of the tropics amended with legume residues and contrasting soil moisture contents. *Biol. Fertil. Soils* **48**, 51-66.
- Abiven, S., Recous, S., Reyes, V., and Oliver, R. (2005). Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residues in soil and role of their biochemical quality. *Biol. Fertil. Soils* **42**, 119.
- Agreste (2018). Utilisation du territoire. <https://stats.agriculture.gouv.fr/disar-web/disaron/%21searchurl/searchUiid/search.disar>. Accessed 21 November 2018
- Agreste (2017). Protéagineux - Campagnes 1993-1994 à 2016-2017. <http://agreste.agriculture.gouv.fr/donnees-de-synthese/bilans-d-apvisionnement/cereales-riz-pomme-de-terre/proteagineux/>. Accessed 10 December 2018.
- Al Haj Khaled, R., Duru, M., Decruyenaere, V., Jouany, C., and Cruz, P. (2006). Using leaf traits to rank native grasses according to their nutritive value. *Rangel. Ecol. Manag.* **59**, 648-654.
- Altieri, M. A. (1989). Agroecology: A new research and development paradigm for world agriculture. In "Agricultural Ecology and Environment", pp. 37-46. Elsevier.
- Amarger, N. (1981). Selection of Rhizobium strains on their competitive ability for nodulation. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 481-486.
- Amarger, N., Duthion, C., Devroe, C., and Sixdenier, G. (1983). Effets de l'inoculation par Rhizobium et de la fertilisation azotée sur les rendements et la teneur en azote des graines de lupin (*Lupinus albus*, *L. mutabilis*, *L. luteus*). *Agronomie* **3**, 995-1000.
- Andrews, M., Lea, P. J., Raven, J. A., and Azevedo, R. A. (2009). Nitrogen use efficiency. 3. Nitrogen fixation: genes and costs. *Ann. Appl. Biol.* **155**, 1-13.
- Anglade, J., Billen, G., and Garnier, J. (2015). Relationships for estimating N<sub>2</sub> fixation in legumes: incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. *Ecosphere* **6**, 1-24.
- Angus, J. F., Kirkegaard, J. A., Hunt, J. R., Ryan, M. H., Ohlander, L., and Peoples, M. B. (2015). Break crops and rotations for wheat. *Crop Pasture Sci.* **66**, 523-552.
- Angus, J. F., and Van Herwaarden, A. F. (2001). Increasing water use and water use efficiency in dryland wheat. *Agron. J.* **93**, 290-298.
- Armstrong, E. L., Heenan, D. P., Pate, J. S., and Unkovich, M. J. (1997). Nitrogen benefits of lupins, field pea, and chickpea to wheat production in south-eastern Australia. *Aust. J. Agric. Res.* **48**, 39-48.
- Armstrong, E. L., Pate, J. S., and Unkovich, M. J. (1994). Nitrogen balance of field pea crops in South Western Australia, studied using the <sup>15</sup>N natural abundance technique. *Funct. Plant Biol.* **21**, 533-549.
- Aulen, M., Shipley, B., and Bradley, R. (2011). Prediction of in situ root decomposition rates in an interspecific context from chemical and morphological traits. *Ann. Bot.* **109**, 287-297.

- Beaudoin, N., Launay, M., Sauboua, E., Ponsardin, G., and Mary, B. (2008). Evaluation of the soil crop model STICS over 8 years against the “on farm” database of Bruyères catchment. *Eur. J. Agron.* **29**, 46-57.
- Beaudoin, N., Saad, J. K., Van Laethem, C., Machet, J. M., Maucorps, J., and Mary, B. (2005). Nitrate leaching in intensive agriculture in Northern France: Effect of farming practices, soils and crop rotations. *Agric. Ecosyst. Environ.* **111**, 292-310.
- Bedoussac, L., and Justes, E. (2010). The efficiency of a durum wheat-winter pea intercrop to improve yield and wheat grain protein concentration depends on N availability during early growth. *Plant Soil* **330**, 19-35.
- Benjamin, J. G., and Nielsen, D. C. (2006). Water deficit effects on root distribution of soybean, field pea and chickpea. *Field Crop. Res.* **97**, 248-253.
- Bennett, A. J., Bending, G. D., Chandler, D., Hilton, S., and Mills, P. (2012). Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biol. Rev.* **87**, 52-71.
- Bennett, E. M., Peterson, G. D., and Gordon, L. J. (2009). Understanding relationships among multiple ecosystem services. *Ecol. Lett.* **12**, 1394-1404.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., and Recous, S. (2006). Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant Soil* **281**, 291-307.
- Biederbeck, V. O., Bouman, O. T., Campbell, C. A., Winkleman, G. E., and Bailey, L. D. (1996). Nitrogen benefits from four green-manure legumes in dryland cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* **76**, 307-315.
- Bommarco, R., Kleijn, D., and Potts, S. G. (2013). Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends Ecol. Evol.* **28**, 230-238.
- Bordeleau, L. M., and Prévost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* **161**, 115-125.
- Bourion, V., Heulin-Gotty, K., Aubert, V., Tisseyre, P., Chabert-Martinello, M., Pervent, M., Delaitre, C., Vile, D., Siol, M., and Duc, G. (2018). Co-inoculation of a pea core-collection with diverse rhizobial strains shows competitiveness for nodulation and efficiency of nitrogen fixation are distinct traits in the interaction. *Front. Plant Sci.* **8**, 2249.
- Bourion, V., Laguerre, G., Depret, G., Voisin, A.-S., Salon, C., and Duc, G. (2007). Genetic variability in nodulation and root growth affects nitrogen fixation and accumulation in pea. *Ann. Bot.* **100**, 589-598.
- Brisson, N., Gary, C., Justes, E., Roche, R., Mary, B., Ripoche, D., Zimmer, D., Sierra, J., Bertuzzi, P., and Burger, P. (2003). An overview of the crop model STICS. *Eur. J. Agron.* **18**, 309-332.
- Byrnes, J. E. K., Gamfeldt, L., Isbell, F., Lefcheck, J. S., Griffin, J. N., Hector, A., Cardinale, B. J., Hooper, D. U., Dee, L. E., and Emmett Duffy, J. (2014). Investigating the relationship between biodiversity and ecosystem multifunctionality: challenges and solutions. *Methods Ecol. Evol.* **5**, 111-124.

- Carroué, B., Scheider, A., Flénet, F., Jeuffroy, M. H., and Nemecek, T. (2012). Introduction of dry pea crop in rotation of cereals and rapeseed: impact on the economic and environmental performances. *Innov. Agron.* **25**, 125-142.
- Carton, N., Naudin, C., Piva, G., Baccar, R., and Corre-Hellou, G. (2018). Differences for traits associated with early N acquisition in a grain legume and early complementarity in grain legume–triticale mixtures. *Aob Plants* **10**, ply001.
- Cassigneul, A., Alletto, L., Benoit, P., Bergheaud, V., Etievant, V., Dumény, V., Le Gac, A.-L., Chuette, D., Rumpel, C., and Justes, E. (2015). Nature and decomposition degree of cover crops influence pesticide sorption: quantification and modelling. *Chemosphere* **119**, 1007-1014.
- Cernay, C., Makowski, D., and Pelzer, E. (2017). Preceding cultivation of grain legumes increases cereal yields under low nitrogen input conditions. *Environ. Chem. Lett.*, 1-6.
- Cernay, C., Pelzer, E., and Makowski, D. (2016). A global experimental dataset for assessing grain legume production. *Sci. Data.* **3**, 160084.
- Cernay, C., Ben-Ari, T., Pelzer, E., Meynard, J.-M., and Makowski, D. (2015). Estimating variability in grain legume yields across Europe and the Americas. *Sci Rep* **5**.
- Chalifour, F. P., and Nelson, L. M. (1988). Effects of time of nitrate application on nitrate reductase activity, nitrate uptake, and symbiotic dinitrogen fixation in faba bean and pea. *Can. J. Bot.* **66**, 1646-1652.
- Chaudhary, M. I., Adu-Gyamfi, J. J., Saneoka, H., Nguyen, N. T., Suwa, R., Kanai, S., El-Shemy, H. A., Lightfoot, D. A., and Fujita, K. (2008). The effect of phosphorus deficiency on nutrient uptake, nitrogen fixation and photosynthetic rate in mashbean, mungbean and soybean. *Acta Physiol. Plant.* **30**, 537-544.
- Chaves, B., De Neve, S., Hofman, G., Boeckx, P., and Van Cleemput, O. (2004). Nitrogen mineralization of vegetable root residues and green manures as related to their (bio) chemical composition. *Eur. J. Agron.* **21**, 161-170.
- Cober, E. R., Stewart, D. W., and Voldeng, H. D. (2001). Photoperiod and temperature responses in early-maturing, near-isogenic soybean lines. *Crop Sci.* **41**, 721-727.
- Constantin, J., Beaudoin, N., Launay, M., Duval, J., and Mary, B. (2012). Long-term nitrogen dynamics in various catch crop scenarios: Test and simulations with STICS model in a temperate climate. *Agric. Ecosyst. Environ.* **147**, 36-46.
- Corre-Hellou, G., Brisson, N., Launay, M., Fustec, J., and Crozat, Y. (2007). Effect of root depth penetration on soil nitrogen competitive interactions and dry matter production in pea–barley intercrops given different soil nitrogen supplies. *Field Crop. Res.* **103**, 76-85.
- Corre-Hellou, G., Fustec, J., and Crozat, Y. (2006). Interspecific competition for soil N and its interaction with N<sub>2</sub> fixation, leaf expansion and crop growth in pea–barley intercrops. *Plant Soil* **282**, 195-208.
- Corre-Hellou, G., and Crozat, Y. (2005). N<sub>2</sub> fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). *Eur. J. Agron.* **22**, 449-458.

- Coucheney, E., Buis, S., Launay, M., Constantin, J., Mary, B., de Cortázar-Atauri, I. G., Ripoche, D., Beaudoin, N., Ruget, F., and Andrianarisoa, K. S. (2015). Accuracy, robustness and behavior of the STICS soil–crop model for plant, water and nitrogen outputs: evaluation over a wide range of agro-environmental conditions in France. *Environ. Modell. Softw.* **64**, 177-190.
- Couëdel, A., Alletto, L., Tribouillois, H., and Justes, É. (2018). Cover crop crucifer-legume mixtures provide effective nitrate catch crop and nitrogen green manure ecosystem services. *Agric. Ecosyst. Environ.* **254**, 50-59.
- Covell, S., Ellis, R. H., Roberts, E. H., and Summerfield, R. J. (1986). The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes: I. A comparison of chickpea, lentil, soyabean and cowpea at constant temperatures. *J. Exp. Bot.* **37**, 705-715.
- Crews, T. E., and Peoples, M. B. (2005). Can the synchrony of nitrogen supply and crop demand be improved in legume and fertilizer-based agroecosystems? A review. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **72**, 101-120.
- Crews, T. E., and Peoples, M. B. (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* **102**, 279-297.
- Crozat, Y., Aveline, A., Coste, F., Gillet, J. P., and Domenach, A.-M. (1994). Yield performance and seed production pattern of field-grown pea and soybean in relation to N nutrition. *Eur. J. Agron.* **3**, 135-144.
- Cruz, P., Duru, M., Therond, O., Theau, J. P., Ducourtieux, C., Jouany, C., Al Haj Khaled, R., and Ansquer, P. (2002). Une nouvelle approche pour caractériser les prairies naturelles et leur valeur d'usage. *Fourrages* **172**, 335-354.
- Curran, J. (2012). The nutritional value and health benefits of pulses in relation to obesity, diabetes, heart disease and cancer. *Br. J. Nutr.* **108**, S1-S2.
- Damour, G., Garnier, E., Navas, M. L., Dorel, M., and Risède, J. M. (2015). Chapter Three-Using Functional Traits to Assess the Services Provided by Cover Plants: A Review of Potentialities in Banana Cropping Systems. *Adv. Agron.* **134**, 81-133.
- Damour, G., Dorel, M., Quoc, H. T., Meynard, C., and Risède, J.-M. (2014). A trait-based characterization of cover plants to assess their potential to provide a set of ecological services in banana cropping systems. *Eur. J. Agron.* **52**, 218-228.
- Dayoub, E., Naudin, C., Piva, G., Shirliffe, S. J., Fustec, J., and Corre-Hellou, G. (2017). Traits affecting early season nitrogen uptake in nine legume species. *Heliyon* **3**, e00244.
- de Bello, F., Lavorel, S., Díaz, S., Harrington, R., Cornelissen, J. H. C., Bardgett, R. D., Berg, M. P., Cipriotti, P., Feld, C. K., and Hering, D. (2010). Towards an assessment of multiple ecosystem processes and services via functional traits. *Biodivers. Conserv.* **19**, 2873-2893.
- De Willigen, P. (1991). Nitrogen turnover in the soil-crop system; comparison of fourteen simulation models. *Fertil. Res.* **27**, 141-149.
- Decourtye, A., Lecompte, P., Pierre, J., Chauzat, M.-P., and Thiébeau, P. (2007). Introduction de jachères florales en zones de grandes cultures: comment mieux concilier agriculture, biodiversité et apiculture? *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* **54**, 33-56.

- Dejoux, J.-F., Meynard, J.-M., Reau, R., Roche, R., and Saulas, P. (2003). Evaluation of environmentally-friendly crop management systems based on very early sowing dates for winter oilseed rape in France. *Agronomie* **23**, 725-736.
- Den Herder, G., Van Isterdael, G., Beeckman, T., and De Smet, I. (2010). The roots of a new green revolution. *Trends Plant Sci.* **15**, 600-607.
- Derrien, D., Plain, C., Courty, P.-E., Gelhay, L., Moerdijk-Poortvliet, T. C. W., Thomas, F., Versini, A., Zeller, B., Koutika, L.-S., and Boschker, H. T. S. (2014). Does the addition of labile substrate destabilise old soil organic matter? *Soil Biol. Biochem.* **76**, 149-160.
- Devienne-Barret, F., Justes, E., Machet, J. M., and Mary, B. (2000). Integrated control of nitrate uptake by crop growth rate and soil nitrate availability under field conditions. *Ann. Bot.* **86**, 995-1005.
- Dobert, R. C., and Blevins, D. G. (1993). Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Plant Soil* **148**, 11-19.
- Doré, T., Makowski, D., Malézieux, E., Munier-Jolain, N., Tchamitchian, M., and Tittone, P. (2011). Facing up to the paradigm of ecological intensification in agronomy: revisiting methods, concepts and knowledge. *Eur. J. Agron.* **34**, 197-210.
- Duc, G., Mignolet, C., Carrouée, B., and Huyghe, C. (2010). Importance économique passée et présente des légumineuses: Rôle historique dans les assolements et les facteurs d'évolution. *Innov. Agron.* **11**, 1-24.
- Dunbabin, V., Diggle, A., and Rengel, Z. (2003). Is there an optimal root architecture for nitrate capture in leaching environments? *Plant Cell Environ.* **26**, 835-844.
- Duthion, C., Ney, B., and Munier-Jolain, N. M. (1994). Development and growth of white lupin: implications for crop management. *Agron. J.* **86**, 1039-1045.
- EFSE (2017). "Rapport sur Le cadre conceptuel de l'EFSE l'évaluation française des écosystèmes et des services écosystémiques." Théma Avril 2017.
- Espinoza, S., Ovalle, C., Zagal, E., Matus, I., Tay, J., Peoples, M. B., and del Pozo, A. (2012). Contribution of legumes to wheat productivity in Mediterranean environments of central Chile. *Field Crop. Res.* **133**, 150-159.
- Evans, J., McNeill, A. M., Unkovich, M. J., Fettell, N. A., and Heenan, D. P. (2001). Net nitrogen balances for cool-season grain legume crops and contributions to wheat nitrogen uptake: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* **41**, 347-359.
- Evans, J., O'Connor, G. E., Turner, G. L., Coventry, D. R., Fettell, N., Mahoney, J., Armstrong, E. L., and Walscott, D. N. (1989). N<sub>2</sub> fixation and its value to soil N increase in lupin, field pea and other legumes in south-eastern Australia. *Aust. J. Agric. Res.* **40**, 791-805.
- Evans, J., O'Connor, G. E., Turner, G. L., and Bergersen, F. J. (1987a). Influence of mineral nitrogen on nitrogen fixation by lupin (*Lupinus angustifolius*) as assessed by <sup>15</sup>N isotope dilution methods. *Field Crop. Res.* **17**, 109-120.
- Evans, J., Turner, G. L., O'Connor, G. E., and Bergersen, F. J. (1987b). Nitrogen fixation and accretion of soil nitrogen by field-grown lupins (*Lupinus angustifolius*). *Field Crop. Res.* **16**, 309-322.

- Fageria, N. K., Melo, L. C., and Carvalho, M. C. S. (2015). Influence of Nitrogen on Growth, Yield, and Yield Components and Nitrogen Uptake and Use Efficiency in Dry Bean Genotypes. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **46**, 2395-2410.
- Fan, J., McConkey, B., Wang, H., and Janzen, H. (2016). Root distribution by depth for temperate agricultural crops. *Field Crop. Res.* **189**, 68-74.
- Felton, W. L., Marcellos, H., Alston, C., Martin, R. J., Backhouse, D., Burgess, L. W., and Herridge, D. F. (1998). Chickpea in wheat-based cropping systems of northern New South Wales. II. Influence on biomass, grain yield, and crown rot in the following wheat crop. *Aust. J. Agric. Res.* **49**, 401-408.
- Fillery, I. R. P. (2001). The fate of biologically fixed nitrogen in legume-based dryland farming systems: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* **41**, 361-381.
- Fox, R. H., Myers, R. J. K., and Vallis, I. (1990). The nitrogen mineralization rate of legume residues in soil as influenced by their polyphenol, lignin, and nitrogen contents. *Plant Soil* **129**, 251-259.
- FranceAgrimer (2018). Statistiques sur les surfaces, productions et rendements en céréales et oléoprotéagineux. <https://visionet.franceagrimer.fr/Pages/Statistiques.aspx?menuurl=Statistiques/productions%20v%C3%A9g%C3%A9tales/grandes%20cultures/surfaces,productions,rendements>. Accessed 12 December 2018.
- Frankenberger, W., and Abdelmagid, H. (1985). Kinetic parameters of nitrogen mineralization rates of leguminous crops incorporated into soil. *Plant Soil* **87**, 257-271.
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., and Cliquet, J. B. (2010). Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **30**, 57-66.
- Gaba, S., Lescourret, F., Boudsocq, S., Enjalbert, J., Hinsinger, P., Journet, E.-P., Navas, M.-L., Wery, J., Louarn, G., and Malézieux, E. (2015). Multiple cropping systems as drivers for providing multiple ecosystem services: from concepts to design. *Agron. Sustain. Dev.* **35**, 607-623.
- Gaba, S., Bretagnolle, F., Rigaud, T., and Philippot, L. (2014). Managing biotic interactions for ecological intensification of agroecosystems. *Front. Ecol. Environ.* **2**, 29.
- Gan, Y. T., Hamel, C., O'Donovan, J. T., Cutforth, H., Zentner, R. P., Campbell, C. A., Niu, Y., and Poppy, L. (2015). Diversifying crop rotations with pulses enhances system productivity. *Sci Rep* **5**, 14625.
- Gan, Y. T., Miller, P. R., McConkey, B. G., Zentner, R. P., Stevenson, F. C., and McDonald, C. L. (2003). Influence of diverse cropping sequences on durum wheat yield and protein in the semiarid northern Great Plains. *Agron. J.* **95**, 245-252.
- Garnett, T., Conn, V., and Kaiser, B. N. (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell Environ.* **32**, 1272-1283.
- Garnier, E., and Navas, M.-L. (2012). A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **32**, 365-399.
- Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A., and Dumas, B. (2007). Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 539-548.

- George, T., and Singleton, P. W. (1992). Nitrogen assimilation traits and dinitrogen fixation in soybean and common bean. *Agron. J.* **84**, 1020-1028.
- GEVES (2017). Le catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France. <https://www.geves.fr/catalogue/>. Accessed 17 November 2018
- Guinet, M., Nicolardot, B., Revellin, C., Durey, V., Carlsson, G., and Voisin, A.-S. (2018). Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. *Plant Soil* **432**, 207-227.
- Haines-Young, R., and Potschin, M. (2010). The link between biodiversity, ecosystem services and human well-being. In "Ecosystem Ecology: A New Synthesis" (D. G. Raffaelli and F. C. L. J, eds.), pp. 110-139, Cambridge University Press.
- Hamblin, A. P., and Tennant, D. (1987). Root length density and water uptake in cereals and grain legumes: how well are they correlated. *Aust. J. Agric. Res.* **38**, 513-527.
- Hardarson, G., Danso, S. K. A., Zapata, F., and Reichardt, K. (1991). Measurements of nitrogen fixation in fababean at different N fertilizer rates using the <sup>15</sup>N isotope dilution and 'A-value' methods. *Plant Soil* **131**, 161-168.
- Hartwig, U. A. (1998). The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **1**, 92-120.
- Hauggaard-Nielsen, H., Gooding, M., Ambus, P., Corre-Hellou, G., Crozat, Y., Dahlmann, C., Dibet, A., Von Fragstein, P., Pristeri, A., and Monti, M. (2009). Pea-barley intercropping for efficient symbiotic N<sub>2</sub>-fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crop. Res.* **113**, 64-71.
- Hauggaard-Nielsen, H., Ambus, P., and Jensen, E. S. (2001). Temporal and spatial distribution of roots and competition for nitrogen in pea-barley intercrops—a field study employing 32P technique. *Plant Soil* **236**, 63-74.
- Haynes, R. J. (1986). The decomposition process: Mineralization, immobilization, humus formation. In "Mineral nitrogen in the plant-soil systems" (A. Press, ed.), pp. 52-126, Orlando, FL.
- Herridge, D. F., Peoples, M. B., and Boddey, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* **311**, 1-18.
- Herridge, D. F., and Redden, R. J. (2000). Evaluation of genotypes of navy and culinary bean (*Phaseolus vulgaris* L.) selected for superior growth and nitrogen fixation. *Anim. Prod. Sci.* **39**, 975-980.
- Herridge, D. F., Marcellos, H., Felton, W. L., Turner, G. L., and Peoples, M. B. (1995). Chickpea increases soil-N fertility in cereal systems through nitrate sparing and N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 545-551.
- Imsande, J. (1986). Inhibition of Nodule Development in Soybean by Nitrate or Reduced Nitrogen<sup>1</sup>. *J. Exp. Bot.* **37**, 348-355.
- Isbell, F., Calcagno, V., Hector, A., Connolly, J., Harpole, W. S., Reich, P. B., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Tilman, D., and Van Ruijven, J. (2011). High plant diversity is needed to maintain ecosystem services. *Nature* **477**, 199.

- Izaurrealde, R. C., McGill, W. B., and Juma, N. G. (1992). Nitrogen fixation efficiency, interspecies N transfer, and root growth in barley-field pea intercrop on a Black Chernozemic soil. *Biol. Fertil. Soils* **13**, 11-16.
- Jani, A. D., Grossman, J., Smyth, T. J., and Hu, S. (2016). Winter legume cover-crop root decomposition and N release dynamics under disking and roller-crimping termination approaches. *Renew. Agr. Food Syst.* **31**, 214-229.
- Jani, A. D., Grossman, J. M., Smyth, T. J., and Hu, S. (2015). Influence of soil inorganic nitrogen and root diameter size on legume cover crop root decomposition and nitrogen release. *Plant Soil* **393**, 57-68.
- Jensen, C. R., Joernsgaard, B., Andersen, M. N., Christiansen, J. L., Mogensen, V. O., Friis, P., and Petersen, C. T. (2004). The effect of lupins as compared with peas and oats on the yield of the subsequent winter barley crop. *Eur. J. Agron.* **20**, 405-418.
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves, B. J., and Morrison, M. J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agron. Sustain. Dev* **32**, 329-364.
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., and Hauggaard-Nielsen, H. (2010). Faba bean in cropping systems. *Field Crop. Res.* **115**, 203-216.
- Jensen, E. S., and Hauggaard-Nielsen, H. (2003). How can increased use of biological N<sub>2</sub> fixation in agriculture benefit the environment? *Plant Soil* **252**, 177-186.
- Jensen, E. S. (1997a). Nitrogen immobilization and mineralization during initial decomposition of <sup>15</sup>N-labelled pea and barley residues. *Biol. Fertil. Soils* **24**, 39-44.
- Jensen, E. S. (1997b). "The role of grain legume N<sub>2</sub> fixation in the nitrogen cycling of temperate cropping systems " Risoe National Lab.
- Jensen, E. S. (1996). Compared cycling in a soil-plant system of pea and barley residue nitrogen. *Plant Soil* **182**, 13-23.
- Jensen, E. S. (1994a). Availability of nitrogen in <sup>15</sup>N-labelled mature pea residues to subsequent crops in the field. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 465-472.
- Jensen, E. S. (1994b). Dynamics of mature pea residue nitrogen turnover in unplanted soil under field conditions. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 455-464.
- Jensen, E. S. (1986). The influence of rate and time of nitrate supply on nitrogen fixation and yield in pea (*Pisum sativum* L.). *Fertil. Res.* **10**, 193-202.
- Jensen, L. S., Salo, T., Palmason, F., Breland, T. A., Henriksen, T. M., Stenberg, B., Pedersen, A., Lundström, C., and Esala, M. (2005). Influence of biochemical quality on C and N mineralisation from a broad variety of plant materials in soil. *Plant Soil* **273**, 307-326.
- Jeady, C., Adrian, M., Baussard, C., Bernard, C., Bernaud, E., Bourion, V., Busset, H., Cabrera-Bosquet, L., Cointault, F., and Han, S. (2016). RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant methods* **12**, 31.

- Jeudy, C., Ruffel, S., Freixes, S., Tillard, P., Santoni, A. L., Morel, S., Journet, E. P., Duc, G., Gojon, A., and Lepetit, M. (2010). Adaptation of *Medicago truncatula* to nitrogen limitation is modulated via local and systemic nodule developmental responses. *New Phytol.* **185**, 817-828.
- Jeuffroy, M. H., Biarnès, V., Cohan, J. P., Corre-Hellou, G., Gastal, F., Jouffret, P., Justes, E., Landé, N., Louarn, G., Plantureux, S., Schneider, A., Thiébeau, P., Valantin-Morison, M., and Vertès, F. (2015). Performances agronomiques et gestion des légumineuses dans les systèmes de productions végétales. In "Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables" (e. Quae, ed.), pp. 139-223, Versailles, France.
- Jeuffroy, M. H., and Warembourg, F. R. (1991). Carbon transfer and partitioning between vegetative and reproductive organs in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* **97**, 440-448.
- Jezierny, D., Mosenthin, R., and Bauer, E. (2010). The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **157**, 111-128.
- Ju, C., Buresh, R. J., Wang, Z., Zhang, H., Liu, L., Yang, J., and Zhang, J. (2015). Root and shoot traits for rice varieties with higher grain yield and higher nitrogen use efficiency at lower nitrogen rates application. *Field Crop. Res.* **175**, 47-55.
- Justes, E., Mary, B., and Nicolardot, B. (2009). Quantifying and modelling C and N mineralization kinetics of catch crop residues in soil: parameterization of the residue decomposition module of STICS model for mature and non mature residues. *Plant Soil* **325**, 171-185.
- Justes, E., Mary, B., Meynard, J. M., Machet, J. M., and Thelier-Huché, L. (1994). Determination of a critical nitrogen dilution curve for winter wheat crops. *Ann. Bot.* **74**, 397-407.
- Kamphake, L. J., Hannah, S. A., and Cohen, J. M. (1967). Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Res.* **1**, 205-216.
- Kaul, H. (2004). Pre-crop effects of grain legumes and linseed on soil mineral N and productivity of subsequent winter rape and winter wheat crops. *Die. Bodenkultur* **55**, 95.
- Khan, D. F., Peoples, M. B., Schwenke, G. D., Felton, W. L., Chen, D., and Herridge, D. F. (2003). Effects of below-ground nitrogen on N balances of field-grown fababean, chickpea, and barley. *Aust. J. Agric. Res.* **54**, 333-340.
- Khan, D. F., Peoples, M. B., Chalk, P. M., and Herridge, D. F. (2002). Quantifying below-ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of <sup>15</sup>N and non isotopic methods. *Plant Soil* **239**, 277-289.
- Kingsley, M. T., and Bohlool, B. B. (1983). Characterization of *Rhizobium* sp.(*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence, immunodiffusion, and intrinsic antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* **29**, 518-526.
- Kirkegaard, J. A., Christen, O., Krupinsky, J., and Layzell, D. B. (2008). Break crop benefits in temperate wheat production. *Field Crop. Res.* **107**, 185-195.
- Kirkegaard, J. A., and Ryan, M. H. (2014). Magnitude and mechanisms of persistent crop sequence effects on wheat. *Field Crop. Res.* **164**, 154-165.
- Köpke, U., and Nemecek, T. (2010). Ecological services of faba bean. *Field Crop. Res.* **115**, 217-233.

- Kraiser, T., Gras, D. E., Gutiérrez, A. G., González, B., and Gutiérrez, R. A. (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 1455-1466.
- Kramer-Walter, K. R., and Laughlin, D. C. (2017). Root nutrient concentration and biomass allocation are more plastic than morphological traits in response to nutrient limitation. *Plant Soil* **416**, 1-12.
- Kremen, C. (2005). Managing ecosystem services: what do we need to know about their ecology? *Ecol. Lett.* **8**, 468-479.
- Krom, M. D. (1980). Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* **105**, 305-316.
- Kumar, K., and Goh, K. M. (2003). Nitrogen release from crop residues and organic amendments as affected by biochemical composition. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **34**, 2441-2460.
- Kumar, K., and Goh, K. M. (2000). Crop residues and management practices: effect on soil quality, soil nitrogen dynamics, crop yield and nitrogen recovery. *Adv. Agron.* **68**, 197-319.
- Lagacherie, B., Hugot, R., and Amarger, N. (1977). Selection de souches de *Rhizobium japonicum* d'après leur compétitivité pour l'infection. In "Ann. Agron.", Vol. 28, pp. 379-389.
- Laguerre, G., Depret, G., Bourion, V., and Duc, G. (2007). *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots. *New Phytol.* **176**, 680-690.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S. I., Casartelli, R. R., and Amarger, N. (1993). Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* **39**, 412-419.
- Larmure, A., Salon, C., and Munier-Jolain, N. G. (2005). How does temperature affect C and N allocation to the seeds during the seed-filling period in pea? Effect on seed nitrogen concentration. *Funct. Plant Biol.* **32**, 1009-1017.
- Larney, F. J., and Lindwall, C. W. (1995). Rotation and tillage effects on available soil water for winter wheat in a semi-arid environment'. *Soil Tillage Res.* **36**, 111-127.
- Lavorel, S., Grigulis, K., Lamarque, P., Colace, M. P., Garden, D., Girel, J., Pellet, G., and Douzet, R. (2011). Using plant functional traits to understand the landscape distribution of multiple ecosystem services. *J. Ecol.* **99**, 135-147.
- Lavorel, S., and Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Funct. Ecol.* **16**, 545-556.
- Lawn, R. J., and Brun, W. A. (1974). Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. *Crop Sci.* **14**, 11-16.
- Le Roux, X., Barbault, R., Baudry, J., Burel, F., Doussan, I., Garnier, E., Herzog, F., Lavorel, S., Lifran, R., and Roger-Estrade, J. (2008). "Agriculture et biodiversité. Valoriser les synergies. Expertise collective, synthèse du rapport." INRA (France).

- Lecoœur, J., and Sinclair, T. R. (2001). Nitrogen accumulation, partitioning, and nitrogen harvest index increase during seed fill of field pea. *Field Crop. Res.* **71**, 87-99.
- Leidi, E., and Rodriguez-Navarro, D. (2000). Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. *New Phytol.* **147**, 337-346.
- Lemaire, G., Jeuffroy, M. H., and Gastal, F. (2008). Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage: Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* **28**, 614-624.
- Lemaire, G., Cruz, P., Gosse, G., and Chartier, M. (1985). Etude des relations entre la dynamique de prélèvement d'azote et la dynamique de croissance en matière sèche d'un peuplement de luzerne (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* **5**, 685-692.
- Lemke, R. L., Zhong, Z., Campbell, C., and Zentner, R. (2007). Can pulse crops play a role in mitigating greenhouse gases from North American agriculture? *Agron. J.* **99**, 1719-1725.
- Lescourret, F., Magda, D., Richard, G., Adam-Blondon, A. F., Bardy, M., Baudry, J., Doussan, I., Dumont, B., Lefèvre, F., and Litrico, I. (2015). A social-ecological approach to managing multiple agroecosystem services. *Opin. Environ. Sustain.* **14**, 68-75.
- Li, Y. Y., Yu, C. B., Cheng, X., Li, C. J., Sun, J. H., Zhang, F. S., Lambers, H., and Li, L. (2009). Intercropping alleviates the inhibitory effect of N fertilization on nodulation and symbiotic N<sub>2</sub> fixation of faba bean. *Plant Soil* **323**, 295-308.
- Liao, M., Palta, J. A., and Fillery, I. R. P. (2006). Root characteristics of vigorous wheat improve early nitrogen uptake. *Aust. J. Agric. Res.* **57**, 1097-1107.
- Liu, L., Gan, Y., Bueckert, R., and Van Rees, K. (2011a). Rooting systems of oilseed and pulse crops. II: Vertical distribution patterns across the soil profile. *Field Crop. Res.* **122**, 248-255.
- Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J. A., and Watson, C. A. (2011b). Models of biological nitrogen fixation of legumes. *Agron. Sustain. Dev* **31**, 155-172.
- López-Bellido, L., López-Bellido, R. J., Castillo, J. E., and López-Bellido, F. J. (2004). Chickpea response to tillage and soil residual nitrogen in a continuous rotation with wheat: I. Biomass and seed yield. *Field Crop. Res.* **88**, 191-200.
- Lorin, M., Jeuffroy, M. H., Butier, A., and Valantin-Morison, M. (2015). Undersowing winter oilseed rape with frost-sensitive legume living mulches to improve weed control. *Eur. J. Agron.* **71**, 96-105.
- Lorin, M. (2015). Services écosystémiques rendus par les légumineuses gélives introduites en tant que plantes de service dans du colza d'hiver : évaluation expérimentale et analyse fonctionnelle, Thèse de doctorat, AgroParis Tech, Paris, France.
- Lorin, M., Jeuffroy, M.-H., Butier, A., and Valantin-Morison, M. (2016). Undersowing winter oilseed rape with frost-sensitive legume living mulch: Consequences for cash crop nitrogen nutrition. *Field Crop. Res.* **193**, 24-33.
- Luna-Orea, P., Waggener, M. G., and Gumpertz, M. L. (1996). Decomposition and nutrient release dynamics of two tropical legume cover crops. *Agron. J.* **88**, 758-764.

- Lupwayi, N. Z., and Soon, Y. K. (2009). Nitrogen release from field pea residues and soil inorganic N in a pea-wheat crop rotation in northwestern Canada. *Can. J. Soil Sci.* **89**, 239-246.
- Lupwayi, N. Z., Clayton, G. W., O'Donovan, J. T., Harker, K. N., Turkington, T. K., and Soon, Y. K. (2006). Nitrogen release during decomposition of crop residues under conventional and zero tillage. *Can. J. Soil Sci.* **86**, 11-19.
- Machado Neto, N. B., Prioli, M. R., Gatti, A. B., and Mendes Cardoso, V. J. (2006). Temperature effects on seed germination in races of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Sci.-Agron.* **28**, 155-164.
- MAES (2013). "Mapping and Assessment of Ecosystems and their Services. An analytical framework for ecosystem assessment under Action 5 of the EU Biodiversity Strategy to 2020. Discussion Paper \_ Final." Publication office of the European Union, Luxembourg.
- Magrini, M. B., Anton, M., Cholez, C., Corre-Hellou, G., Duc, G., Jeuffroy, M. H., Meynard, J. M., Pelzer, E., Voisin, A. S., and Walrand, S. (2016). Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. *Ecol. Econ.* **126**, 152-162.
- Mahieu, S., Fustec, J., Faure, M. L., Corre-Hellou, G., and Crozat, Y. (2007). Comparison of two <sup>15</sup>N labelling methods for assessing nitrogen rhizodeposition of pea. *Plant Soil* **295**, 193-205.
- Materechera, S. A., Alston, A. M., Kirby, J. M., and Dexter, A. R. (1992). Influence of root diameter on the penetration of seminal roots into a compacted subsoil. *Plant Soil* **144**, 297-303.
- Materechera, S. A., Dexter, A. R., and Alston, A. M. (1991). Penetration of very strong soils by seedling roots of different plant species. *Plant Soil* **135**, 31-41.
- Matlab (2015). MATLAB and Statistics Toolbox Release 2015a. The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.
- Mazurier, S. I. (1989). Diversité de populations naturelles nodulantes de *Rhizobium leguminosarum*, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.
- McConnaughay, K. D. M., and Coleman, J. S. (1999). Biomass allocation in plants: ontogeny or optimality? A test along three resource gradients. *Ecology* **80**, 2581-2593.
- McDaniel, M. D., Tiemann, L. K., and Grandy, A. S. (2014). Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. *Ecol. Appl.* **24**, 560-570.
- McDonald, G. K. (2003). Competitiveness against grass weeds in field pea genotypes. *Weed Research* **43**, 48-58.
- Médiène, S., Valantin-Morison, M., Sarthou, J.-P., De Tourdonnet, S., Gosme, M., Bertrand, M., Roger-Estrade, J., Aubertot, J.-N., Rusch, A., and Motisi, N. (2011). Agroecosystem management and biotic interactions: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **31**, 491-514.
- Meynard, J.-M., Messéan, A., Charlier, A., Charrier, F., Le Bail, M., Magrini, M.-B., and Savini, I. (2013). Freins et leviers à la diversification des cultures: étude au niveau des exploitations agricoles et des filières. *Ocl* **20**, D403.

- Mi, G. H., Chen, F. J., Wu, Q. P., Lai, N. W., Yuan, L. X., and Zhang, F. S. (2010). Ideotype root architecture for efficient nitrogen acquisition by maize in intensive cropping systems. *Science China Life Sci.* **53**, 1369-1373.
- Millennium Ecosystem Assessment (2005). "Ecosystems and human well-being: Synthesis," Washington, DC.
- Miller, P. R., and Holmes, J. A. (2005). Cropping sequence effects of four broadleaf crops on four cereal crops in the northern Great Plains. *Agron. J.* **97**, 189-200.
- Miller, P. R., Gan, Y., McConkey, B. G., and McDonald, C. L. (2003). Pulse crops for the northern Great Plains: II. Cropping sequence effects on cereal, oilseed, and pulses crops. *Agron. J.* **95**, 980-986.
- Miller, P. R., Waddington, J., McDonald, C., and Derksen, D. A. (2002). Cropping sequence affects wheat productivity on the semiarid northern Great Plains. *Can. J. Plant Sci.* **82**, 307-318.
- Mohd-Radzman, N. A., Djordjevic, M. A., and Imin, N. (2013). Nitrogen modulation of legume root architecture signaling pathways involves phytohormones and small regulatory molecules. *Front. Plant Sci.* **4**, 385.
- Moreau, D., Abiven, F., Busset, H., Matejicek, A., and Pagès, L. (2017). Effects of species and soil-nitrogen availability on root system architecture traits—study on a set of weed and crop species. *Ann. Appl. Biol.* **171**, 103-116.
- Moreau, D., Voisin, A. S., Salon, C., and Munier-Jolain, N. (2008). The model symbiotic association between *Medicago truncatula* cv. Jemalong and *Rhizobium meliloti* strain 2011 leads to N-stressed plants when symbiotic N<sub>2</sub> fixation is the main N source for plant growth. *J. Exp. Bot.* **59**, 3509-3522.
- Muller, B., and Touraine, B. (1992). Inhibition of NO<sub>3</sub> Uptake by Various Phloem-Translocated Amino Acids in Soybean Seedlings. *J. Exp. Bot.* **43**, 617-623.
- Müller, M. M., and Sundman, V. (1988). The fate of nitrogen (15 N) released from different plant materials during decomposition under field conditions. *Plant Soil* **105**, 133-139.
- Munier-Jolain, N. G., and Salon, C. (2005). Are the carbon costs of seed production related to the quantitative and qualitative performance? An appraisal for legumes and other crops. *Plant Cell Environ.* **28**, 1388-1395.
- Naudin, C., Corre-Hellou, G., Voisin, A. S., Oury, V., Salon, C., Crozat, Y., and Jeuffroy, M. H. (2011). Inhibition and recovery of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by peas (*Pisum sativum* L.) in response to short-term nitrate exposure. *Plant Soil* **346**, 275.
- Naudin, C., Corre-Hellou, G., Pineau, S., Crozat, Y., and Jeuffroy, M. H. (2010). The effect of various dynamics of N availability on winter pea–wheat intercrops: crop growth, N partitioning and symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Field Crop. Res.* **119**, 2-11.
- Nemecek, T., von Richthofen, J.-S., Dubois, G., Casta, P., Charles, R., and Pahl, H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *Eur. J. Agron.* **28**, 380-393.
- Neo, H. H., and Layzell, D. B. (1997). Phloem glutamine and the regulation of O<sub>2</sub> diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* **113**, 259-267.

- Ney, B., Doré, T., and Sagan, M. (1997). The nitrogen requirements of major agricultural crops : Grain legumes. In "Diagnosis of the nitrogen status in crops" (G. Lemaire, ed.), pp. 107-117. Springer-Verlag, Heigelberg.
- Nicolardot, B., Recous, S., and Mary, B. (2001). Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C: N ratio of the residues. *Plant Soil* **228**, 83-103.
- Norman, R. J., Gilmour, J. T., and Wells, B. R. (1990). Mineralization of nitrogen from nitrogen-15 labeled crop residues and utilization by rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**, 1351-1356.
- Palm, C. A., Gachengo, C. N., Delve, R. J., Cadisch, G., and Giller, K. E. (2001). Organic inputs for soil fertility management in tropical agroecosystems: application of an organic resource database. *Agric. Ecosyst. Environ.* **83**, 27-42.
- Pate, J. S., Layzell, D. B., and Atkins, C. A. (1979). Economy of carbon and nitrogen in a nodulated and nonnodulated (NO<sub>3</sub>-grown) legume. *Plant Physiol.* **64**, 1083-1088.
- 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., and Maskey, S. (2009a). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis* **48**, 1-17.
- Peoples, M. B., Hauggaard-Nielsen, H., and Jensen, E. S. (2009b). The potential environmental benefits and risks derived from legumes in rotations. In "Agronomy monograph 52. Nitrogen fixation in crop production" (H. K. DW Emerich, ed.), Vol. 52, pp. 349-385. Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am., and Soil Sci. Soc Am. , Madison, Wisconsin, USA.
- Peoples, M. B., Bowman, A. M., Gault, R. R., Herridge, D. F., McCallum, M. H., McCormick, K. M., Norton, R. M., Rochester, I. J., Scammell, G. J., and Schwenke, G. D. (2001). Factors regulating the contributions of fixed nitrogen by pasture and crop legumes to different farming systems of eastern Australia. *Plant Soil* **228**, 29-41.
- Peoples, M. B., Turner, G. L., Shah, Z., Shah, S. H., Aslam, M., Ali, S., Maskey, S. L., Bhattarai, S., Afandi, F., and Schwenke, G. D. (1997). Evaluation of the 15N natural abundance technique for measuring N<sub>2</sub> fixation in experimental plots and farmers' fields. In "Extending Nitrogen Fixation Research to Farmers' Fields" (O. Rupela, Johansen, C., Herridge, D., ed.), pp. 57-75. ICRISAT, India.
- Peoples, M. B., and Craswell, E. T. (1992). Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* **141**, 13-39.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S., Cornwell, W. K., Craine, J. M., and Gurvich, D. E. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* **61**, 167-234.
- Petrie, C., and Hall, A. (1992). Water relations in cowpea and pearl millet under soil water deficits. II. Water use and root distribution. *Funct. Plant Biol.* **19**, 591-600.
- Plaza-Bonilla, D., Nolot, J.-M., Passot, S., Raffaillac, D., and Justes, E. (2016). Grain legume-based rotations managed under conventional tillage need cover crops to mitigate soil organic matter losses. *Soil Tillage Res.* **156**, 33-43.

- Plaza-Bonilla, D., Nolot, J. M., Raffaillac, D., and Justes, E. (2015). Cover crops mitigate nitrate leaching in cropping systems including grain legumes: field evidence and model simulations. *Agric. Ecosyst. Environ.* **212**, 1-12.
- Plénet, D., and Cruz, P. (1997). Maize and sorghum. In "Diagnosis of the nitrogen status in crops" (G. Lemaire, ed.), pp. 93-106. Springer-Verlag, Heigelberg.
- Pontes, L. D. S., Soussana, J. F., Louault, F., Andueza, D., and Carrere, P. (2007). Leaf traits affect the above-ground productivity and quality of pasture grasses. *Funct. Ecol.* **21**, 844-853.
- Power, A. G. (2010). Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.* **365**, 2959-2971.
- Preissel, S., Reckling, M., Schläfke, N., and Zander, P. (2015). Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: A review. *Field Crop. Res.* **175**, 64-79.
- Prieto, I., Roumet, C., Cardinael, R., Dupraz, C., Jourdan, C., Kim, J. H., Maeght, J. L., Mao, Z., Pierret, A., and Portillo, N. (2015). Root functional parameters along a land-use gradient: evidence of a community-level economics spectrum. *J. Ecol.* **103**, 361-373.
- Quijas, S., Schmid, B., and Balvanera, P. (2010). Plant diversity enhances provision of ecosystem services: a new synthesis. *Basic Appl. Ecol.* **11**, 582-593.
- R Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rao, D. L. N., Giller, K. E., Yeo, A. R., and Flowers, T. J. (2002). The effects of salinity and sodicity upon nodulation and nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* **89**, 563-570.
- Ratnadass, A., Fernandes, P., Avelino, J., and Habib, R. (2012). Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **32**, 273-303.
- Ravier, C., Quemada, M., and Jeuffroy, M.-H. (2017). Use of a chlorophyll meter to assess nitrogen nutrition index during the growth cycle in winter wheat. *Field Crop. Res.* **214**, 73-82.
- Reckling, M., Hecker, J.-M., Bergkvist, G., Watson, C. A., Zander, P., Schläfke, N., Stoddard, F. L., Eory, V., Topp, C. F. E., Maire, J., and Bachinger, J. (2016). A cropping system assessment framework—evaluating effects of introducing legumes into crop rotations. *Eur. J. Agron.* **76**, 186-197.
- Recous, S., Aita, C., and Mary, B. (1998). In situ changes in gross N transformations in bare soil after addition of straw. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 119-133.
- Redden, R. J., and Herridge, D. F. (1999). Evaluation of genotypes of navy and culinary bean (*Phaseolus vulgaris* L.) selected for superior growth and nitrogen fixation. *Aust. J. Exp. Agric.* **39**, 975-980.
- Redin, M., Guénon, R., Recous, S., Schmatz, R., De Freitas, L. L., Aita, C., and Giacomini, S. J. (2014a). Carbon mineralization in soil of roots from twenty crop species, as affected by their chemical composition and botanical family. *Plant Soil* **378**, 205-214.

- Redin, M., Recous, S., Aita, C., Dietrich, G., Skolaude, A. C., Ludke, W. H., Schmatz, R., and Giacomini, S. J. (2014b). How the chemical composition and heterogeneity of crop residue mixtures decomposing at the soil surface affects C and N mineralization. *Soil Biol. Biochem.* **78**, 65-75.
- Reich, P. B. (2014). The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. *J. Ecol.* **102**, 275-301.
- Rennie, R. J., and Rennie, D. A. (1983). Techniques for quantifying N<sub>2</sub> fixation in association with nonlegumes under field and greenhouse conditions. *Can. J. Microbiol.* **29**, 1022-1035.
- Robinson, D., Hodge, A., Griffiths, B. S., and Fitter, A. H. (1999). Plant root proliferation in nitrogen-rich patches confers competitive advantage. *Proc. Roy. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **266**, 431-435.
- Rochester, I. J., Peoples, M. B., Hulugalle, N. R., Gault, R. R., and Constable, G. A. (2001). Using legumes to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. *Field Crop. Res.* **70**, 27-41.
- Rochester, I. J., Peoples, M. B., Constable, G. A., and Gault, R. R. (1998). Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. *Aust. J. Exp. Agric.* **38**, 253-260.
- Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K. D., and Coruzzi, G. M. (2011). Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate-cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 18524-18529.
- Ruffel, S., Freixes, S., Balzergue, S., Tillard, P., Jeudy, C., Martin-Magniette, M. L., Van Der Merwe, M. J., Kakar, K., Gouzy, J., and Fernie, A. R. (2008). Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **146**, 2020-2035.
- Russell, C. A., and Fillery, I. R. P. (1999). Turnover of nitrogen from components of lupin stubble to wheat in sandy soil. *Soil Res.* **37**, 575-592.
- Russell, C. A., and Fillery, I. R. P. (1996). Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. *Aust. J. Agric. Res.* **47**, 1047-1059.
- Salon, C., Avice, J. C., Larmure, A., Ourry, A., Prudent, M., and Voisin, A. S. (2011). Plant N fluxes and modulation by nitrogen, heat and water stresses: A review based on comparison of legumes and non legume plants. In "Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations" (V. B. Shanker A, ed.). InTech, Rikeja, Croatia.
- Salvagiotti, F., Cassman, K. G., Specht, J. E., Walters, D. T., Weiss, A., and Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crop. Res.* **108**, 1-13.
- Schiltz, S., Munier-Jolain, N., Jeudy, C., Burstin, J., and Salon, C. (2005). Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by <sup>15</sup>N in vivo labeling throughout seed filling. *Plant Physiol.* **137**, 1463-1473.
- Schott, C., Mignolet, C., and Meynard, J.-M. (2010). Les oléoprotéagineux dans les systèmes de culture: évolution des assolements et des successions culturales depuis les années 1970 dans le bassin de la Seine. *Ocl* **17**, 276-291.

- Schwenke, G. D., Peoples, M. B., Turner, G. L., and Herridge, D. F. (1998). Does nitrogen fixation of commercial, dryland chickpea and faba bean crops in north-west New South Wales maintain or enhance soil nitrogen? *Anim. Prod. Sci.* **38**, 61-70.
- Soon, Y., and Arshad, M. (2002). Comparison of the decomposition and N and P mineralization of canola, pea and wheat residues. *Biol. Fertil. Soils* **36**, 10-17.
- Sprent, J. I., Stephens, J. H., and Rupela, O. P. (1988). Environmental effects on nitrogen fixation. In "World crops: cool season food legumes" (R. J. Sumerfield, ed.), pp. 801-810. Kluwer Academic publishers, Dordrecht The Netherlands.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E. M., Biggs, R., Carpenter, S. R., de Vries, W., and de Wit, C. A. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science* **347**, 1259855.
- Stevenson, F. C., and Van Kessel, C. (1996). A landscape-scale assessment of the nitrogen and non-nitrogen rotation benefits of pea. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **60**, 1797-1805.
- Stoate, C., Boatman, N. D., Borralho, R. J., Carvalho, C. R., De Snoo, G. R., and Eden, P. (2001). Ecological impacts of arable intensification in Europe. *J. Environ. Manage.* **63**, 337-365.
- Streeter, J. G. (2003). Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. *Plant Cell Environ.* **26**, 1199-1204.
- Strong, W. M., Harbison, J., Nielsen, R. H. G., Hall, B. D., and Best, E. K. (1986). Nitrogen availability in a Darling Downs soil following cereal, oilseed and grain legume crops. 2. Effects of residual soil nitrogen and fertiliser nitrogen on subsequent wheat crops. *Aust. J. Exp. Agric.* **26**, 353-359.
- Strydhorst, S. M., King, J. R., Lopetinsky, K. J., and Harker, K. N. (2008). Weed interference, pulse species, and plant density effects on rotational benefits. *Weed Sci.* **56**, 249-258.
- Sulieman, S., Fischinger, S. A., Gresshoff, P. M., and Schulze, J. (2010). Asparagine as a major factor in the N-feedback regulation of N<sub>2</sub> fixation in *Medicago truncatula*. *Physiol. Plant.* **140**, 21-31.
- Sutton, M. A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., van Grinsven, H., and Winiwarer, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature* **472**, 159.
- Tardy, F., Damour, G., Dorel, M., and Moreau, D. (2017). Trait-based characterisation of soil exploitation strategies of banana, weeds and cover plant species. *PloS one* **12**, e0173066.
- Tardy, F., Moreau, D., Dorel, M., and Damour, G. (2015). Trait-based characterisation of cover plants' light competition strategies for weed control in banana cropping systems in the French West Indies. *Eur. J. Agron.* **71**, 10-18.
- ter Braak, C. J. F., and Šmilauer, P. (2012). "Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power," Ithaca, USA.
- Terres Univia (2018) Cultures et utilisations - les espèces cultivées. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees>. Accessed 12 December 2018.
- Tibi, A., and Therond, O. (2017). "Evaluation des services écosystémiques rendus par les écosystèmes agricoles. une contribution au programme EFSE. Synthèse du rapport d'étude." Inra (France).

- Tiemann, L. K., Grandy, A. S., Atkinson, E. E., Marin-Spiotta, E., and McDaniel, M. D. (2015). Crop rotational diversity enhances belowground communities and functions in an agroecosystem. *Ecol. Lett.* **18**, 761-771.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., and Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**, 671.
- Tilman, D., Wedin, D., and Knops, J. (1996). Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* **379**, 718.
- Tribouillois, H., Dürr, C., Demilly, D., Wagner, M. H., and Justes, E. (2016). Determination of germination response to temperature and water potential for a wide range of cover crop species and related functional groups. *PLoS one* **11**, e0161185.
- Tribouillois, H., Cohan, J.-P., and Justes, E. (2015a). Cover crop mixtures including legume produce ecosystem services of nitrate capture and green manuring: assessment combining experimentation and modelling. *Plant Soil* **401**, 347-364.
- Tribouillois, H., Fort, F., Cruz, P., Charles, R., Flores, O., Garnier, E., and Justes, E. (2015b). A functional characterisation of a wide range of cover crop species: growth and nitrogen acquisition rates, leaf traits and ecological strategies. *PLoS one* **10**, e0122156.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Lineres, M., Cheneby, D., and Nicolardot, B. (2000). Biochemical Quality of Crop Residues and Carbon and Nitrogen Mineralization Kinetics under Nonlimiting Nitrogen Conditions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **3**, 918-926.
- Turpin, J. E., Herridge, D. F., and Robertson, M. J. (2002). Nitrogen fixation and soil nitrate interactions in field-grown chickpea (*Cicer arietinum*) and fababean (*Vicia faba*). *Crop Pasture Sci.* **53**, 599-608.
- Ugarte Nano, C. C., Nicolardot, B., Quinche, M., Munier-Jolain, N., and Ubertosi, M. (2016). Effects of integrated weed management based cropping systems on the water retention of a silty clay loam soil. *Soil Tillage Res.* **156**, 74-82.
- Unkovich, M. J., and Pate, J. S. (2000). An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field Crop. Res.* **65**, 211-228.
- Unkovich, M. J., Pate, J. S., and Hamblin, J. (1994). The nitrogen economy of broadacre lupin in southwest Australia. *Aust. J. Agric. Res.* **45**, 149-164.
- Urbatzka, P., Graß, R., Haase, T., Schüler, C., and Heß, J. (2009). Fate of legume-derived nitrogen in monocultures and mixtures with cereals. *Agric. Ecosyst. Environ.* **132**, 116-125.
- Van Kessel, C., and Hartley, C. (2000). Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crop. Res.* **65**, 165-181.
- Vance, C. P., and Heichel, G. H. (1991). Carbon in N<sub>2</sub> fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **42**, 373-390.
- Vigil, M. F., and Kissel, D. E. (1991). Equations for estimating the amount of nitrogen mineralized from crop residues. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **55**, 757-761.

- Violle, C., Garnier, E., Leconteur, J., Roumet, C., Pothier, C., Blanchard, A., and Navas, M.-L. (2009). Competition, traits and resource depletion in plant communities. *Oecologia* **160**, 747-755.
- Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., and Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**, 882-892.
- Vocanson, A., Munier-Jolain, N., Voisin, A.-S., and Ney, B. (2005). Dilution curve. In "Physiology of the pea crop" (E. Quae, ed.), pp. 81-106, Paris, France.
- Voisin, A.-S., and Gastal, F. (2015). Nutrition azotée et fonctionnement agrophysiologique spécifique des légumineuses. In "Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables" (e. Quae, ed.), pp. 79-137, Versailles, France.
- Voisin, A.-S., Prudent, M., Duc, G., and Salon, C. (2015). Pea nodule gradients explain N nutrition and limited symbiotic fixation in hypernodulating mutants. *Agron. Sustain. Dev.* **35**, 1529-1540.
- Voisin, A. S., Guéguen, J., Huyghe, C., Jeuffroy, M. H., Magrini, M. B., Meynard, J. M., Mougel, C., Pellerin, S., and Pelzer, E. (2014). Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **34**, 361-380.
- Voisin, A. S., Munier-Jolain, N. G., and Salon, C. (2010). The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant Soil* **337**, 399-412.
- Voisin, A. S., Salon, C., Jeudy, C., and Warembourg, F. R. (2003a). Root and nodule growth in *Pisum sativum* L. in relation to photosynthesis: Analysis using <sup>13</sup>C-labelling. *Ann. Bot.* **92**, 557-563.
- Voisin, A. S., Salon, C., Jeudy, C., and Warembourg, F. R. (2003b). Seasonal Patterns of <sup>13</sup>C Partitioning Between Shoots and Nodulated Roots of N<sub>2</sub>-or Nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Ann. Bot.* **91**, 539-546.
- Voisin, A. S., Salon, C., Munier-Jolain, N. G., and Ney, B. (2002a). Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Soil* **242**, 251-262.
- Voisin, A. S., Salon, C., Munier-Jolain, N. G., and Ney, B. (2002b). Quantitative effects of soil nitrate, growth potential and phenology on symbiotic nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Soil* **243**, 31-42.
- von Fragstein, P. (1995). Manuring, manuring strategies, catch crops and N-fixation. *Biol. Agric. Hortic.* **11**, 273-287.
- Walley, F. L., Clayton, G. W., Miller, P. R., Carr, P. M., and Lafond, G. P. (2007). Nitrogen economy of pulse crop production in the Northern Great Plains. *Agron. J.* **99**, 1710-1718.
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J.-F., Ferrer, A., and Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **34**, 1-20.
- Wichern, F., Mayer, J., Joergensen, R. G., and Müller, T. (2007). Rhizodeposition of C and N in peas and oats after <sup>13</sup>C–<sup>15</sup>N double labelling under field conditions. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 2527-2537.
- Williams, C. M., King, J. R., Ross, S. M., Olson, M. A., Hoy, C. F., and Lopetinsky, K. J. (2014). Effects of three pulse crops on subsequent barley, canola, and wheat. *Agron. J.* **106**, 343-350.

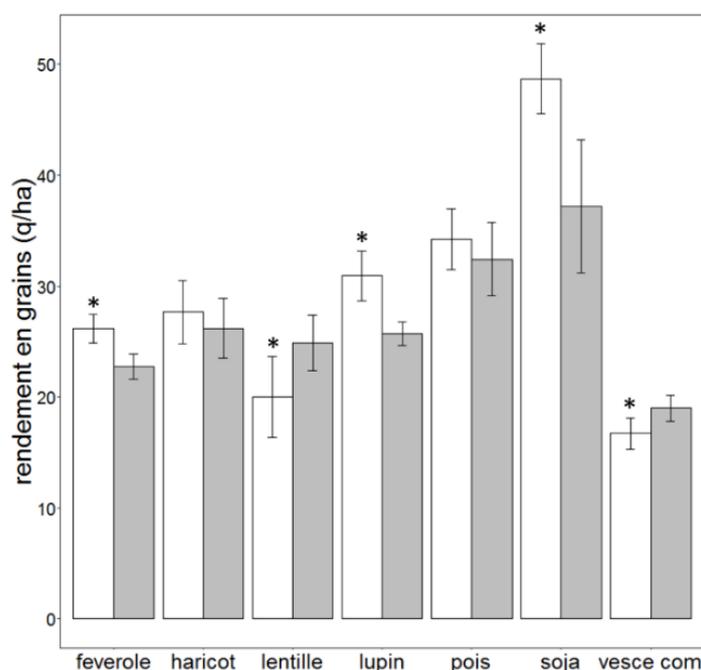
- Williams, J. D., McCool, D. K., Reardon, C. L., Douglas, C. L., Albrecht, S. L., and Rickman, R. W. (2013). Root: shoot ratios and belowground biomass distribution for Pacific Northwest dryland crops. *J. Soil Water Conserv.* **68**, 349-360.
- Wivstad, M. (1999). Nitrogen mineralization and crop uptake of N from decomposing <sup>15</sup>N labelled red clover and yellow sweetclover plant fractions of different age. *Plant Soil* **208**, 21-31.
- WRB, I. W. G. (2006). World reference base for soil resources 2006, World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome.
- Wright, A. T. (1990). Yield effect of pulses on subsequent cereal crops in the northern prairies. *Can. J. Plant Sci.* **70**, 1023-1032.
- Yunusa, I. A. M., and Rashid, M. A. (2007). Productivity and rotational benefits of grass, medic pastures and faba beans in a rainfall limited environment. *Soil Tillage Res.* **97**, 150-161.
- Zapata, F., Danso, S. K. A., Hardarson, G., and Fried, M. (1987a). Nitrogen fixation and translocation in field-grown fababean. *Agron. J.* **79**, 505-509.
- Zapata, F., Danso, S. K. A., Hardarson, G., and Fried, M. (1987b). Time course of nitrogen fixation in field-grown soybean using nitrogen-15 methodology. *Agron. J.* **79**, 172-176.
- Zhang, D., Hui, D., Luo, Y., and Zhou, G. (2008). Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *J. Plant Ecol.* **1**, 85-93.
- Zhang, W., Ricketts, T. H., Kremen, C., Carney, K., and Swinton, S. M. (2007). Ecosystem services and dis-services to agriculture. *Ecol. Econ.* **64**, 253-260.
- Zhu, J., Ingram, P. A., Benfey, P. N., and Elich, T. (2011). From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 310-317.



## Annexes

## ANNEXE 1 : Effet de l'inoculation sur le rendement des légumineuses

En 2014, un essai au champ avait été conduit afin d'étudier l'effet de l'inoculation par rapport à une modalité sans inoculation, sur le rendement des espèces de légumineuses. Cette analyse n'a cependant pas pu être menée sur le fenugrec, le pois chiche et la vesce de Narbonne, du fait de l'absence de production de graines en 2014.



**Figure A1** : Rendement en grains des légumineuses en 2014 selon deux modalités d'inoculation. Inoculation avec une souche spécifique (barres blanches) ; absence d'inoculation (barres grises). Les rendements sont exprimés pour une norme de 14 % d'humidité pour la féverole, le haricot, le lupin, le pois et le soja, et une norme d'humidité de 15 % pour la lentille et la vesce commune. Pour chaque espèce, \* indique une différence significative de rendement ( $p < 0.05$ ) de la modalité inoculée par rapport à la modalité non inoculée. (voir Tableau 1 Chapitre 1, p 57 pour le nom des souches de rhizobium utilisées).

Dans nos conditions d'expérimentation, l'inoculation, n'a pas eu d'effet sur le rendement en grain du pois et du haricot par rapport à la modalité non inoculée. Ces résultats indiquent que la souche de *Rhizobium* apportée par inoculation n'a pas assuré de meilleurs rendements par rapport aux souches de *Rhizobium* déjà présentes dans le sol. L'inoculation a cependant augmenté le rendement de la féverole (+3,4 q ha<sup>-1</sup>), du lupin (+5,2 q ha<sup>-1</sup>), et du soja (+11,7 q ha<sup>-1</sup>) par rapport à la modalité non inoculée, indiquant que les souches indigènes du sol n'étaient pas aussi efficaces que la souche apportée par inoculation. Enfin, l'inoculation a eu un effet négatif sur le rendement de la lentille (-4,9 q ha<sup>-1</sup>) et de la vesce commune (-2,3 q ha<sup>-1</sup>) par rapport à la modalité non inoculée, suggérant que les souches de *Rhizobium* apportées par inoculation étaient moins efficaces mais plus compétitives que les souches indigènes du sol.

## ANNEXE 2 : Rendements en graines des légumineuses en 2014 et 2016

A maturité des légumineuses, une récolte machine a été réalisée sur des placettes de 6,5 m<sup>2</sup> afin de déterminer le rendement en graines. Le tableau suivant renseigne sur les rendements moyens  $\pm$  (écart-type) mesurée lors des expérimentations au champ en 2014 et 2016 pour les espèces de légumineuses inoculées au semis, ainsi que le rendement moyen des 5 dernières années à l'échelle nationale.

**Tableau A2** Rendement en graines des légumineuses en 2014 et 2016

	2014 (q ha <sup>-1</sup> )	2016 (q ha <sup>-1</sup> )	Rendements moyens (2013-2017) en France
<b>Féverole</b>	26.2 (1.3)	44.0 (6.6)	30.6 (5.6)
<b>Lupin</b>	30.9 (2.2)	34.6 (3.9)	24.8 (2.7)
<b>Pois</b>	34.3 (2.7)	21.8 (2.8)	35.0 (5.8)
<b>Lentille</b>	20.0 (3.7)	15.9 (1.8)	14.5 (1.0)
<b>Vesce commune</b>	16.7 (1.4)	10.4 (2.4)	
<b>Fenugrec</b>		20.8 (1.7)	
<b>Haricot</b>	27.7 (2.8)	20.6 (2.9)	28.5 (6.4)
<b>Pois chiche</b>		36.1 (5.4)	
<b>Soja</b>	48.7 (3.1)	37.5 (1.9)	27.4 (2.1)

*Les rendements sont exprimés pour une norme de 14 % d'humidité pour le fenugrec, la féverole, le haricot, le lupin, le pois, le pois chiche et le soja, et une norme d'humidité de 15 % pour la lentille et la vesce commune.*

En 2014 et 2016, le lupin, le soja et la lentille ont présenté des rendements supérieurs à la moyenne nationale des 5 dernières années. En 2014, les rendements du haricot et du pois étaient proches de la moyenne nationale, tandis qu'en 2016 les rendements des deux espèces étaient inférieurs à la moyenne nationale. En 2014, le rendement de la féverole était inférieur à la moyenne nationale, tandis qu'en 2016 le rendement mesuré lors de l'expérimentation au champ était supérieur à la moyenne nationale.

## ANNEXE 3 : Effet de la fertilisation azotée sur la biomasse et la teneur en azote des pailles et des graines des légumineuses

**Tableau A3** Biomasses et teneurs en azote des pailles et des graines mesurées à maturité des dix espèces de légumineuses cultivées au champ en 2014. Les valeurs correspondent à la moyenne des 4 répétitions  $\pm$  (écart-type). Pour chaque espèce, les modalités de fertilisation suivies d'une \* sont statistiquement différentes de la modalité 0N (en rouge plus grandes valeurs que la modalité 0N ; en bleu plus faibles valeurs que la modalité 0N).

	Biomasse pailles (g m <sup>-2</sup> )				Biomasse graines (g m <sup>-2</sup> )			
	Modalité N				Modalité N			
	0N	50N	150N	300N	0N	50N	150N	300N
Lentille	<b>332</b> (39)	<b>305</b> (25)	<b>323</b> (58)	<b>376</b> (39)	<b>220</b> (24)	<b>211</b> (18)	<b>229</b> (13)	<b>198</b> (39)
Vesce commune	<b>337</b> (43)	<b>322</b> (72)	<b>318</b> (68)	<b>350</b> (86)	<b>184</b> (24)	<b>157</b> (27)	<b>148</b> (32)	<b>122</b> (33)
Pois	<b>405</b> (54)	<b>461</b> (25)	<b>432</b> (52)	<b>505*</b> (25)	<b>367</b> (35)	<b>391</b> (16)	<b>367</b> (32)	<b>412</b> (34)
Féverole	<b>406</b> (44)	<b>313*</b> (31)	<b>350</b> (22)	<b>414</b> (47)	<b>267</b> (26)	<b>213*</b> (30)	<b>237</b> (35)	<b>294</b> (43)
Lupin	<b>291</b> (40)	<b>269</b> (40)	<b>264</b> (18)	<b>308</b> (44)	<b>269</b> (36)	<b>256</b> (44)	<b>252</b> (26)	<b>261</b> (45)
Vesce Narbonne	<b>257</b> (57)	<b>182</b> (35)	<b>162</b> (60)	<b>175</b> (77)	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Fenugrec	<b>464</b> (182)	<b>567</b> (85)	<b>406</b> (112)	<b>508</b> (89)	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Pois chiche	<b>725</b> (94)	<b>933</b> (249)	<b>1054*</b> (93)	<b>1191*</b> (61)	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Haricot	<b>311</b> (25)	<b>329</b> (12)	<b>286</b> (31)	<b>270</b> (32)	<b>403</b> (19)	<b>412</b> (26)	<b>344*</b> (15)	<b>357*</b> (46)
Soja	<b>542</b> (36)	<b>571</b> (59)	<b>550</b> (31)	<b>619</b> (36)	<b>468</b> (31)	<b>465</b> (16)	<b>445</b> (10)	<b>457</b> (37)

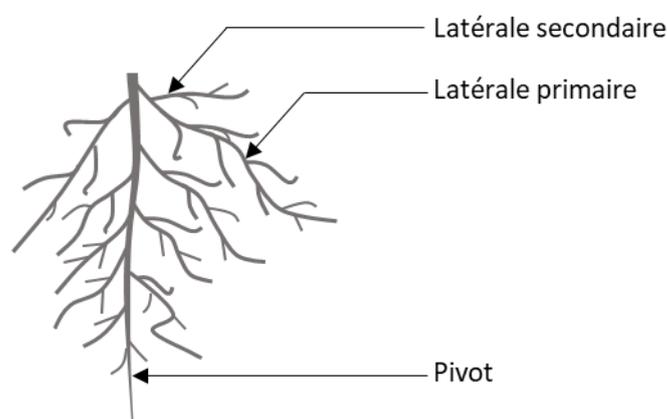
  

	Teneur en N pailles (%)				Teneur en N graines (%)			
	Modalité N				Modalité N			
	0N	50N	150N	300N	0N	50N	150N	300N
Lentille	<b>1.39</b> (0.03)	<b>1.37</b> (0.08)	<b>1.52</b> (0.08)	<b>1.73*</b> (0.26)	<b>4.22</b> (0.10)	<b>3.78*</b> (0.15)	<b>3.68*</b> (0.16)	<b>4.30</b> (0.12)
Vesce commune	<b>1.59</b> (0.32)	<b>1.61</b> (0.09)	<b>1.83</b> (0.15)	<b>2.03*</b> (0.20)	<b>4.93</b> (0.31)	<b>4.73</b> (0.16)	<b>4.71</b> (0.22)	<b>5.16</b> (0.06)
Pois	<b>0.71</b> (0.05)	<b>0.71</b> (0.04)	<b>0.80</b> (0.07)	<b>0.86</b> (0.05)	<b>3.53</b> (0.14)	<b>3.51</b> (0.12)	<b>3.61</b> (0.21)	<b>4.06*</b> (0.11)
Féverole	<b>1.50</b> (0.10)	<b>1.56</b> (0.14)	<b>1.65</b> (0.06)	<b>1.51</b> (0.10)	<b>4.35</b> (0.09)	<b>4.68*</b> (0.11)	<b>4.85*</b> (0.20)	<b>4.94*</b> (0.22)
Lupin	<b>0.68</b> (0.11)	<b>0.66</b> (0.09)	<b>0.65</b> (0.09)	<b>0.58</b> (0.06)	<b>6.27</b> (0.20)	<b>6.75</b> (0.32)	<b>6.52</b> (0.58)	<b>6.37</b> (0.66)
Vesce Narbonne	<b>3.63</b> (0.13)	<b>3.23</b> (0.50)	<b>2.93</b> (0.42)	<b>3.23</b> (0.28)	-	-	-	-
Fenugrec	<b>2.53</b> (0.12)	<b>2.61</b> (0.07)	<b>2.73</b> (0.19)	<b>2.68</b> (0.03)	-	-	-	-
Pois chiche	<b>2.23</b> (0.16)	<b>2.30</b> (0.12)	<b>2.25</b> (0.08)	<b>2.14</b> (0.23)	-	-	-	-
Haricot	<b>1.08</b> (0.05)	<b>0.99</b> (0.04)	<b>1.02</b> (0.05)	<b>1.36*</b> (0.20)	<b>3.12</b> (0.05)	<b>2.84*</b> (0.07)	<b>3.06</b> (0.26)	<b>3.94*</b> (0.14)
Soja	<b>0.61</b> (0.10)	<b>0.50</b> (0.15)	<b>0.55</b> (0.08)	<b>0.68</b> (0.10)	<b>6.99</b> (0.18)	<b>6.84</b> (0.31)	<b>6.59*</b> (0.14)	<b>6.39*</b> (0.08)

#### ANNEXE 4 : Architecture racinaire en rhizotron

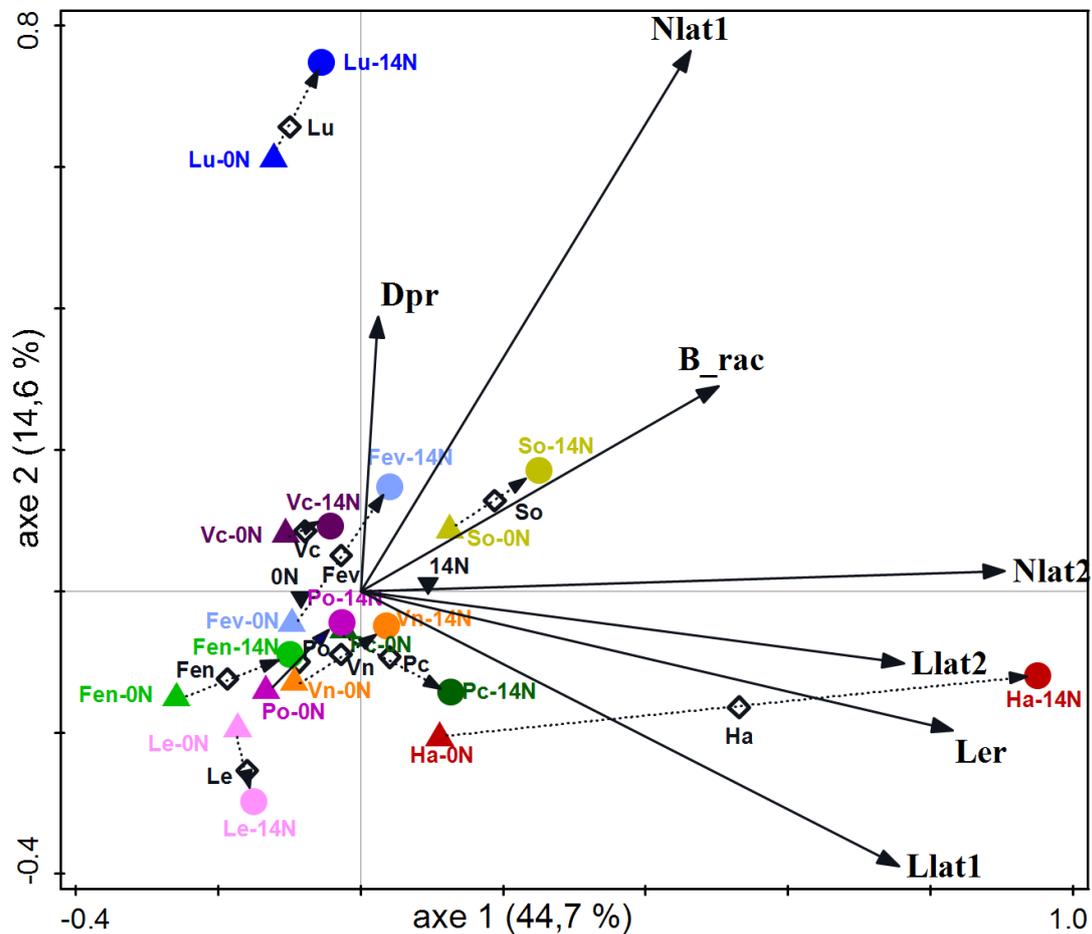
En plus du suivi de la vitesse d'expansion racinaire en largeur et en profondeur, plusieurs traits racinaires simples ont été mesurés sur les dix espèces de légumineuses cultivées en rhizotrons en 2016 avec ( $14 \text{ mmol L}^{-1}$  :14N) ou sans ( $0 \text{ mmol L}^{-1}$  : 0N) azote. Après vingt-sept jours de culture, les racines ont été retirées des rhizotrons de manière à mesurer :

- le nombre de racines latérales primaires sur le pivot
- la longueur de la racinaire latérale primaire la plus longue
- le nombre de racines latérale secondaires sur la racine latérale primaire la plus longue
- la longueur de la racinaire latérale secondaire la plus longue sur la racine latérale primaire la plus longue
- la biomasse sèche racinaire



**Figure A4.1** : Schéma de l'architecture racinaire des légumineuses

Une analyse multidimensionnelle a été effectuée avec le logiciel Canoco 5.10 afin de déterminer la variabilité des traits racinaires entre les espèces de légumineuses et d'étudier la réponse des traits racinaires à la fertilisation azotée (0N et 14N). Les plantes ( $n=80$  ; 10 espèces de légumineuses x 4 répétitions x 2 niveaux de fertilisation azotée), décrites par la valeur des traits racinaires, ont été ordonnées par une analyse de redondance. Les valeurs des traits racinaires ont préalablement été centrées réduites afin d'attribuer le même poids aux différents traits racinaires. Deux facteurs explicatifs (espèce et fertilisation azotée) ainsi que leur interaction (espèces x fertilisation azotée) ont été testés.



**Figure A4.2 :** Biplot de l'analyse de redondance basée sur la matrice des plantes décrites par les traits racinaires. Les flèches définissent les traits racinaires mesurés en rhizotrons : Vitesse d'expansion racinaire en profondeur (**Dpr**) ; Vitesse d'expansion racinaire en largeur (**Ler**), Nombre de racines primaires (**NLat1**), Nombre de racines secondaires sur la racinaire primaire la plus longue (**NLat2**), Longueur de la racinaire primaire la plus longue (**Llat1**), Longueur de la latérale secondaire la plus longue sur la racine latérale primaire la plus longue (**Llat2**) et Biomasse sèche racinaire - Root dry matter (**B\_rac**). Chaque point fait référence à un facteur explicatif : espèce de légumineuse (◇); fertilisation azotée (▼); interaction espèce x fertilisation 0N (▲); interaction espèce x fertilisation 14N (●) Chaque couleur est associée à une espèce de légumineuse : Fenugrec (Fen); Féverole (Fev); Haricot (Ha); Lentille (Le), Lupin (Lu); Pois (Po); Pois chiche (Pc); Soja (So); Vesce commune (Vc); Vesce de Narbonne (Vn). Les flèches en pointillés indiquent la translation du centre de gravité de chaque espèce lorsqu'elles sont fertilisées en azote (14N). Effet de l'espèce – 53,2%, p-value=0,001; effet de la fertilisation azotée – 8,2 %, p-value=0,001; effet de l'interaction espèce x fertilisation azotée – 11,6 %, p-value=0,001.

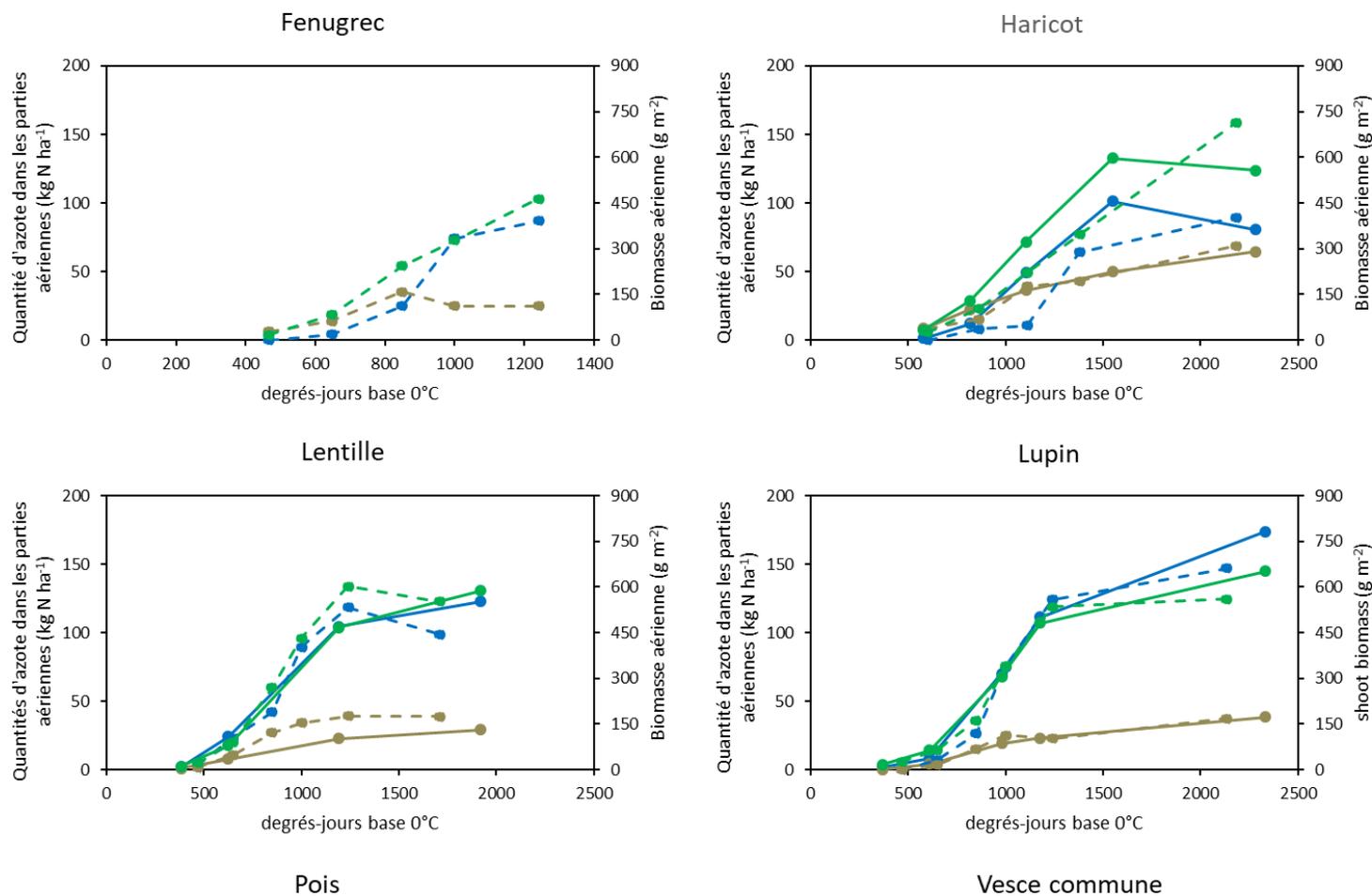
Les premier et deuxième axes de l'analyse de redondance représentent respectivement 44,7 et 14,6 % de la **variabilité totale des traits racinaires**. 71,9 % de la variabilité totale est expliquée par les facteurs explicatifs (espèces, fertilisation azotée et leur interaction). Les espèces de légumineuses seules expliquent 53,2 % de la variabilité totale tandis que la fertilisation azotée explique 8,2 % de la variabilité totale. L'interaction entre les espèces et la fertilisation azotée explique 11,6 % de la variabilité totale. L'analyse de redondance indique une forte corrélation positive entre la vitesse d'expansion racinaire en largeur, le nombre de racines latérales secondaires, et la longueur des racines primaires et secondaires les plus longues. L'ensemble de ces traits racinaires sont positivement corrélés à l'axe 1 tandis que le nombre de racines latérales primaires est positivement corrélé à l'axe 2 de l'analyse de redondance.

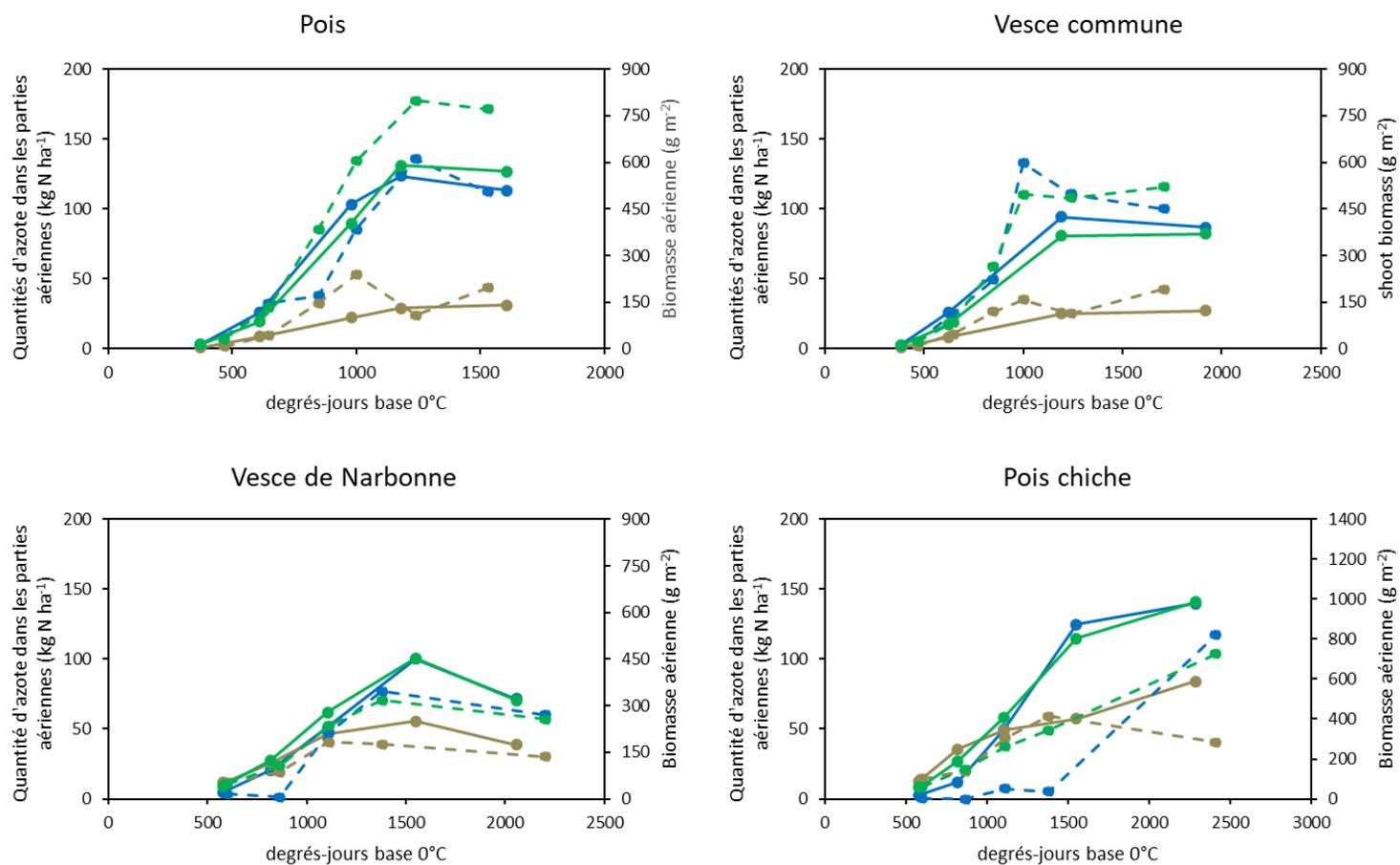
**En l'absence de fertilisation azotée**, les légumineuses étaient caractérisées par des profils racinaires contrastés. Le lupin présentait une architecture racinaire bien spécifique, caractérisée par une grande capacité d'exploration du sol en profondeur et un grand nombre de latérales primaires de petites tailles. Le fenugrec, la féverole, la lentille, le pois, le pois chiche, et la vesce de Narbonne étaient caractérisés par un relativement faible nombre de racines latérales primaires et secondaires de tailles moyennes. La vesce commune présentait un profil racinaire proche de celui des six espèces ci-dessus avec cependant un plus grand nombre de latérales primaires. Le haricot et le soja étaient caractérisés par de longues racines latérales primaires et secondaires, et un grand nombre de racines latérales secondaires. Le soja présentait cependant un plus grand nombre de racines latérales primaires et une plus grande biomasse racinaire par rapport au haricot.

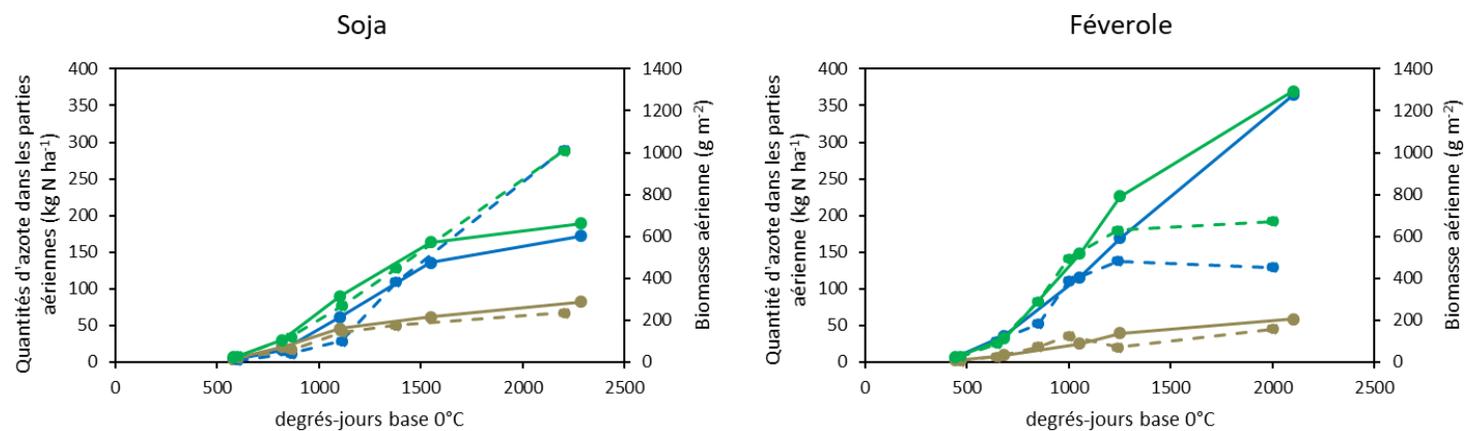
**Des différences marquées de réponse des traits racinaires à la fertilisation azotée** ont pu être mises en évidence, notamment chez le haricot qui répondait le plus fortement à la fertilisation azotée. Le haricot présentait alors un système racinaire très ramifié, avec de longues racines latérales secondaires et la plus grande vitesse d'expansion racinaire en largeur.

## ANNEXE 5 : Dynamique de la biomasse et des quantités d'azote prélevées par les légumineuses

En 2014 et 2016, des prélèvements aériens ont été effectués régulièrement au cours du cycle des légumineuses afin de suivre les dynamiques de biomasse aérienne et des quantités d'azote fixées et prélevées du sol.







**Figure A5** : Dynamique des biomasses et des quantités d'azote aériennes des 10 espèces de légumineuses en fonction des degrés jours base 0°C en 2014 (trait hachuré) et 2016 (trait plein). Biomasse aérienne (vert) ; quantité d'azote issue de la fixation symbiotique (bleu) ; quantité d'azote minéral issue du prélèvement du sol (marron).

## ANNEXE 6 : Estimation des quantités d'azote des résidus aériens en 2014 à partir des incubations et des simulations avec STICS

La quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus aériens en 2014 a été estimée par deux méthodes différentes :

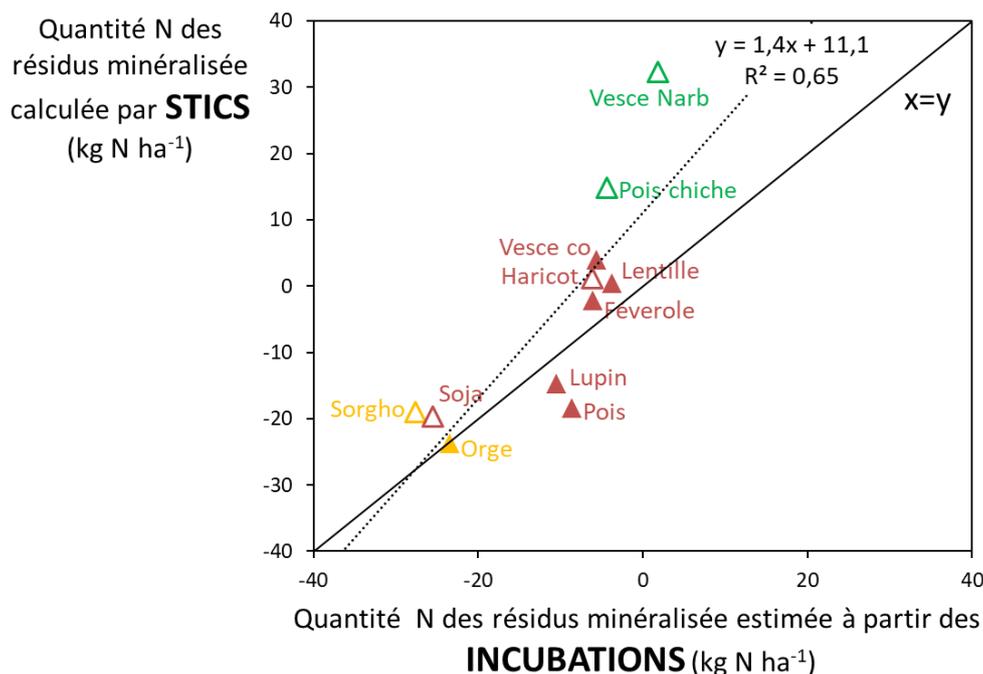
- La première méthode s'est basée sur les **résultats issus des incubations** de résidus aériens en 2014 en conditions de températures et d'humidité contrôlées et sans limitation en azote minéral (voir Chapitre 2). A partir du concept des jours normalisés, il a été estimé que 28 jours à 28°C en incubations correspondaient environ à 10 mois en conditions au champ en Bourgogne (voir Chapitre 2), soit quasiment la durée entre la date d'enfouissement des résidus de culture (septembre - octobre) et la récolte du blé suivant (début juillet). Ainsi, à partir des incubations, la quantité d'azote potentielle issue de la minéralisation des résidus aériens (QNres\_min) a été calculée de la façon suivante :

$$QNres_{min} = QNres_{champ} \times \%Nres_{min}$$

Avec QNres\_champ la quantité d'azote dans les résidus aériens des précédents légumineuses et céréales mesurée au champ à maturité en 2014 et %Nres\_min la proportion d'azote des résidus aériens minéralisée après 28 jours à 28°C en incubation.

- La quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus aériens en 2014 a également été calculée à partir de **simulations avec le modèle STICS** en prenant en compte les conditions climatiques du champ et en se basant sur le rapport C/N des résidus (voir Fig.S1 Chapitre 3, p 130).

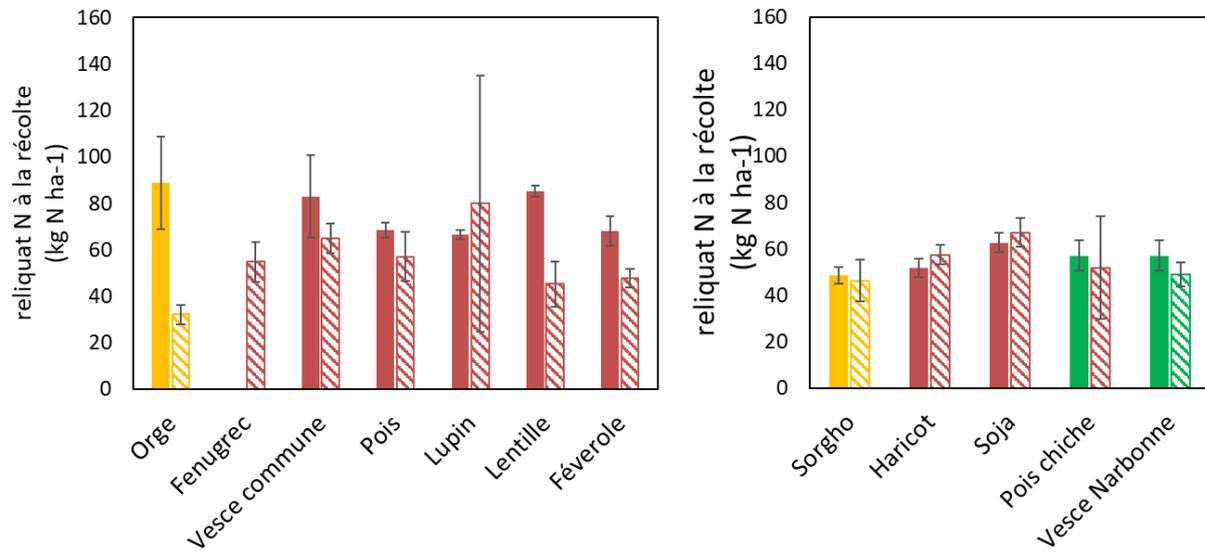
La figure suivante confronte les quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus aériens estimées à partir des incubations à celles calculées à partir des simulations de STICS.



**Figure A6** : Comparaison des quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus aériens en 2014 estimées à partir des incubations et calculées à partir de STICS, pour les dix espèces de légumineuses et les deux espèces de céréales. Résidus aériens des céréales (jaune) ; résidus aériens des légumineuses pour lesquelles il y a une récolte des graines (rouge) ; résidus aériens des légumineuses pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines en 2014 (vert) ; précédents printemps (▲) ; précédents été (△) La ligne pleine représente la droite 1:1.

La comparaison des deux méthodes de calcul, met en avant une surestimation des quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus aériens par STICS par rapport à celles estimées à partir des incubations pour les légumineuses sans production de graines (points verts). Au contraire, des quantités d'azote légèrement plus faibles ont été calculées par STICS pour le pois et le lupin par rapport aux quantités estimées à partir des incubations. Malgré les quelques différences entre les deux méthodes de calcul des quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus aériens, le classement entre les espèces est relativement bien maintenu entre les deux méthodes de calcul.

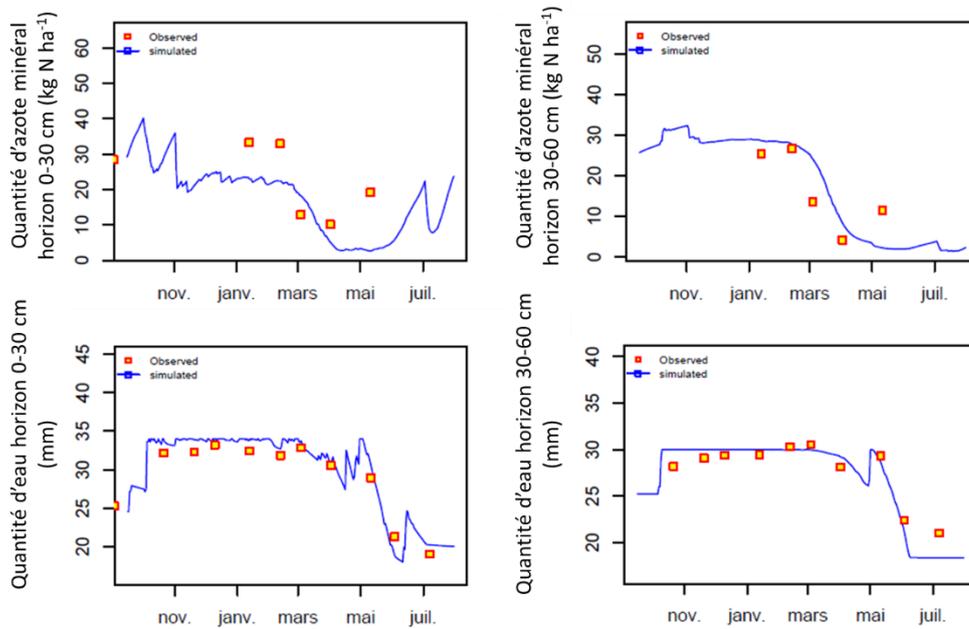
## ANNEXE 7 : Reliquats azotés post récolte des légumineuses et des céréales



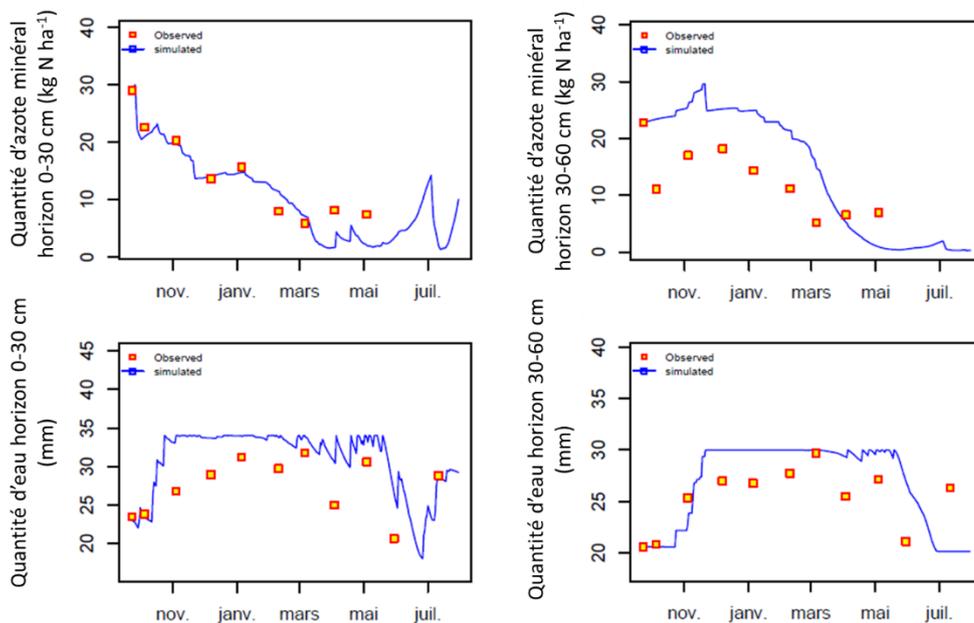
**Figure A7** Reliquats azotés post récolte des légumineuses et des céréales en 2014 (barres pleines) et 2016 (barres hachurées). Céréales : jaune ; légumineuses pour lesquelles il y a une récolte des graines : rouge ; légumineuses pour lesquelles il n'y a pas eu de production de graines en 2014 : vert.

## ANNEXE 8 : Exemple des dynamiques de quantités d'eau et d'azote du sol observées et simulées par STICS pour le précédent pois chiche

### Expérimentation 2014-2015



### Expérimentation 2016-2017



**Figure A8** : Dynamiques de quantités d'eau et d'azote minéral du sol observées et simulées par STICS entre la récolte du pois chiche et la récolte du blé suivant pour l'expérimentation I (2014-2015) et l'expérimentation II (2016-2017).

## ANNEXE 9 : Flux azotés induits par les précédents légumineuses et céréales

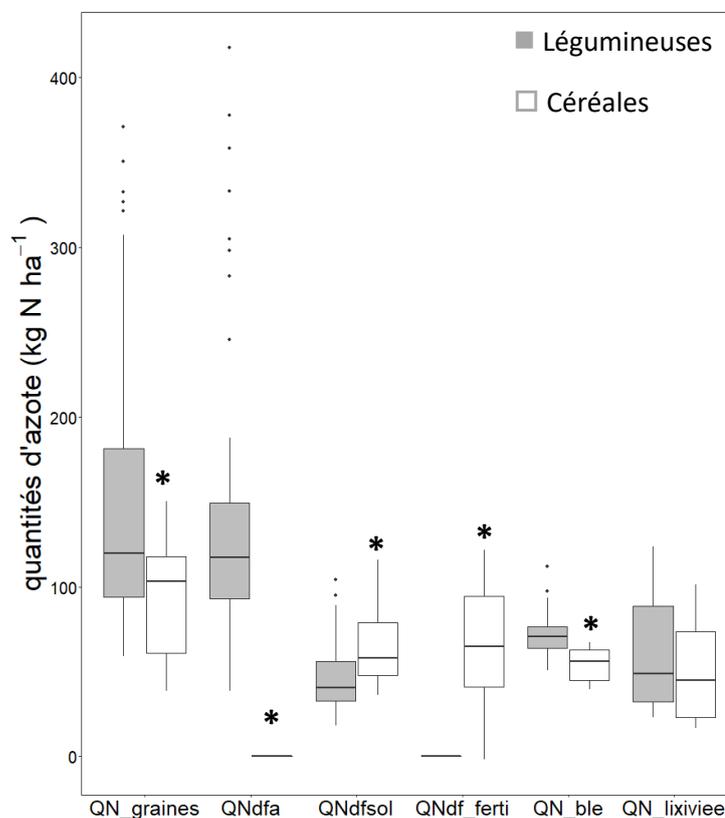
Neuf espèces de légumineuses ont été cultivées en 2014 et 2016 en l'absence de fertilisation azotée. En 2016, une dixième espèce, le fenugrec, a été semée. Afin de comparer les flux azotés induits par les légumineuses à ceux de céréales, deux céréales ont également été semées en 2014 et 2016 ; de l'orge et du sorgho. Une fertilisation azotée raisonnée a été appliquée aux deux céréales (orge : 135 kg N ha<sup>-1</sup> en 2014 et 75 kg N ha<sup>-1</sup> en 2016, sorgho 100 kg N ha<sup>-1</sup> en 2014 et 2016). Une fois les graines récoltées, les résidus de culture des légumineuses et des céréales ont été broyés et enfouis dans le sol. Les graines n'ont cependant pas été récoltées pour la vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et pour le pois chiche en 2014, du fait de conditions climatiques non favorables à la production de graines pour ces espèces. A l'automne, un blé d'hiver, conduit sans fertilisation azotée, a été semé à la suite de tous les précédents légumineuses et céréales. Le blé a ensuite été récolté en juillet de l'année suivante (2015 et 2017).

Plusieurs flux azotés induits par les dix légumineuses et les deux céréales ont été quantifiés à l'issue des deux d'expérimentations au champ. Il s'agit de :

- La quantité d'azote exportée par les graines (**QN\_graines**), qui a été mesurée à maturité des légumineuses et des céréales en 2014 et 2016 ;
- La quantité d'azote dans les parties aériennes des légumineuses, issue du processus de fixation symbiotique (**QNdfa**). Ce flux a été mesuré à maturité des légumineuses en 2014 et 2016 ;
- La quantité d'azote minéral du sol prélevée par les légumineuses et les céréales durant leur cycle (**QNdfsol**). Ce flux a été mesuré à maturité des légumineuses et des céréales en 2014 et 2016. Pour les céréales, l'azote minéral issu du sol (QNdfsol) a été distingué de l'azote issu du fertilisant (**QNdf\_ferti**). Pour y parvenir une modalité avec les mêmes céréales non fertilisées en azote a été utilisée. La quantité d'azote issue du fertilisant (QNdf\_ferti) a été calculée comme étant la différence entre la quantité totale d'azote dans les céréales fertilisées et la quantité d'azote dans les céréales non fertilisées ;
- La quantité totale d'azote dans les parties aériennes du blé non fertilisé (**QN\_blé**) cultivé après les légumineuses et céréales. Ce flux a été mesuré à maturité du blé en 2015 et 2017.
- La quantité d'azote lixiviée (**QN\_lixiviée**) entre la récolte des précédents légumineuses et céréales et la récolte du blé l'année suivante a été estimée par modélisation avec le modèle STICS pour les dix précédents légumineuse et les deux céréales fertilisées en azote, et pour les deux expérimentations au champ.

En moyenne les légumineuses exportent plus d'azote dans les graines par rapport aux céréales (QN\_graines) et génèrent de plus grandes quantité d'azote dans le blé suivant (QN\_blé). Au contraire, les légumineuses ont tendance à prélever de plus faibles quantités d'azote minéral du

sol (QNdfsol). Les légumineuses se distinguent également des céréales par leur mode de nutrition azotée puisque leurs besoins azotés sont comblés par la fixation symbiotique (QNdfa) tandis que les besoins azotés des céréales sont compensés par le prélèvement d'azote apporté par fertilisation (QNdf\_ferti)



**Figure A9:** Box plot des différents flux azotés mesurés sur les dix précédents légumineuses et les deux précédents céréales au cours des deux expérimentations au champ de deux ans (2014 - 2015 et 2016 - 2017).

Quantité d'azote exportée par les graines (**QN\_graines**) ; quantité d'azote dans les parties aériennes des légumineuses, issue du processus de fixation symbiotique (**QNdfa**) ; quantité d'azote dans les parties aériennes des légumineuses et céréales issue du prélèvement de l'azote minéral du sol (**QNdfsol**) ; quantité d'azote dans les parties aériennes des céréales issue du fertilisant (**QNdf\_ferti**) ; quantité d'azote dans les parties aériennes du blé non fertilisé (**QN\_ble**) ; quantité d'azote lixiviée entre la récolte des précédents légumineuses et céréales et la récolte du blé l'année suivante (**QN\_lixiviee**).

Pour le flux QN\_graines seules les espèces de légumineuses avec une production de graines ont été prises en compte. Pour chacun des flux azotés, \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les légumineuses et les céréales.

## ANNEXE 10 : Article Innovations Agronomiques

**Fixation symbiotique de l'azote et effet précédent : toutes les légumineuses à graines se valent-elles ?**Guinet M.<sup>1</sup>, Nicolardot B., Durey V., Revellin C., Lombard E., Pimet E., Bizouard F., Voisin A.-S.<sup>1</sup> Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne, Univ. Bourgogne Franche Comté, F-21000 Dijon**Correspondance** anne-sophie.voisin@inra.fr**Résumé**

Les légumineuses ont un rôle majeur à jouer dans la transition vers une agriculture plus durable, en réduisant notamment le recours aux intrants azotés du fait de leurs propriétés spécifiques vis-à-vis du cycle de l'azote. Pourtant peu de références sont disponibles pour une diversité d'espèces quant à leurs performances agronomiques et aux flux d'azote qu'elles induisent. Une étude comparative sur dix espèces de légumineuses à graines a été menée afin i) de quantifier la fixation symbiotique, ii) d'évaluer sa réponse à la présence d'azote minéral du sol, et iii) de quantifier l'effet des légumineuses sur le rendement d'un blé suivant (non fertilisé) en lien avec la minéralisation de leurs résidus de culture. Pour neuf espèces sur dix la fixation symbiotique a permis d'assurer une croissance et une nutrition azotée des plantes aussi bonnes qu'avec une nutrition basée sur le prélèvement d'azote minéral. Des différences d'inhibition de la fixation symbiotique par l'azote minéral ont été mises en évidence et ont été partiellement expliquées par des différences d'efficacité de prélèvement de l'azote minéral entre les espèces. Ces différences ont été corrélées à des différences de vitesse d'expansion latérale des racines entre les espèces. La grande majorité des légumineuses a engendré des rendements de blé supérieurs à ceux de blés cultivés après des céréales. La variabilité des rendements du blé a en partie pu être liée à la minéralisation de l'azote des résidus, variable entre espèces selon leur rapport carbone / azote. Cependant l'azote fourni au sol par les légumineuses peut être perdu pendant la période d'interculture, avant que cet azote ne soit prélevé par la culture suivante. Ce risque augmente pour les espèces de légumineuses récoltées en été contrairement au début automne, du fait d'une interculture plus longue.

**Mots-clés** : Nutrition azotée, Azote minéral, Résidus de culture, Minéralisation, Lixiviation**Abstract: Symbiotic nitrogen fixation and pre-crop effect : are all grain legumes the same?**

Legumes should play a key role in the transition towards a more sustainable agriculture by allowing a reduction of nitrogen inputs due to their specific properties relative to the nitrogen cycle. However, there is a lack of references for a wide diversity of species regarding their agronomic performances and the nitrogen fluxes they induce. A comparative study on ten grain legumes was conducted to i) quantify symbiotic nitrogen fixation, ii) evaluate its response to inorganic soil nitrogen, and iii) quantify the effect of legumes on the yield of the subsequent wheat (unfertilised) as related to the N mineralisation of their crop residues. For nine species out of ten, symbiotic fixation was able to ensure plant growth and nitrogen acquisition at levels similar to those achieved by nutrition based on inorganic nitrogen. Differences in symbiotic fixation inhibition were observed and were partially explained by differences in inorganic nitrogen uptake efficiency among species. Those differences were related to differences in root lateral expansion rate among species. The great majority of legumes led to higher wheat yields compared to those of wheat cultivated after cereals. Wheat yield variability was partially related to differences in crop residue nitrogen mineralisation among species according to their carbon /nitrogen ratio. However, nitrogen supplied to the soil by legumes can be lost during the fallow period before nitrogen is retrieved by the subsequent crop. This risk increases with legumes harvested in summer vs. beginning of autumn, because of a longer fallow period.

**Keywords:** Nitrogen nutrition, Inorganic N, Crop residues, Mineralization, Leaching

## Introduction

Les légumineuses ont la capacité unique de fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*. Cette association symbiotique, coûteuse en énergie pour la plante, n'a lieu qu'en situation de faible disponibilité en azote minéral. Ainsi, les légumineuses reposent leur nutrition azotée à la fois sur la fixation symbiotique et sur le prélèvement d'azote minéral par leurs racines quand celui-ci est disponible (Voisin et al., 2002). Par ailleurs, les légumineuses sont connues pour fournir de l'azote au sol via leurs résidus de culture riches en azote. Les rendements des céréales précédées de légumineuses sont en général supérieurs à ceux des céréales précédées de céréales ou d'oléagineux (Preissel et al., 2015). Une partie de cet effet pourrait être lié aux flux d'azote générés par les cultures de légumineuses. Une diversité d'espèces de légumineuses adaptées à de nombreuses conditions pédoclimatiques existe et pourrait contribuer à améliorer la durabilité des agrosystèmes, notamment en réduisant le recours aux intrants azotés, non seulement pendant la culture des légumineuses, mais également après leur culture du fait de leur effet positif sur la disponibilité en azote du sol qui permet de réduire la fertilisation de la culture suivante (Voisin et al., 2014 ; Carroué et al., 2012). Néanmoins, ces propriétés spécifiques vis-à-vis du cycle de l'azote sont souvent insuffisamment prises en compte dans la gestion des systèmes de culture. Enfin, peu de références sont disponibles sur une diversité d'espèces et leur comparaison reste difficile sur la base des études existantes, compte tenu des différences entre les conditions expérimentées (Herridge et al., 2008). L'introduction de légumineuses dans les systèmes de culture peut également engendrer des impacts négatifs sur l'environnement liés à la gestion de l'azote, car il existe des risques de pertes de l'azote minéral, essentiellement par lixiviation, pendant le cycle des légumineuses et/ou durant la période automne-hiver suivant leur récolte.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a consisté à comparer, dans un premier temps, l'effet de l'azote minéral sur l'accumulation d'azote par dix espèces de légumineuses et comprendre les différences d'inhibition de la fixation symbiotique par l'azote minéral entre les espèces. Pour y parvenir, des traits caractérisant les processus d'accumulation de l'azote et de prélèvement de l'azote minéral ont été mesurés et utilisés comme facteurs explicatifs des variations observées entre espèces. Un deuxième objectif a été de quantifier l'effet précédent des dix espèces de légumineuses sur le rendement du blé suivant en comparaison à deux précédents céréales et à identifier les déterminants des différences entre les précédents légumineuses et céréales. Enfin un troisième objectif a consisté à estimer les pertes d'azote minéral par lixiviation entre la récolte des légumineuses et la sortie de l'hiver l'année suivante.

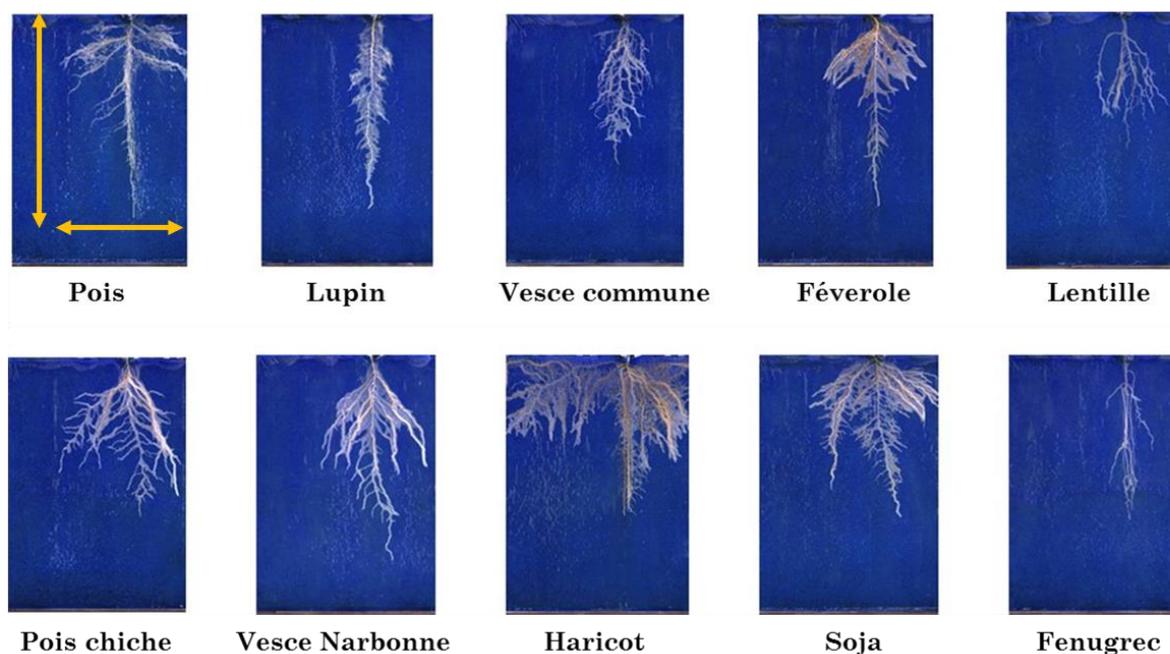
## 1. Matériels et méthodes

### 1.1 Effet de la fertilisation azotée sur la croissance et la fixation symbiotique

Un essai au champ a été mis en place en 2014 à l'unité expérimentale INRA de Bretenière, près de Dijon (21). Dix espèces de légumineuses et deux céréales ont été semées en mars (féverole, lentille, lupin, pois, vesce commune et orge) ou en mai (fenugrec, haricot, pois chiche, soja, vesce de Narbonne et sorgho). Les légumineuses ont été inoculées au semis avec une souche de rhizobium spécifique à chaque espèce et préalablement testée au cours d'un essai en serre afin d'assurer une bonne efficacité de la fixation symbiotique. Différents niveaux de fertilisation azotée (0, 50, 150 et 300 kg N ha<sup>-1</sup>) ont été appliqués au semis sous forme de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ; de plus, un marquage au <sup>15</sup>N a été réalisé afin de mesurer la fixation symbiotique. Les parties aériennes ont été récoltées à maturité pour des mesures de biomasse, de teneurs en azote total et en isotope <sup>15</sup>N afin de calculer la quantité d'azote prélevée par les espèces, ainsi que le pourcentage de cet azote issu de la fixation symbiotique (%Ndfa) en utilisant la méthode de dilution isotopique (Voisin et al., 2002).

### 1.2 Vitesses d'expansion racinaire

En parallèle, un essai mené en serre en 2016 dans des rhizotrons de la plateforme INRA de phénotypage 4PMI de Dijon (Jeudy et al., 2016). Ces dispositifs permettent d'observer l'architecture des racines et la dynamique de leur développement, grâce à des prises d'image au cours du temps (Figure 1). La vitesse d'expansion horizontale (en largeur : VitExpLarg) et verticale (en profondeur : VitExpProf) de chacune des dix espèces de légumineuses a ainsi été calculée, en utilisant les images successives prises au cours de leur croissance.



**Figure 1** : Images de systèmes racinaires des espèces cultivées en Rhizotrons, 21 jours après le semis et fertilisées avec 14 mmol N L<sup>-1</sup>.

### *1.3 Effet précédent et modélisation de la minéralisation des résidus et des pertes par lixiviation*

Deux essais bisannuels ont également été mis en place. La première année de chaque essai (2014 et 2016), dix précédents légumineuses non fertilisés en azote et deux précédents céréales faiblement fertilisés ont été implantés en mars ou en mai selon la physiologie de chaque espèce (Tableau 1). A maturité physiologique, les graines ont été récoltées sauf pour la vesce de Narbonne en 2014 et 2016 et le pois chiche en 2014 du fait de conditions climatiques non favorables à la production de graines. Les pailles ont été broyées et enfouies dans le sol, et un blé a été semé en octobre, puis récolté en juillet de l'année suivante (2015 et 2017) (Tableau 1).

Des ratios de rendements du blé ont été calculés pour les deux expérimentations (I et II) afin de comparer le rendement du blé cultivé après les légumineuses de printemps avec ceux du blé cultivé après de l'orge et pour comparer le rendement du blé cultivé après les légumineuses d'été avec ceux du blé cultivé après du sorgho.

$$\text{ratio rendement du blé} = \frac{\text{rendement du blé cultivé après une légumineuse (printemps ou été)}}{\text{rendement du blé cultivé après une céréale (orge ou sorgho)}}$$

Des ratios supérieurs à 1 indiquent que le rendement du blé cultivé après des légumineuses est supérieur à celui du blé cultivé après une céréale.

A partir de l'expérimentation I (2014-2015), des simulations avec le modèle STICS ont été effectuées afin d'estimer les quantités d'azote issues de la minéralisation des résidus de culture après leur enfouissement dans le sol, ainsi que les quantités d'azote issues de la minéralisation du sol entre la récolte des légumineuses et la récolte du blé suivant. Les quantités d'azote perdues par lixiviation entre la récolte des légumineuses et la sortie d'hiver du blé (fixée au 1<sup>er</sup> mars 2015) ont également été estimées par simulation.

La quantité d'azote totale disponible pour le blé suivant a été calculée de la façon suivante

$$N \text{ disponible pour le blé} = N_{\text{reliquat}} + N_{\text{min sol}} + N_{\text{min residus}} - N_{\text{lixivié}}$$

Avec la quantité d'azote minéral du sol à la récolte des précédents ( $N_{\text{reliquat}}$ ), la quantité d'azote totale issue de la minéralisation du sol ( $N_{\text{min sol}}$ ), de la minéralisation des résidus ( $N_{\text{min residus}}$ ), et la quantité d'azote perdue par lixiviation ( $N_{\text{lixivié}}$ ) entre la récolte des légumineuses et la récolte du blé suivant.

**Tableau 1** : Gestion des précédents culturaux et du blé dans les expérimentations I et II.

Précédents culturaux	Semis des précédents	Récolte des précédents	Incorporation des résidus dans le sol	Semis du blé	Récolte du blé
<b>Expérimentation I (2014 - 2015)</b>					
Féverole		25 juillet 2014			
Lentille		11 juillet 2014			
Lupin	18 Mars 2014	1 août 2014	21 août 2014	20 octobre 2014	6 juillet 2015
Pois	(printemps)	1 juillet 2014			
Vesce commune		11 juillet 2014			
Orge +N (135 kg N ha <sup>-1</sup> )		15 juillet 2014			
Haricot		4 septembre 2014			
Pois chiche	5 Mai 2014	16 septembre 2014	3 octobre 2014	20 octobre 2014	6 juillet 2015
Soja	(été)	5 septembre 2014			
Vesce de Narbonne		5 septembre 2014			
Sorgho +N (100 kg N ha <sup>-1</sup> )		5 septembre 2014			
<b>Expérimentation II (2016 - 2017)</b>					
Fenugrec		2 août 2016			
Féverole		2 août 2016			
Lentille	15 Mars 2016	27 juillet 2016	2 septembre 2016	24 octobre 2016	6 juillet 2017
Lupin	(printemps)	12 août 2016			
Pois		13 juillet 2016			
Vesce commune		27 juillet 2015			
Orge +N (75 kg N ha <sup>-1</sup> )		20 juillet 2016			
Pois chiche		12 septembre 2016			
Haricot	17 Mai 2016	12 septembre 2016	27 septembre 2016	24 octobre 2016	6 juillet 2017
Vesce Narbonne	(été)	1 septembre 2016			
Soja		12 septembre 2016			
Sorgho +N (100 kg N ha <sup>-1</sup> )		14 septembre 2016			

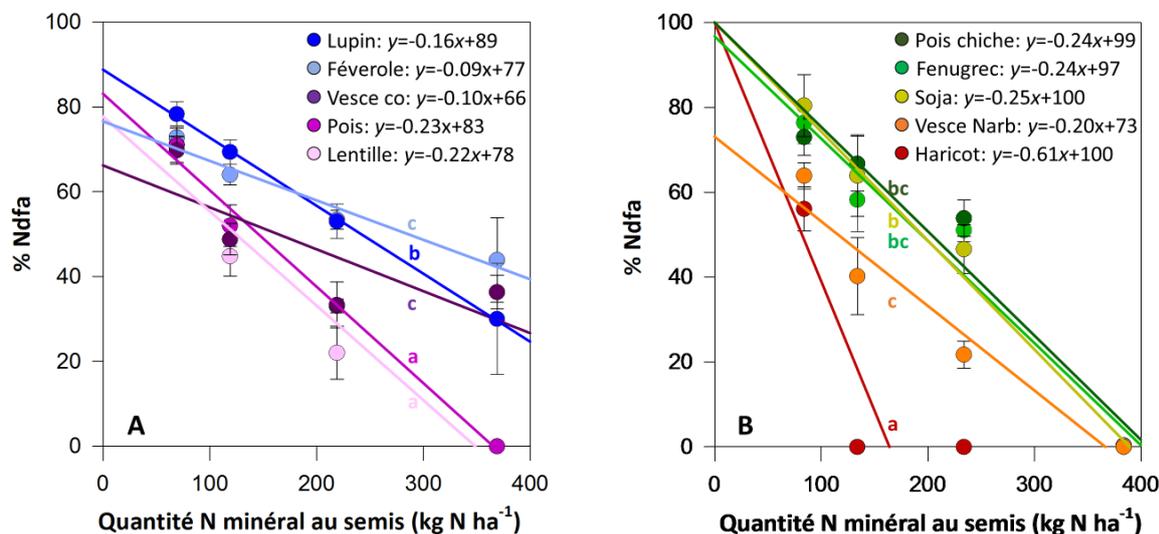
## 2. Effet de l'azote minéral disponible au semis sur la fixation symbiotique et la croissance des légumineuses

### 2.1 Réponse de la fixation symbiotique à l'azote minéral

De manière à mesurer l'effet de la disponibilité en azote minéral du sol au semis sur la fixation symbiotique pour les 10 espèces de légumineuses, le pourcentage d'azote issu de la fixation symbiotique (%Ndfa) a été représenté en fonction de la quantité d'azote minéral du sol disponible au semis des légumineuses. Cette quantité correspond à la somme du reliquat azoté au semis dans les 60 premiers centimètres du sol (69 kg N ha<sup>-1</sup> pour le semis de mars et 84 kg N ha<sup>-1</sup> pour le semis de mai) et de la quantité d'azote apportée par fertilisation.

En absence de fertilisation azotée, le pourcentage de fixation symbiotique (par rapport à l'accumulation totale d'azote) (%Ndfa) a varié entre 70 % (vesce commune) et 78 % (lupin) pour les espèces semées en mars, et entre 56 % (haricot) et 80 % (soja) pour les espèces semées en mai (Figure 2). La quantité d'azote fixée a varié de 99 kg N ha<sup>-1</sup> (lentille) à 147 kg N ha<sup>-1</sup> (lupin) pour les espèces semées en mars, et de 60 kg N ha<sup>-1</sup> (Vesce de Narbonne) à 290 kg N ha<sup>-1</sup> (soja) pour les espèces semées en mai. Les variations entre espèces dépendent à la fois du potentiel d'accumulation d'azote spécifique à chaque espèce, et des conditions climatiques, qui ensemble, déterminent le niveau de croissance.

Pour toutes les espèces étudiées, on observe **une diminution du taux de fixation symbiotique avec le niveau de fertilisation azotée** (Figure 2). Comme cela a été observé auparavant sur quelques espèces, ce résultat indique un prélèvement préférentiel de l'azote minéral par les légumineuses. Le déclenchement de la fixation symbiotique a lieu lorsque le niveau de disponibilité en azote minéral devient insuffisant pour subvenir aux besoins en azote de la plante (Voisin et al., 2002). Cette régulation optimise le coût énergétique élevé de la fixation pour la plante, notamment pour la formation et l'entretien des nodosités, organes hôtes de la symbiose (Voisin et al., 2003).



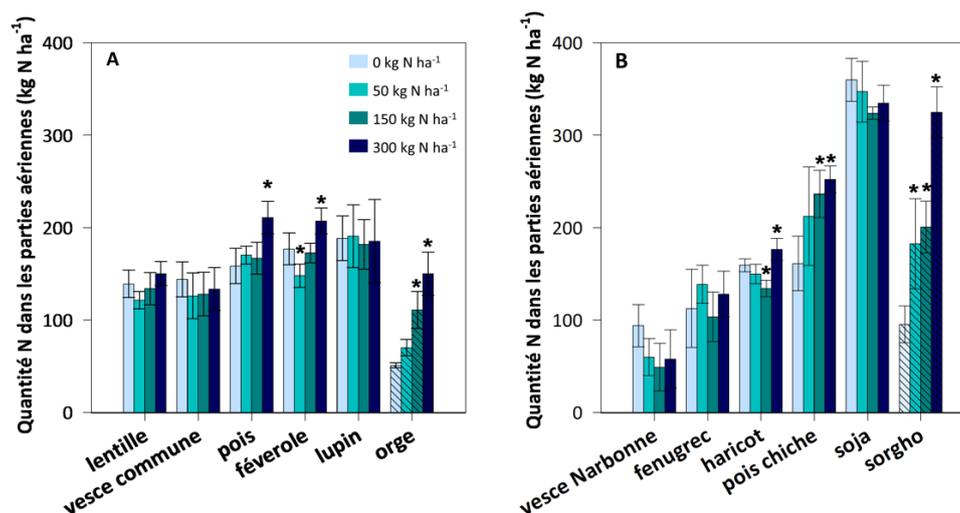
**Figure 2** : Réponse du pourcentage de fixation symbiotique (%Ndfa) à la disponibilité en azote minéral au semis (correspondant à l'apport d'azote par fertilisation et à l'azote minéral disponible au semis (69 kg N ha<sup>-1</sup> pour le semis de mars 2014 (A) et 84 kg N ha<sup>-1</sup> pour le semis de mai 2014 (B)). Figure adaptée de Guinet et al. (2018).

Néanmoins, l'intensité de la réponse de la fixation à l'azote (indiquée par la pente de la régression linéaire), est très variable entre espèces (Figure 2). Pour les espèces semées en mars, la fixation symbiotique du pois et de la lentille est nulle pour les valeurs d'apport d'azote très élevées (300 kg N ha<sup>-1</sup>), alors que le lupin et la féverole maintiennent leur fixation symbiotique à 30 et 44 %, respectivement. Pour les espèces semées en mai, la fixation symbiotique est nulle pour toutes les espèces pour le niveau de fertilisation le plus élevé (300 kg N ha<sup>-1</sup>) (fenugrec, soja, pois chiche, vesce de Narbonne), alors que pour le haricot, la fixation est totalement inhibée pour des niveaux de disponibilité en azote minéral plus faibles (traitement 50 kg N ha<sup>-1</sup>).

## 2.2 La fixation symbiotique permet-elle de répondre aux besoins azotés de la plante ?

**En l'absence de fertilisation azotée**, la quantité totale d'azote accumulée dans les parties aériennes des légumineuses a variée entre 94 kg N ha<sup>-1</sup> (Vesce de Narbonne) et 360 kg N ha<sup>-1</sup> (Soja) (Figure 3).

Contrairement aux céréales, la fertilisation azotée n'a pas eu d'effet sur la quantité d'azote totale prélevée par les légumineuses (lentille, lupin, vesce commune, fenugrec, soja et vesce de Narbonne) ou a engendré une faible augmentation lorsque 300 kg N ha<sup>-1</sup> était apporté au semis (féverole, haricot, pois), indiquant **une complémentation totale du prélèvement d'azote minéral du sol par la fixation symbiotique** pour ces espèces (Figure 3). Seul le pois chiche a fortement répondu à la fertilisation azotée avec une augmentation graduelle de la quantité d'azote accumulée avec le niveau de fertilisation (+ 57 % pour le traitement 300 kg N ha<sup>-1</sup> par rapport au traitement 0 kg N ha<sup>-1</sup>). Pour cette espèce, des observations complémentaires ont indiqué une mise en place tardive de la fixation symbiotique, ayant conduit à une carence azotée qui a limité la croissance pour les faibles niveaux de fertilisation azotée. Les conditions très sèches du sol au moment du semis de mai en 2014, combinées à une potentielle sensibilité de la souche de rhizobium aux conditions sèches peuvent être à l'origine du délai de mise en place de la fixation symbiotique pour le pois chiche dans nos conditions expérimentales. Cet exemple souligne l'importance d'assurer la présence de souches spécifiques de *Rhizobium* dans le sol et d'optimiser leur efficacité afin d'assurer la fixation symbiotique.



**Figure 3** : Quantités totales d'azote accumulées dans les parties aériennes à la récolte pour les espèces semées en mars (A) et en mai (B) en 2014. Un astérisque indique pour chaque espèce les traitements de fertilisation azotée pour lesquels la quantité d'azote dans les parties aériennes est significativement différente du traitement non fertilisé en azote (0 kg N ha<sup>-1</sup>). Figure adaptée de Guinet et al. (2018).

### 2.3 Analyse des différences de réponse de la fixation symbiotique à l'azote minéral du sol

Afin d'expliquer les différences de réponse de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral du sol, nous avons cherché à quantifier et dé-corréler deux facteurs majeurs qui modulent la quantité d'azote fixée : (i) l'accumulation d'azote dans les parties aériennes de la plante qui définit la taille du « puits » en azote (ou les besoins en azote de la plante) et ii) l'efficacité de prélèvement de l'azote minéral disponible dans le sol, qui module la taille du pool d'azote minéral directement disponible pour la plante (en tant que source d'azote), et par conséquent la quantité d'azote restant à fixer pour satisfaire les besoins en azote de la plante.

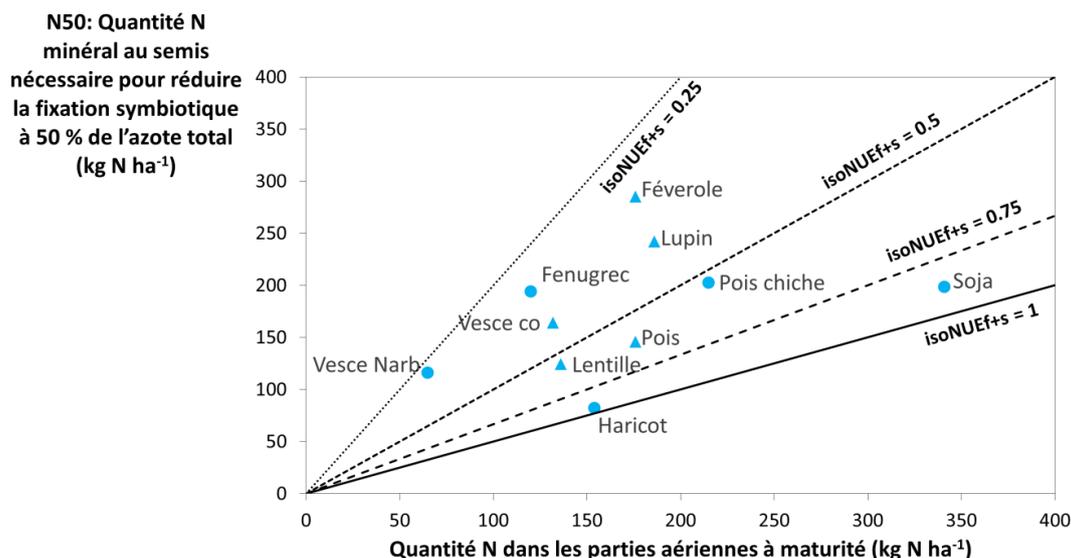
Pour y parvenir, un indicateur d'intensité de réponse de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral du sol (N50) a été calculé à partir des pentes de régression de la Figure 2, comme la quantité d'azote minéral présente au semis engendrant un pourcentage d'azote issu de la fixation symbiotique (%Ndfa) égal à 50 % (N50). Cet indicateur (Figure 4 ; en ordonnée) a varié entre 82 et 285 kg N ha<sup>-1</sup> entre le haricot et la féverole, indiquant une inhibition de la fixation symbiotique pour le haricot pour des niveaux d'azote minéral bien plus faibles que la féverole.

Globalement, **il existe une relation positive entre l'indicateur N50 et la quantité totale d'azote accumulée** par l'espèce (Figure 4). Ainsi, la faible valeur de N50 de la vesce de Narbonne est associée aux faibles quantités d'azote accumulées par cette espèce par rapport aux espèces comme le soja ou le pois chiche, qui accumulent beaucoup plus d'azote dans leurs parties aériennes.

Cependant cette relation n'explique qu'une partie de la variabilité de réponse de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral du sol entre les espèces de légumineuses. Pour un niveau donné d'accumulation d'azote par la plante, les différences entre espèces peuvent s'expliquer par des **différences d'efficacité de prélèvement d'azote minéral dans le sol par les racines** (NUEf+s) (Figure 4). L'indicateur NUEf+s a été calculé comme le rapport entre la quantité d'azote minéral prélevée par la plante lorsqu'elle repose à 50 % sur la fixation symbiotique (moitié de la quantité d'azote totale dans les parties aériennes à maturité) et la quantité d'azote minéral disponible au semis nécessaire pour réduire la fixation symbiotique à 50 % (N50). Cette efficacité peut être visualisée sur la graphique pour chaque espèce par sa position par rapport aux courbes d'iso – efficacité de prélèvement de l'azote minéral (isoNUEf+s ; Figure 4).

Ainsi, par exemple, pour le pois et la féverole, espèces ayant accumulé des quantités similaires d'azote (autour de 175 kg N.ha<sup>-1</sup>), les valeurs contrastées de N50 entre ces deux espèces (150 et 280 kg ha<sup>-1</sup>) s'expliquent par des

différences d'efficacité de prélèvement d'azote minéral, avec la féverole qui présente une efficacité très faible (entre 0,25 et 0,5) par rapport au pois qui présente une efficacité proche de 0,75.

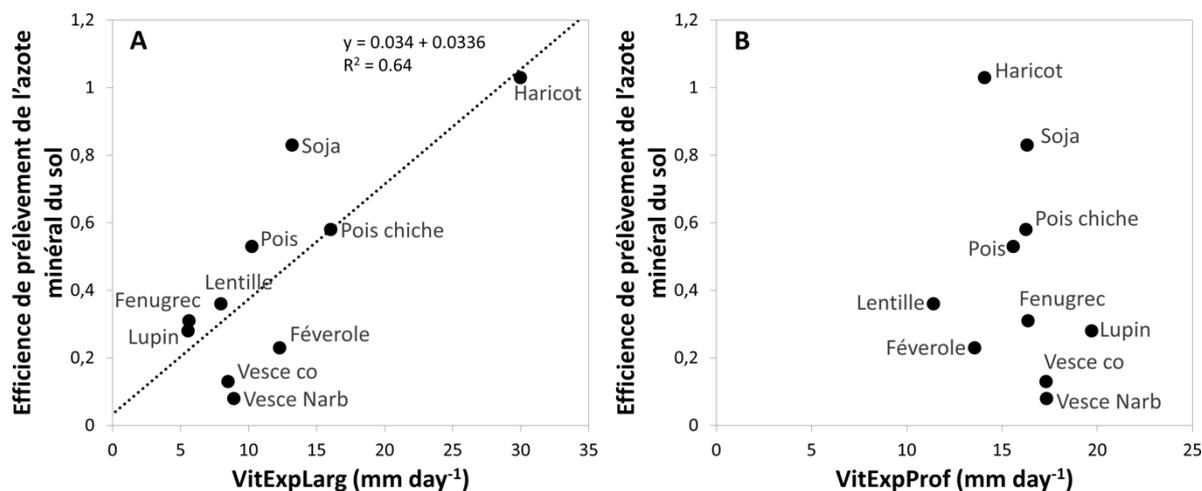


**Figure 4** : Réponse de l'indicateur N50 à la quantité d'azote accumulée dans les parties aériennes à la récolte. L'efficacité de prélèvement de l'azote minéral (NUEf+s) a été calculée ici comme le rapport entre la quantité d'azote minéral prélevée par la plante lorsqu'elle repose à 50 % sur la fixation symbiotique (moitié de la quantité d'azote dans les parties aériennes à maturité) et la quantité d'azote minéral disponible au semis nécessaire pour réduire la fixation symbiotique à 50 % (N50). Des courbes d'isoNUEf+s ont été positionnées sur le graphique. Figure adaptée de Guinet et al. (2018).

#### 2.4 Différences d'exploration racinaire

La caractérisation de traits racinaires des espèces de légumineuses cultivées en rhizotrons a permis une meilleure compréhension des traits de plantes associés à une meilleure capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol.

Ainsi, **une relation positive a été établie entre l'efficacité de prélèvement de l'azote minéral du sol** des différentes espèces (mesuré en champ) **et la vitesse d'exploration racinaire en largeur** (mesurée en rhizotrons) (Figure 5A). Par contre, aucune relation n'a pu être établie entre l'efficacité de prélèvement de l'azote minéral et la vitesse d'exploration racinaire en profondeur (Figure 5B). Le printemps 2014 a été caractérisé par des conditions climatiques sèches et l'azote minéral apporté en surface au semis n'a certainement pas été lixivé dans les horizons de sol plus profonds. Ainsi, les espèces avec de grandes vitesses d'exploration en largeur ont probablement mieux valorisé l'azote minéral resté en surface tandis que les systèmes racinaires plus profonds n'ont pas induit de bénéfices supplémentaires pour le prélèvement d'azote minéral. D'autre part, les différences de vitesse d'exploration en profondeur entre espèces de légumineuses étaient relativement faibles et certainement moins discriminantes pour le prélèvement d'azote minéral dans les horizons de sol plus profonds.



**Figure 5 :** Relation entre l'efficacité de prélèvement de l'azote minéral des différentes espèces de légumineuses (mesurée au champ) et les vitesses d'expansion horizontale (A : en largeur : VitExpLarg) et verticale (B : en profondeur : VitExpProf) de leur système racinaire (mesurées en rhizotrons en serre, en présence d'azote minéral). Figure adaptée de Guinet et al. (2018).

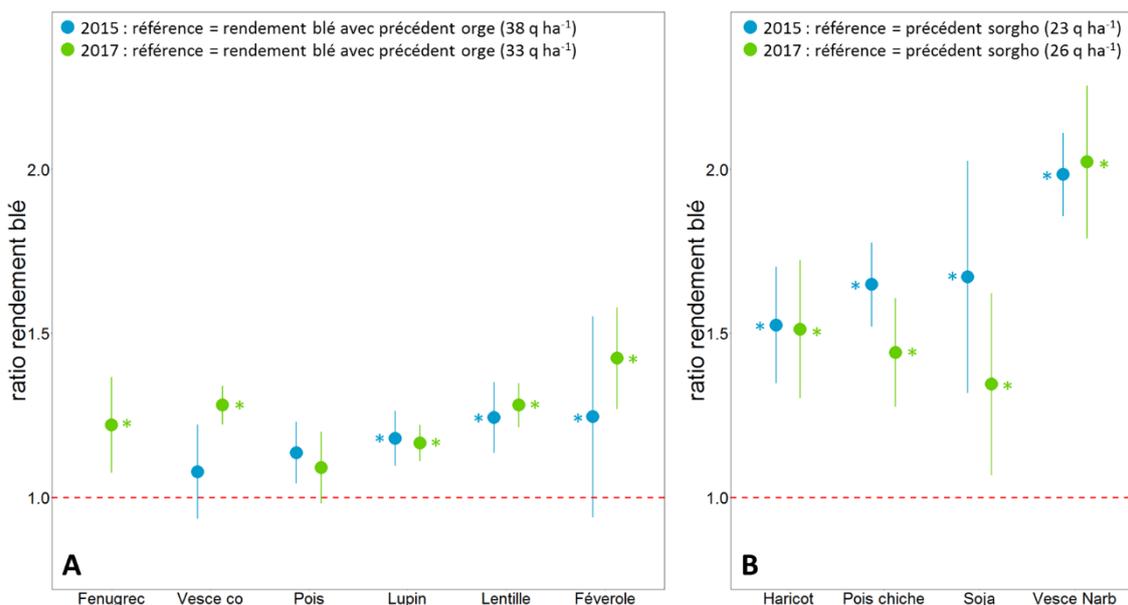
### 3. Effet des légumineuses sur les performances du blé suivant et sur les quantités d'azote perdues par lixiviation après leur récolte

#### 3.1 Rendement du blé selon le précédent cultural

**Pour les précédents légumineuses de printemps**, le ratio de rendement du blé est significativement supérieur à 1, sauf pour le précédent vesce commune en 2015 et le précédent pois pour les deux années. Ainsi, le rendement du blé cultivé après les légumineuses de printemps est en général supérieur à celui du blé cultivé après de l'orge (Figure 6A). En prenant en compte l'ensemble des précédents légumineuses de printemps, le ratio de rendement du blé moyen est de 1,18 en 2015 et 1,25 en 2017. Le blé après la féverole présente le plus grand ratio de rendement du blé en 2015 (1,25) et 2017 (1,42).

**Pour les précédents légumineuses d'été**, le ratio de rendement du blé est systématiquement supérieur à 1, indiquant un rendement du blé cultivé après les légumineuses d'été supérieur à celui du blé cultivé après du sorgho (Figure 6B). En moyenne le ratio de rendement du blé cultivé après les légumineuses d'été est de 1,70 en 2015 et 1,58 en 2017. Le blé cultivé après la vesce de Narbonne présente les plus grands ratios de rendement du blé pour les deux années de cultures.

Les plus grands ratios observés après les précédents d'été en comparaison aux précédents de printemps découlent du rendement du précédent céréale considéré comme référence. En effet, le précédent sorgho engendre de bien plus faibles rendements du blé par rapport au précédent orge (en moyenne 25 q ha<sup>-1</sup> comparé à 36 q ha<sup>-1</sup>).



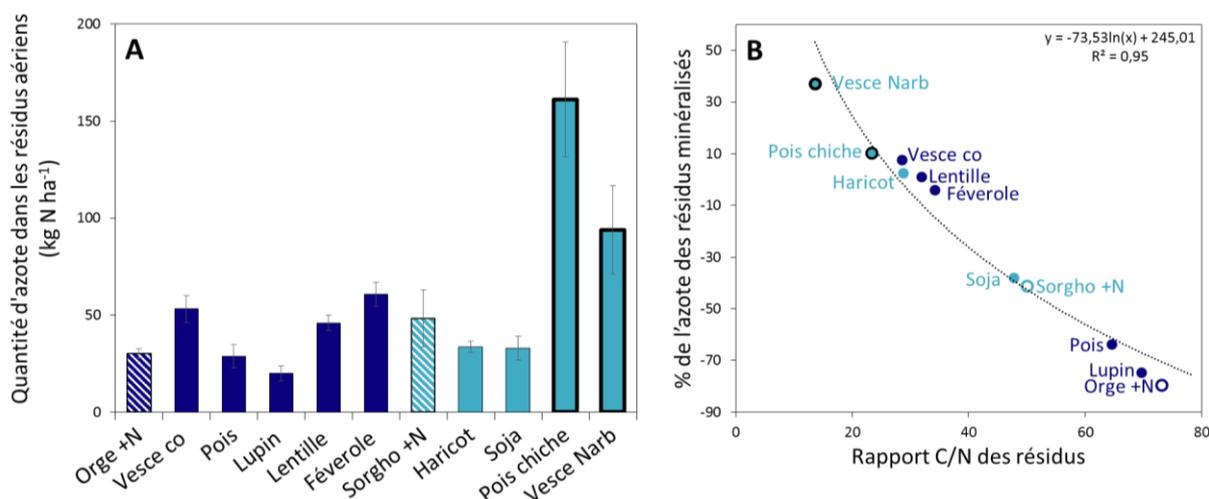
**Figure 6 :** Rapport entre le rendement du blé cultivé après des légumineuses et le rendement du blé cultivé après des céréales. **A :** précédents légumineux de printemps en comparaison au précédent orge ; **B :** précédents légumineux d'été en comparaison au précédent sorgho. Les valeurs entre parenthèses indiquent les rendements du blé 0% humidité cultivé après l'orge ou le sorgho en 2015 et 2017. Une astérisque indique que le précédent légumineuse engendre un rendement du blé significativement supérieur à celui du blé cultivé après la céréale de référence.

### 3.2 Minéralisation des résidus des précédents culturaux et effet sur le rendement du blé suivant

Afin d'expliquer les différences de rendements du blé selon les précédents culturaux, la quantité d'azote minéral issue de la minéralisation des résidus de culture et disponible pour le blé suivant a été calculée. Cette quantité d'azote dépend à la fois de i) la quantité d'azote dans les résidus des précédents culturaux qui détermine la quantité d'azote organique totale fournie au sol par les résidus de culture et ii) de la proportion de cet azote organique des résidus qui est minéralisée par les micro-organismes du sol. La proportion d'azote organique des résidus qui est minéralisée dépend notamment de leur qualité biochimique. Ainsi, les résidus aériens des précédents culturaux ont été caractérisés en 2014 selon leur rapport carbone / azote (C/N) considéré comme un indicateur du potentiel de minéralisation de l'azote des résidus (Nicolardot et al., 2001).

En 2014, les quantités totales d'azote laissées au sol par les résidus aériens des précédents culturaux étaient comprises entre 20 kg N ha<sup>-1</sup> (lupin) et 161 kg N ha<sup>-1</sup> (pois chiche enfoui en plante entière) (Figure 7A). Le rapport C/N des résidus aériens était compris entre 17 (vesce de Narbonne enfouie en plante entière) et 73 (orge) (Figure 7B). Les plus grandes quantités d'azote dans les résidus et les plus faibles rapports C/N ont été mesurés pour les plantes sans production de graines pour lesquelles la plante entière était considérée comme résidu de culture (vesce de Narbonne et pois chiche). En l'absence de production de graines et de récolte, l'azote accumulé dans les parties végétatives n'est pas remobilisé vers les graines ni exporté par la récolte, ce qui explique ces quantités d'azote élevées et ces faibles rapports C/N des résidus. Si l'on considère les autres cultures dont les graines ont été récoltées, les résidus des deux précédents céréales (sorgho et orge) présentaient des rapports C/N parmi les plus élevés et des quantités d'azote dans les résidus relativement faibles, comme il est souvent observé. Il est cependant intéressant de noter que le pois, le lupin et le soja présentaient également des résidus avec de faibles quantités d'azote et des rapports C/N élevés, proches de ceux mesurés pour les deux céréales. Ces trois espèces de légumineuses présentaient des indices de récolte azoté (NHI : rapport entre la quantité d'azote dans les graines sur la quantité d'azote totale de la plante) très élevés (en moyenne 87 %). Une grande partie de l'azote des feuilles et des tiges a donc été remobilisé et exporté par les graines qui ont été récoltées. La vesce commune, le haricot, la lentille et la féverole présentaient des quantités d'azote et rapports C/N des résidus de culture intermédiaires

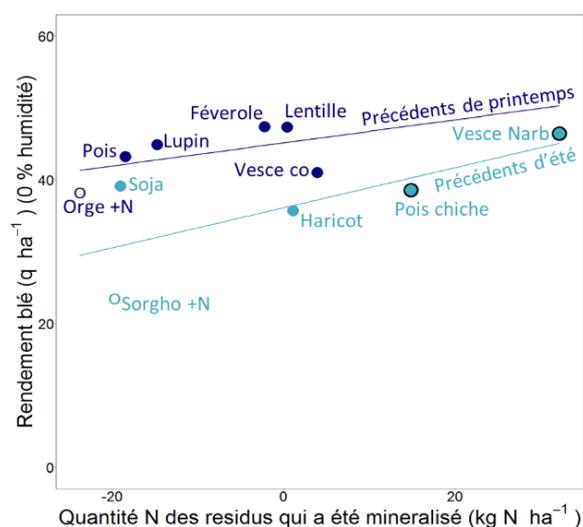
entre les légumineuses non récoltées et les légumineuses avec de grands NHI. La quantité d'azote ainsi que le rapport C/N des résidus peuvent varier selon les conditions climatiques qui influencent le potentiel de croissance des espèces et donc les besoins en azote (puits azoté) mais également le processus de remobilisation de l'azote des parties végétatives vers les graines (répartition de l'azote entre les pailles et les graines).



**Figure 7 : A :** Quantité totale d'azote dans les résidus aériens des précédents culturaux. **B :** Relation entre le rapport C/N des résidus aériens et la proportion d'azote des résidus qui a été minéralisée (estimé à partir du modèle STICS). Les mesures ont été faites pour l'expérimentation I (précédent cultivé en 2014 et blé récolté en 2015). Bleu foncé : précédents de printemps ; bleu clair : précédents d'été. Les bordures noires épaisses indiquent les espèces pour lesquelles la plante entière était considérée comme résidu de culture du fait de l'absence de production de graines.

Dans le modèle STICS, la proportion d'azote des résidus qui est minéralisée dans un environnement donné et sur une période donnée est basée sur le rapport C/N des résidus et est influencée par la température et l'humidité du sol. La figure 7B représente la relation négative obtenue entre la proportion d'azote des résidus qui a été minéralisée estimée par STICS pour l'ensemble de la période de simulation et le rapport C/N des résidus. Ainsi, plus le rapport C/N des résidus est élevé, plus faible est la proportion d'azote des résidus qui est minéralisée. Les simulations indiquent qu'une grande partie des résidus engendrent des proportions d'azote minéralisées négatives, reflétant le processus d'organisation nette de l'azote par les microorganismes du sol. En effet, lors de la minéralisation des résidus, les microorganismes utilisent le carbone des résidus pour leur respiration et leur croissance. Ils utilisent également l'azote des résidus pour répondre à leurs besoins azotés. Ainsi, pour les résidus avec des rapports C/N élevés, l'azote issu de la décomposition des résidus ne permet pas de combler les besoins azotés des micro-organismes. La limitation en azote est donc surmontée par le prélèvement d'azote minéral du sol par les micro-organismes du sol ce qui conduit à un phénomène d'organisation nette de l'azote (valeurs négatives). Seuls les résidus avec un C/N inférieur à 28 engendrent une minéralisation nette de l'azote (valeurs positives), c'est-à-dire qu'ils augmentent le pool d'azote minéral du sol.

En multipliant la quantité d'azote totale des résidus (mesurée au champ) par la proportion d'azote des résidus qui a été minéralisée (estimée par STICS à partir des rapports C/N des résidus), la quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus a été calculée (Figure 8, axe des abscisses). Même si l'ensemble des résidus des différentes espèces n'entraînent pas une minéralisation nette, il existe une différence de 56 kg N ha<sup>-1</sup> entre les résidus induisant les plus grandes quantités d'azote organisées et les résidus induisant les plus grandes quantités d'azote minéralisées, modulant ainsi grandement la quantité d'azote disponible pour la culture suivante.

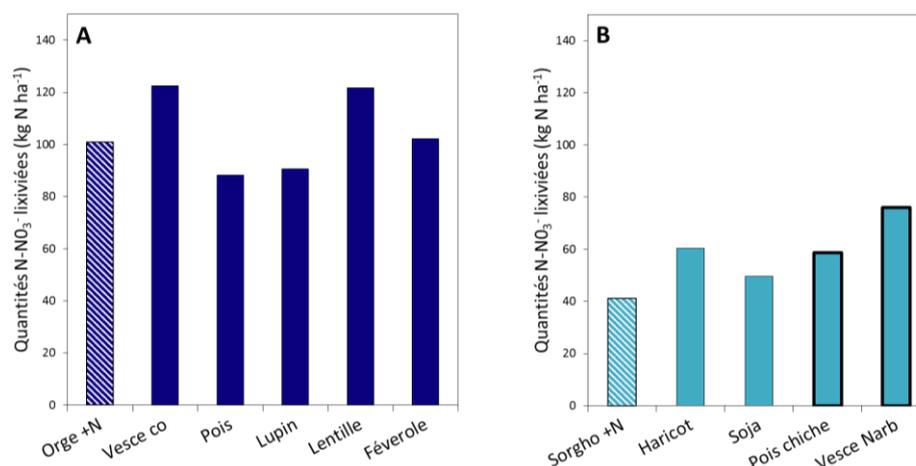


**Figure 8 :** Relation entre le rendement du blé en 2015 et la quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus (calculée avec le modèle STICS). La relation a été établie pour l'expérimentation I (précédent cultivé en 2014 et blé récolté en 2015). Bleu foncé : précédents de printemps ; bleu clair : précédents d'été.

Une **relation positive entre la quantité d'azote issue de la minéralisation des résidus** estimée par le modèle STICS **et le rendement du blé** mesuré en 2015 au champ a été obtenue (Figure 8). Ainsi le rendement du blé est augmenté lorsque la décomposition des résidus engendre de plus grandes quantités d'azote disponibles pour le blé. Cependant, on peut noter une plus faible pente pour les précédents de printemps par rapport aux précédents d'été. Le surplus d'azote issu de la minéralisation des résidus de légumineuses de printemps par rapport aux résidus de l'orge a été moins bien valorisé par le blé par rapport au surplus d'azote issu de la minéralisation des résidus de légumineuses d'été par rapport aux résidus de sorgho. La différence de valorisation de l'azote par le blé entre les précédents de printemps et d'été peut certainement être associée à des pertes par lixiviation plus importantes après les précédents de printemps par rapport aux précédents d'été (Figure 9).

### 3.3 Quantités d'azote perdues par lixiviation

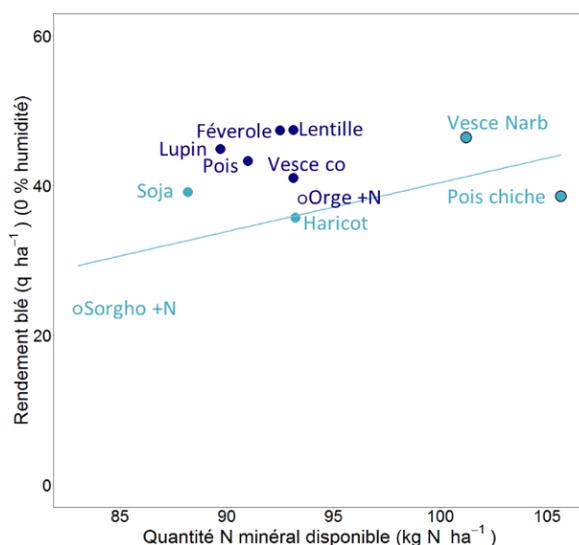
En moyenne, 104 kg N ha<sup>-1</sup> ont été perdus entre la récolte des précédents de printemps (en juillet 2014) et la sortie de l'hiver (Figure 9A) contre 57 kg N ha<sup>-1</sup> entre la récolte des précédents d'été (en septembre 2014) et la sortie de l'hiver (Figure 9B). Les précédents de printemps ont été récoltés un à deux mois avant les précédents d'été (Table 1). Le décalage de cycle entre les deux types de précédents a certainement permis de maintenir le prélèvement d'azote minéral plus tard dans la saison pour les précédents d'été par rapport aux précédents de printemps. Ainsi l'accumulation d'azote minéral dans le sol et les inhabituelles fortes précipitations du mois de juillet et août 2014 ont favorisé les pertes d'azote minéral par lixiviation après la récolte des précédents de printemps.



**Figure 9 :** Quantités d'azote perdues par lixiviation entre la récolte des précédents culturaux de printemps (A : bleu foncé) ou d'été (B : bleu clair) et la sortie hiver (fixée au 1<sup>er</sup> mars 2015) estimées à partir de STICS.

### 3.4 Quantité d'azote totale disponible pour le blé

La relation entre le rendement du blé et la quantité d'azote totale disponible pour le blé suivant a été établie. L'azote disponible pour le blé prend en compte les reliquats azotés mesurés après la récolte des précédents, l'azote issu de minéralisation des résidus de culture et de l'azote organique du sol moins les pertes par lixiviation. Les plus faibles quantités d'azote minéral disponibles pour le blé suivant ont été mesurées après le précédent sorgho tandis que les plus grandes quantités d'azote minéral disponibles ont été mesurées après les précédents légumineuses sans production de graines (pois chiche et vesce de Narbonne), enfouies en plante entière. Malgré des rendements plus élevés après les précédents légumineuses de printemps par rapport à l'orge, les quantités d'azote disponibles pour le blé suivant était très proches pour l'ensemble des précédents printemps (en moyenne 92 kg N ha<sup>-1</sup>) (Figure 10). Au contraire une relation positive a été établie entre le rendement du blé et les quantités d'azote disponibles après les précédents d'été.



**Figure 10** : Relation entre le rendement du blé en 2015 et la quantité d'azote minéral disponible au cours du cycle du blé (reliquat azoté à la récolte des précédents + azote issu de la minéralisation des résidus de culture + azote issu de la minéralisation du sol – azote lixivié). Bleu foncé : précédents de printemps ; bleu clair : précédents d'été.

Au sein des précédents de printemps et d'été il existe une part de la variabilité des rendements de blé non expliquée par les quantités d'azote minéral disponibles au cours du cycle du blé. D'autres composantes des flux azotés tels que l'azote émis dans la rhizosphère des légumineuses au cours de leur cycle, ainsi que les pertes par émissions de protoxydes d'azote contribuent à moduler le pool d'azote disponible pour le blé suivant. Par ailleurs, des processus non associés au cycle de l'azote, tels que la rupture des cycles des ravageurs, ou l'amélioration de la diversité et de l'activité microbienne du sol après les cultures de légumineuses peuvent également expliquer une part de la variabilité des rendements du blé selon les précédents culturels.

### Conclusions et perspectives

Cette étude a permis d'étendre les connaissances acquises sur le pois, espèce de légumineuses à graines jusqu'à présent la plus étudiée en France et en Europe (Cernay et al., 2016), à une large gamme d'espèces de légumineuses à graines pouvant être introduites dans les systèmes de culture, comme cultures de diversification. Dans les conditions environnementales de notre étude, la fixation symbiotique a permis de répondre aux besoins azotés des dix espèces légumineuses, hormis pour le pois chiche. Ces résultats confirment la capacité des légumineuses en culture à atteindre leur potentiel de productivité sans recours aux fertilisants azotés. D'autre part, la minéralisation des résidus des légumineuses souvent riches en azote engendre dans la majorité des cas des rendements du blé suivant en moyenne 40 % (+3 à +27 q ha<sup>-1</sup>) à supérieurs à ceux du blé cultivé après des céréales, en accord avec l'augmentation moyenne de rendement rapportée par Angus et al. (2015) pour le pois, le lupin, la féverole et le pois chiche.

Cette étude a par ailleurs mis en avant des différences entre les espèces, à prendre en compte lors de leur insertion dans les systèmes de culture, afin de limiter les risques de lixiviation de l'azote. Des différences entre espèces en termes d'efficacité d'utilisation de l'azote minéral du sol ont été mises en évidence et sont partiellement

à l'origine des différences de réponse de la fixation symbiotique à la présence d'azote minéral dans le sol. Les différences de capacité de prélèvement d'azote minéral peuvent aussi moduler les risques de lixiviation pendant le cycle des légumineuses, avec des risques plus grands pour les espèces avec une faible efficacité d'utilisation de l'azote minéral telle que le fenugrec, la féverole, le lupin et la vesce de Narbonne. D'autre part, l'azote minéral du sol peut également être perdu par lixiviation après la culture des légumineuses du fait de la fourniture d'azote au sol par les résidus de légumineuses au moment où les risques de lixiviation de l'azote sont les plus élevés. Le risque varie avec la position du cycle des légumineuses dans l'année et selon les précipitations entre la récolte des légumineuses et le semis de la culture suivante. Une longue période d'interculture telle que pour les légumineuses de printemps récoltées en juillet, favorise les risques de lixiviation de l'azote entre la fin de l'été et l'automne, du fait de l'accumulation d'azote minéral dans le sol, et des précipitations plus fréquentes pendant cette période de l'année. Il est indispensable d'adapter la conduite des systèmes de cultures à base de légumineuses pour valoriser au mieux l'azote biologique fourni par les cultures de légumineuses, en limitant ses pertes par lixiviation et en maximisant son utilisation par les cultures suivantes. Ainsi, la mise en place de pratiques agricoles adaptées telles que les associations céréales-légumineuses permettrait de mieux valoriser l'azote minéral en période de culture, en particulier pour les espèces de légumineuses avec une faible efficacité de prélèvement de l'azote minéral. Suite à la récolte des légumineuses, il est primordial d'introduire des couverts végétaux pour piéger l'azote pendant la période d'interculture, notamment en cas d'interculture longue, afin de réduire les risques de pertes d'azote. Enfin, le choix d'une culture valorisant bien l'azote disponible à l'automne (comme le colza) peut être judicieux.

### Références bibliographiques

- Angus J.F., Kirkegaard J.A., Hunt J.R., Ryan M.H., Ohlander L., Peoples M.B., 2015. Break crops and rotations for wheat. *Crop Pasture Sci.* 66, 523-552.
- Carroué B., Scheider A., Flénet, F., Jeuffroy M.H., Nemecek T., 2012. Introduction of dry pea crop in rotation of cereals and rapeseed: impact on the economic and environmental performances. *Innovations. Agronomiques* 25, 125-142.
- Cernay C., Pelzer E., Makowski D., 2016. A global experimental dataset for assessing grain legume production. *Sci. Data.* 3, 160084.
- Guinet M., Nicolardot B., Revellin C., Durey V., Carlsson G., Voisin A.-S., 2018 Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. *Plant Soil.* 432, 207-227.
- Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M., 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil.* 311, 1-18.
- Jensen E.S., 1997. The role of grain legume N<sub>2</sub> fixation in the nitrogen cycling of temperate cropping systems. D. Sc. Thesis. Risø National Laboratory.
- Jeudy C., Adrian M., Baussard C., Bernard C., Bernaud E., Bourion V., Busset H., Cabrera-Bosquet L., Cointault F., Han S., 2016. RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant methods.* 12, 31.
- Nicolardot B., Recous S., Mary B., 2001. Simulation of C and N mineralisation during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C: N ratio of the residues. *Plant Soil.* 228, 83-103.
- Preissel S., Reckling M., Schläfke N., Zander P., 2015. Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: A review. *Field Crop. Res.* 175, 64-79.
- Unkovich M.J., Pate J.S., 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field Crop. Res.* 65, 211-228.
- Voisin A.S., Guéguen J., Huyghe C., Jeuffroy M.H., Magrini M.B., Meynard J.M., Mougél C., Pellerin, S., Pelzer E., 2014. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agron.Sustain. Dev.* 34, 361-380.

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

Voisin A.S., Salon C., Jeudy C., Warembourg F.R., 2003. Seasonal Patterns of <sup>13</sup>C Partitioning Between Shoots and Nodulated Roots of N<sub>2</sub> or Nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Annal. Bot.* 9, 539-546.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL ou DOI).



# Quantification des flux d'azote induits par les cultures de légumineuses et étude de leurs déterminants

## comparaison de dix espèces de légumineuses à graines

### Résumé

Dans un contexte de transition agroécologique, la réintroduction des légumineuses dans les systèmes de culture représente un levier particulièrement intéressant. En effet, les légumineuses permettent notamment de réduire le recours aux intrants azotés pendant leur culture grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, ainsi qu'après leur récolte en fournissant de l'azote à la culture suivante par minéralisation de leurs résidus riches en azote. Il existe cependant un manque de références sur une diversité de légumineuses à graines afin de valoriser au mieux les services écosystémiques fournis par ces espèces.

Cette thèse a visé une analyse comparative de dix espèces de légumineuses à graines à partir de la i) quantification des flux d'azotés induits par les légumineuses au cours d'une succession culturale au champ de deux ans (légumineuse – blé) et ii) l'identification de traits de plantes déterminants dans l'obtention de ces flux azotés. Des expérimentations complémentaires ont été menées en rhizotrons afin de caractériser plus finement certains traits racinaires, et des incubations de sol en conditions contrôlées ont permis de suivre la dynamique de minéralisation des résidus de culture.

Une première partie a consisté à mieux caractériser la réponse de la croissance et de la fixation symbiotique à la disponibilité en azote minéral du sol. Nos résultats ont mis en avant la capacité de la fixation symbiotique à répondre aux besoins azotés de la grande majorité des légumineuses étudiées par rapport aux modalités avec une grande disponibilité en azote minéral. Un impact négatif de l'azote minéral sur la fixation symbiotique a également été mis en évidence pour toutes les espèces, avec une grande variabilité d'intensité de réponse entre les espèces selon leurs besoins azotés et leur capacité de prélèvement de l'azote minéral du sol. La vitesse d'expansion latérale du système racinaire a par ailleurs été positivement associée à l'efficacité de prélèvements de l'azote minéral des différentes espèces.

Une deuxième partie de la thèse s'est focalisée sur la minéralisation des résidus aériens et racinaires en conditions contrôlées afin de comprendre les différences de minéralisation de l'azote selon les caractéristiques biochimiques des résidus des dix espèces de légumineuses étudiées. Le rapport carbone /azote est ressorti comme particulièrement explicatifs des différences de minéralisation de l'azote avec une distinction entre les résidus aériens et racinaires selon l'importance de la fraction de lignine.

Dans une troisième partie l'effet précédent des dix légumineuses sur les performances du blé suivant a été étudié en comparaison à deux précédents céréales. Nos résultats montrent une augmentation de rendements du blé précédé par des légumineuses de 0,8 t ha<sup>-1</sup> par rapport à un précédent orge et de 1,6 t ha<sup>-1</sup> par rapport à un précédent sorgho. La variabilité de quantité d'azote prélevée par le blé selon le précédent cultural a été expliquée à 40 % par la disponibilité en azote minéral du sol variant avec le reliquat à la récolte des précédents culturaux et la minéralisation de l'azote des résidus. Une part non négligeable de l'azote minéral du sol est néanmoins perdue par lixiviation après la récolte des légumineuses et augmente notamment avec la durée de l'interculture et la fréquence des précipitations pendant l'été et la période automne-hiver.

Enfin, une dernière partie a porté sur l'étude simultanée des différents flux azotés quantifiés au cours de la succession de deux ans légumineuse – blé, et sur les traits de plantes déterminants dans l'obtention de ces flux azotés. Les espèces de légumineuses ont ainsi pu être différenciées selon leur profil fonctionnel et donc leur aptitude à fournir des services écosystémiques relatifs à l'azote.

**Mots clés** : Fixation symbiotique de l'azote, effet précédent, lixiviation, minéralisation, traits de plantes, services écosystémiques

# Quantification of nitrogen fluxes induced by legume crops and assessment of their determinants

## comparison of ten grain legumes species

### Abstract

In the context of agroecological transition, the reintroduction of legumes in cropping systems represents a major lever. Indeed, legumes allow the reduction of nitrogen inputs during their growth cycle thanks to their ability to symbiotically fix atmospheric nitrogen. In addition after their harvest they provide nitrogen to the following crop through the mineralisation of high nitrogen content crop residues. However, there is a lack of references on a wide range of grain legumes to maximise the ecosystem services provided by these species.

This work aimed at comparing ten grain legumes based on i) the quantification of nitrogen fluxes induced by legumes during a two-year crop succession (legume – wheat) and ii) the identification of determining plant traits for the provision of these nitrogen fluxes. Additional experiments were carried out in rhizotrons to better characterise root traits, as well as in incubators in controlled conditions to monitor crop residue mineralisation dynamics.

A first chapter aimed at better characterising plant growth and symbiotic nitrogen fixation responses to soil inorganic nitrogen availability. Our results highlighted the ability of symbiotic nitrogen fixation to meet the nitrogen requirements for the majority of legume species compared to treatments with high inorganic nitrogen availability. A negative impact of inorganic nitrogen availability on symbiotic nitrogen fixation was also highlighted for all legumes, with large variation in the response intensity among species, according to their nitrogen requirements and to their ability to retrieve soil inorganic nitrogen. Root lateral expansion rate was positively related to nitrogen uptake efficiency differences among legume species.

A second chapter focused on shoot and root residue mineralisation in controlled conditions to better understand nitrogen mineralisation differences among legumes species according to their residues biochemical characteristics. Nitrogen mineralisation differences were well explained by crop residue carbone : nitrogen ratio ; shoot and root residues were distinguished according to their lignin content.

In a third chapter, legume pre-crop effect on wheat performances was studied in comparison to two cereal pre-crops. Our results showed a 0.8 t ha<sup>-1</sup> increase of wheat yields when cultivated after legumes compared to barley pre-crop, and a 1.6 t ha<sup>-1</sup> increase when compared to sorghum pre-crop. Forty percent of wheat shoot-nitrogen variability according to pre-crop treatments was explained by the inorganic soil nitrogen availability, depending on soil inorganic nitrogen availability at pre-crop harvest and on crop residue nitrogen mineralisation. However, a significant part of soil inorganic nitrogen was lost by leaching after legume harvest and leaching increased with the duration of the fallow period and with rainfall frequency in summer and during the autumn-winter period.

A last chapter focused on the simultaneous assessment of the different nitrogen fluxes that were quantified during the two-year legume - wheat succession, and on plant traits considered as determinants for the provision of nitrogen fluxes. Hence, legume species were distinguished according to their functional profile and thus to their ability to deliver ecosystem services relative to nitrogen.

**Key words:** symbiotic nitrogen fixation, pre-crop effect, leaching, mineralisation, plant traits, ecosystem services