



**HAL**  
open science

# Utilisation de la variabilité génétique du maïs pour évaluer le rôle de la qualité chimique des racines sur le processus de décomposition dans les sols

Erwan Machinet

► **To cite this version:**

Erwan Machinet. Utilisation de la variabilité génétique du maïs pour évaluer le rôle de la qualité chimique des racines sur le processus de décomposition dans les sols. Ingénierie des aliments. Université de Reims Champagne Ardenne, 2009. Français. NNT: . tel-02821112

**HAL Id: tel-02821112**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02821112>**

Submitted on 6 Jun 2020

**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.



**UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

**Spécialités biochimie et science du sol**

**Utilisation de la variabilité génétique du maïs pour  
évaluer le rôle de la qualité chimique des racines sur  
le processus de décomposition dans les sols**

par

**Gaylord Erwan MACHINET**

Soutenue le 19 février 2009

Directrice de thèse : Mme **Sylvie RECOUS**

Co-encadrement : Mmes **Isabelle BERTRAND** et **Brigitte CHABBERT**

Jury de soutenance :

**Jacob MAGID**, Professeur, Université de Copenhague, Danemark

**Rapporteur**

**Yves BARRIÈRE**, Directeur de Recherche INRA, Lusignan

**Rapporteur**

**Catherine LAPIERRE**, Professeur AgroParisTech, Thiverval-Grignon

**Examinatrice**

**Denis ANGERS**, Professeur Associé, Agrocampus-Ouest, Rennes

**Examineur**

**Francis DUCHIRON**, Professeur, Université Reims Champagne-Ardenne

**Examineur**

**UMR 614 INRA-URCA Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims**





**UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

**Spécialités biochimie et science du sol**

**Utilisation de la variabilité génétique du maïs pour  
évaluer le rôle de la qualité chimique des racines sur  
le processus de décomposition dans les sols**

par

**Gaylord Erwan MACHINET**

Soutenue le 19 février 2009

Directrice de thèse : Mme **Sylvie RECOUS**

Co-encadrement : Mmes **Isabelle BERTRAND** et **Brigitte CHABBERT**

Jury de soutenance :

**Jacob MAGID**, Professeur, Université de Copenhague, Danemark

**Rapporteur**

**Yves BARRIÈRE**, Directeur de Recherche INRA, Lusignan

**Rapporteur**

**Catherine LAPIERRE**, Professeur AgroParisTech, Thiverval-Grignon

**Examinatrice**

**Denis ANGERS**, Professeur Associé, Agrocampus-Ouest, Rennes

**Examinateur**

**Francis DUCHIRON**, Professeur, Université Reims Champagne-Ardenne

**Examinateur**

**UMR 614 INRA-URCA Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement, Reims**



À Margaux, Sandra,  
À Cécile, Roger.



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de thèse qui ont accepté d'investir leur temps pour évaluer mon travail : Jakob Magid, Yves Barrière, Catherine Lapierre, Denis Angers et Francis Duchiron.

Je remercie l'INRA et la région Champagne-Ardenne pour avoir financé ma bourse de thèse.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé au bon déroulement et à la valorisation de cette thèse.

Tout d'abord, Sylvie Recous, ma directrice de thèse, pour m'avoir accepté sur ce projet et encadré en partie ce travail. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée au cours de ces trois années. J'ai beaucoup appris à ton contact, tant sur le plan scientifique que personnel. Merci pour tes nombreux conseils, toujours pertinents, et pour ton soutien.

D'autre part, Isabelle Bertrand et Brigitte Chabbert, mes deux « encadrantes ». Comment trouver les mots assez justes pour leur exprimer ma gratitude ... ? Je leur dois beaucoup, à toutes les deux. L'aube de la thèse a pourtant été difficile. Il a fallu que je m'éveille dans un monde pluridisciplinaire où la rigueur était de mise. Vous m'avez aidé à évoluer dans cet environnement dans lequel je n'aurais pas atteint ce stade sans vous. Le tandem « Isabelle – Brigitte » est complémentaire et par conséquent, a toujours quelque chose de constructif, même si nombre de nos réunions ont eu quelque chose d'« atypique ». Isabelle, merci pour ton dynamisme et la confiance que tu m'as accordée pendant ces trois années. Merci à toi, Brigitte, pour tes conseils et ton soutien dans les moments parfois difficiles. Enfin, encore merci à toutes les deux pour votre implication et pour l'énergie que vous avez apportée pour faire aboutir ce projet. A toutes les deux, un Grand Merci !

Je remercie chaleureusement toute l'équipe qui a travaillé avec moi au quotidien. Tout d'abord, Francis et Sylvie Million, collègues et surtout amis, qui ont également été présent dans les moments les plus importants de ma vie au cours de ces trois dernières années. Un grand merci à Gonzague pour son professionnalisme et sa rigueur. Mes pensées vont également à Marie-Jeanne Herre, et son mari Christian, tous deux en retraite maintenant. Merci pour leurs conseils et leur aide sur le plan technique.

Je dois mon savoir-faire dans l'analyse de la chimie des parois à David Crônier, lequel a toujours été disponible et de bon conseil à maintes reprises. Merci également à Pascal Thiébeau, Olivier Delfosse et Anouck Habrant.



Je remercie également Agnès Guzzi pour son amitié et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ces trois années sur le plan administratif.

Je remercie toutes les personnes ayant été impliquées dans ce travail : tout d'abord les membres de mon comité de pilotage, Françoise Watteau et Geneviève Villemin, avec lesquelles j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter et beaucoup appris sur les techniques de microscopie électronique à transmission. Merci également à Christine Terryn pour son aide dans les observations en microscopie électronique à balayage. Je tiens également à remercier Delphine Derrien pour m'avoir initié à la modélisation. Les 10 jours de travail passés ensemble ont été très formateurs et m'ont permis de connaître ses nombreuses qualités humaines. Je remercie Dominique Denoue pour sa disponibilité et ses conseils pour tout ce qui concerne l'échantillonnage du matériel végétal.

Je remercie également mes stagiaires, Claudia Becker, Margot Vandionant et Ludovic Carenjot, pour leurs travaux effectués dans le cadre de ma thèse. Je pense également aux autres thésards, Bilal et Norbert. Je leur souhaite une bonne route sur ce long chemin qu'est la thèse.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement Johnny Beaugrand pour son amitié. Ton soutien, tes conseils et tes encouragements ont eu toute leur importance dans ce travail.

Bien sûr, je pense à ma famille. Sans le soutien sans faille de ma femme, il m'aurait été difficile de réaliser ce travail. Je lui dois mon équilibre, et je lui donne tout mon amour. Je lui dédie donc cette thèse. Je dédie également cette thèse à celle qui a récemment bouleversée ma vie, notre fille Margaux. Elle restera certainement notre plus belle réussite. Je dédie ce travail à Cécile, qui était plus qu'une grand-mère pour moi, et à Roger, mon pépé, tous deux disparus trop tôt. Enfin, merci à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements qu'ils m'ont témoignés tout au long de ma vie.

# SOMMAIRE

## Chapitre 1

### Introduction

1. Contexte : enjeux liés à l'apport des matières organiques dans les sols agricoles	1
2. Etude bibliographique	2
2.1. Biodégradation des matières organiques dans les sols	2
2.2. Décomposition des résidus végétaux dans les sols : importance de la composition chimique des résidus végétaux	8
2.3. Parallèle entre décomposition des résidus végétaux dans les sols et digestibilité des fourrages par les ruminants	19
2.4. Représentation de la qualité chimique des résidus dans les modèles de décomposition des résidus végétaux dans les sols	22
3. Stratégie de recherche	25
3.1. Problématique et questions scientifiques	25
3.2. Objectifs scientifiques	26
3.3. Hypothèses de recherche	27
3.4. Démarches d'étude	28
4. Plan de la thèse	29

## Chapitre 2

### Décomposition des racines de maïs dans le sol : interactions entre les caractéristiques chimiques et la présence des microorganismes colonisateurs

Abstract	31
Introduction	32
Materials and methods	33
Results	36
Discussion	44
References	48

## Chapitre 3

### Décomposition dans le sol et modifications de la qualité chimique des racines de maïs caractérisées par des variations génétiques affectant la qualité chimique des parois cellulaires

Abstract	52
Introduction	53

Materials and methods	54
Results	58
Discussion	67
Conclusions	71
References	71

## **Chapitre 4**

### **Minéralisation du C des racines de 16 géotypes de maïs ayant une composition chimique variable : explication et prévision de la décomposition sur le court et long termes**

Abstract	75
Introduction	75
Materials and methods	77
Results	82
Discussion	99
Conclusions	104
References	104

## **Chapitre 5**

### **Evaluation des composés phénoliques dans les sols et dans les plantes par oxydations alcalines et thioacidolyse**

Abstract	109
Introduction	109
Materials and methods	112
Results	120
Discussion	130
References	135

## **Chapitre 6**

### **Discussion générale et perspectives**

6.1. Discussion générale	139
6.2. Perspectives	147

### **Références bibliographiques**

<b>Annexes</b>	168
----------------	-----

# **CHAPITRE 1**

## **Introduction**



## Introduction

### 1. Contexte : enjeux liés à l'apport des matières organiques dans les sols agricoles

Un des défis majeurs de l'activité agricole actuelle est de produire « durablement », c'est-à-dire concilier les nécessités d'une agriculture productive, compétitive et de qualité avec le maintien et l'amélioration du milieu environnant. La croissance démographique mondiale nécessite la culture intensive de plantes telles que les céréales, dont les parties aériennes représentent la base de l'alimentation humaine et animale. Actuellement, les céréales, principalement le riz, le blé et le maïs, fournissent l'équivalent des deux tiers des calories alimentaires de l'humanité (Cassman, 1999), et un tiers de leur production mondiale est destiné à nourrir les animaux d'élevage (Brown, 2008). Une pression supplémentaire s'exerce sur ces cultures vers des usages non alimentaires dans une stratégie alternative à la production de bioénergie (cas des biocarburants) (Lal, 2006). Cependant, la préoccupation croissante d'une agriculture pour le développement durable implique que tous ces scénarii agronomiques soient soumis à des bilans environnementaux positifs, ce qui implique une réduction des intrants (produits apportés aux sols pour améliorer les rendements de récolte) pouvant être à l'origine de pollution des sols, et un rôle accru des matières organiques dans le maintien de la qualité des sols. L'exportation massive des parties aériennes de cultures empêche le retour au sol de cette biomasse végétale qui est en grande partie à l'origine de la matière organique qui contribue à la qualité des sols (fertilité, structure des sols). L'enjeu est donc de maintenir une production agricole suffisante pour répondre aux besoins de nos sociétés tout en protégeant la qualité des sols à long terme.

Les principales sources de matières organiques entrant dans les sols agricoles sont elles-mêmes issues de l'activité agricole (résidus de récolte et systèmes racinaires, fumiers, lisiers) ou du recyclage des déchets organiques (effluents, composts et boues). Par exemple, les racines de la plupart des plantes annuelles restent dans les sols après la récolte. Dans le cas du maïs, la contribution des racines à la matière organique du sol est estimée à 1,5 tonne C par hectare par culture (Puget and Drinkwater, 2001).

La composition chimique - nommée par le terme de « qualité » - des matières organiques exogènes restituées aux sols est un des principaux facteurs qui influencent leur cinétiques de décomposition dans les sols (Heal et al., 1997). La qualité des matières organiques exogènes dépend de leur origine et influence leur décomposition dans les sols en modifiant l'activité

des organismes décomposeurs du sol. Les flux de carbone et d'azote vers l'hydrosphère et l'atmosphère et leur cycle dans les sols agricoles sont ainsi étroitement liés à la nature des matières organiques restituées au sol. Une meilleure gestion de ces flux implique de prendre en compte la qualité de cette matière organique.

## 2. Etude bibliographique

La matière organique est produite par les organismes vivants (végétaux, animaux et microorganismes). Elle est constituée principalement de carbone, et d'autres éléments tels que l'azote, l'oxygène et l'hydrogène, le phosphore, le soufre... La matière organique est souvent biodégradable, c'est-à-dire qu'elle peut être décomposée par l'action des microorganismes (bactéries, champignons, algues). Dans le sol, on distinguera la matière organique du sol encore parfois qualifiée d'« endogène », de la matière organique apportée au sol et alors qualifiée « d'exogène ».

La matière organique du sol est en majorité considérée comme non vivante et biologiquement stable (souvent dénommée « humus ») soit parce qu'elle est présente sous la forme de composés organiques de faible dégradabilité (récalcitrance chimique) soit parce qu'elle forme des associations avec les éléments minéraux du sol (argile, calcium, ions métalliques) qui protègent physiquement les composés organiques de la dégradation microbienne (Zech et al., 1997 ; Von Lützwow et al., 2006 ; Shöning and Kögel-Knabner, 2006). Une fraction faible de la matière organique du sol est constituée par les microorganismes (bactéries, champignons), regroupés sous le terme générique de « biomasse microbienne » qui représentent 2 à 3% du C total du sol. Les matières organiques apportées au sol sont d'origine très variable. Toutefois, les résidus de culture constituent l'essentiel de ces apports exogènes.

### 2.1. Biodégradation des matières organiques dans les sols

Par définition, la décomposition d'une matière organique est sa dégradation physique et chimique impliquant une transformation de la matière organique initiale en molécules organiques plus simples. La biodégradation est, quant à elle, la décomposition par voie enzymatique des matières organiques sous l'action des microorganismes.

Dans les sols agricoles, la biodégradation des matières organiques s'effectue *via* les microorganismes hétérotrophes du sol en conditions aérobies qui utilisent le carbone organique comme source énergétique (Heal et al., 1997). En présence d'un substrat, ces

microorganismes synthétisent et sécrètent dans le milieu des exo-enzymes qui vont dégrader ces composés en molécules simples et assimilables par les bactéries et les champignons.

La matière organique endogène, humifiée, évolue lentement dans le sol. Le temps de résidence moyen de l'humus a été estimé à plusieurs centaines voire milliers d'années (Schöning and Kögel-Knabner, 2006 ; Fontaine et al., 2007). L'humification est le processus de transformation de la matière organique fraîche en humus. D'anciennes études ont montré que l'humification était caractérisée par l'accumulation des produits les plus récalcitrants à la décomposition, c'est-à-dire d'une matière organique ayant une structure chimique hétérogène complexe qui demeure très stable dans le sol (Campbell et al., 1967 ; Christman and Oglesby, 1971). Cependant, des travaux récents ont montré que des macromolécules complexes telles que les lignines avaient un taux de renouvellement supérieur à celui de la matière organique totale du sol, et que les lignines n'étaient que partiellement stabilisées dans le sol (Dignac et al., 2005). D'autres études ont montré que la stabilisation à long terme de la matière organique du sol était principalement contrôlée par l'existence de mécanismes de protection provenant de la matrice sol et des minéraux du sol, et non par la structure chimique propre de la matière organique du sol (Schöning and Kögel-Knabner, 2006). De plus, Fontaine et al. (2007) a montré que les associations organo-minérales en couches profondes n'expliquent pas à elles seules les différences de temps de résidence moyen du carbone organique entre les couches superficielles et profondes du sol. Cette étude suggère que l'absence de matière organique fraîche dans les couches profondes du sol, source essentielle d'énergie pour les microorganismes décomposeurs du sol, est la raison de la stabilisation de la matière organique dans les couches profondes du sol.

Les microorganismes hétérotrophes décomposeurs des matières organiques exogènes telles que les résidus de culture se développent par succession de populations en fonction de la nature du substrat (McMahon et al., 2005). La première population de microorganismes qui s'installe est apte à métaboliser le substrat initial dans les conditions du milieu. La croissance de cette population va durer jusqu'à épuisement du substrat. Une autre population de microorganismes peut alors lui succéder pour utiliser le nouveau substrat ainsi que les éléments microbiens provenant de la lyse de la première population : c'est le processus de « turnover microbien ». La vitesse de biodégradation des matières organiques exogènes, la croissance des microorganismes et le turnover microbien sont largement dépendants de la nature des matières organiques exogènes.

L'apport de matière organique exogène dans un sol peut influencer la biodégradation de la matière organique endogène du sol par plusieurs mécanismes qui font l'objet de nombreuses



études : ce phénomène est appelé « priming effect » (Kuzyakov et al., 2000). Selon Fontaine et al. (2003), la stimulation de la décomposition de la matière organique du sol dépend de la compétition pour l'acquisition de l'énergie et des nutriments entre les microorganismes qui décomposent la matière organique du sol et les microorganismes qui décomposent la matière organique exogène.

### 2.1.1. Dynamiques couplées du carbone et de l'azote dans les sols

Les processus majeurs intervenant dans les cycles couplés du carbone et de l'azote dans les sols agricoles en conditions aérobies sont schématisés dans la figure 1. La biodégradation de la matière organique exogène apportée au sol implique différents processus : la minéralisation du carbone et de l'azote organique (c'est-à-dire la transformation du carbone et de l'azote organique en  $\text{CO}_2$  et en azote minéral), l'assimilation du carbone et l'organisation de l'azote par la biomasse microbienne du sol, et l'humification du carbone et de l'azote organique.

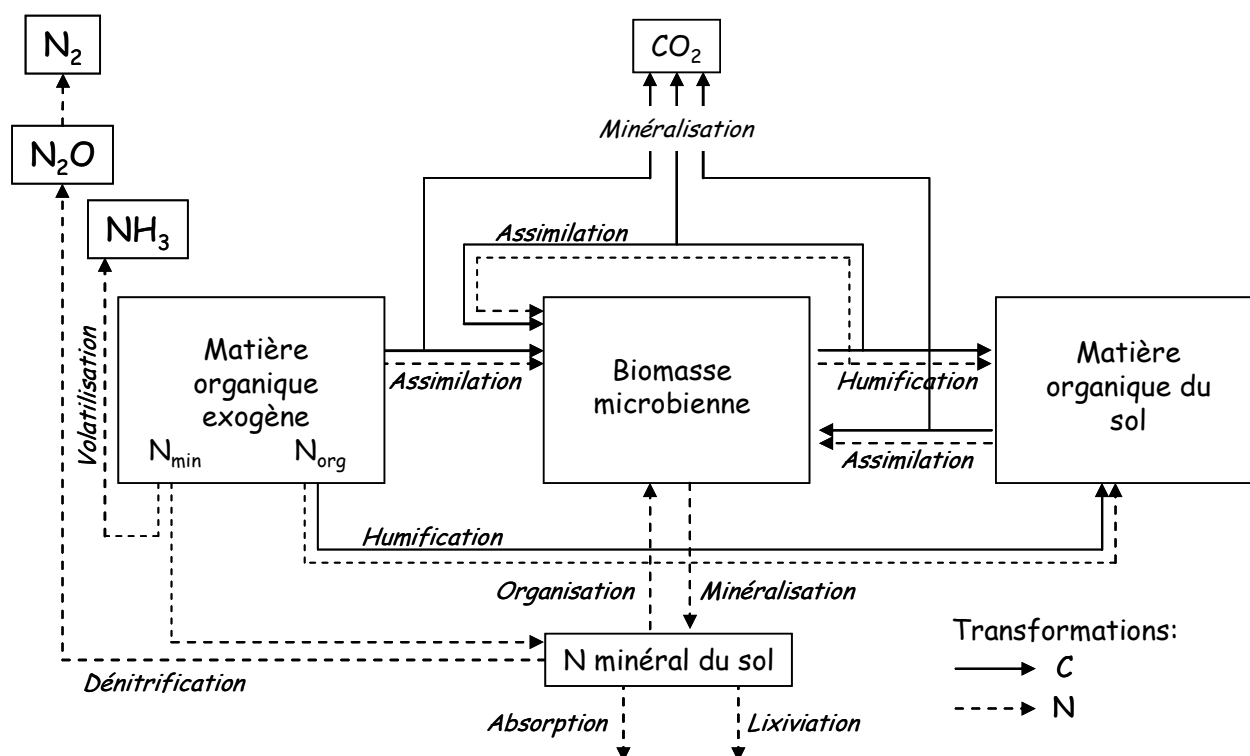


Figure 1 : Représentation schématique des cycles couplés du carbone et de l'azote dans les sols agricoles (conditions aérobies).

La matière organique exogène est dépolymérisée en molécules simples par les exoenzymes produites par les microorganismes du sol. Ces molécules simples sont absorbées par les bactéries et les champignons. Dans la cellule, le carbone du substrat peut alors être :

- oxydé en  $\text{CO}_2$  dans les diverses chaînes métaboliques (glycolyse, voie des pentoses-phosphate, cycle de Krebs) avec la formation de molécules énergétiques comme l'ATP. Ces processus conduisent à la « minéralisation du carbone ».

- utilisé pour la croissance des microorganismes et la biosynthèse de leurs différents éléments cellulaires : membranes, organites... Ce processus est nommé « assimilation du carbone ».

Le rendement d'assimilation du carbone exprime la partition entre la minéralisation et l'assimilation du carbone pour un microorganisme ou une communauté microbienne. Payne (1970) montre que le rendement d'assimilation du carbone ne peut excéder 62%. Cette conclusion est basée sur des calculs thermodynamiques de l'énergie nécessaire à la cellule (énergie provenant de la minéralisation du carbone) pour réaliser ses biosynthèses (assimilation du carbone).

Les principaux processus de transformation de l'azote dans le sol au cours de la biodégradation de la matière organique exogène telle que les résidus de culture sont étroitement associés aux processus de transformation du carbone (Figure 1).

Il existe plusieurs formes d'azote minéral :

- l'azote ammoniacal  $\text{NH}_4^+$ , forme la plus réduite de l'azote issu de l'ammonification de l'azote organique par les microorganismes et enzymes extracellulaires. L'ammonium peut être oxydé en nitrite  $\text{NO}_2^-$  (nitritation) puis en nitrate  $\text{NO}_3^-$  (nitratisation) par les microorganismes autotrophes du sol des genres *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* qui utilisent le  $\text{CO}_2$  comme source de carbone. La « nitrification » (nitritation + nitratisation) est optimale en aérobiose stricte et pour des pH du sol variant de 6.9 à 9 (Nicolardot et al., 1997). L'azote ammoniacal peut être volatilisé sous la forme  $\text{NH}_3$  dans l'atmosphère. La volatilisation est étroitement liée aux conditions du sol (pH, capacité d'échange, porosité), à son humidité (concentration de la solution du sol) et aux conditions climatiques (pluviométrie, température) (Sommer et al., 1991). L'azote ammoniacal peut aussi être absorbé par les plantes, et assimilé par les microorganismes hétérotrophes du sol (organisation microbienne) ;

- l'azote nitreux  $\text{NO}_2^-$ , forme de transition, résultant de l'oxydation de  $\text{NH}_4^+$  en azote nitrique  $\text{NO}_3^-$ .

- l'azote nitrique  $\text{NO}_3^-$ , forme la plus oxydée de l'azote. Le nitrate peut être absorbé par les végétaux, ou lixivié par transport avec l'eau dans le sol et être à l'origine des pollutions des nappes phréatiques (lixiviation), assimilé après réduction par les microorganismes hétérotrophes (organisation microbienne). Il peut enfin aussi être réduit en oxydes d'azote ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) et azote gazeux  $\text{N}_2$  par les microorganismes. Ce phénomène est la « dénitrification » (Cellier et al., 1997). Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* et parfois des champignons utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons quand l'oxygène du sol est limitant. L'intensité de la dénitrification dépend principalement (i) du degré d'anaérobiose, étroitement lié au régime hydrique des sols, (ii) de la disponibilité des matières organiques assimilables, source de pouvoir réducteur, et de la concentration en nitrate, substrat de la transformation, et (iii) de la température qui régule l'intensité des réactions de la dénitrification (Cellier et al., 1997).

L'évolution de l'azote minéral dans le sol est sous le contrôle étroit des activités microbiennes du sol et dépend de la disponibilité des matières organiques assimilables: l'azote organique des matières organiques exogènes et de la matière organique du sol est minéralisé et produit de l'azote ammoniacal (ammonification) sous l'action des microorganismes et enzymes du sol. Inversement, l'azote minéral ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) du sol peut être assimilé et transformé en azote organique par les microorganismes du sol pour leur croissance : c'est l'organisation de l'azote minéral. A la mort des microorganismes, l'azote organique microbien est soit minéralisé sous forme ammoniacale (re-minéralisation) soit incorporé dans des formes d'azote organique plus ou moins biodégradables (humification) (Nicolardot et al., 1997). Ces processus élémentaires, détruisant ou construisant l'azote organique, sont appelés processus 'bruts'. De leurs différences, résultent l'intensité des processus de minéralisation nette. En cas d'apport de résidus de culture, les variations d'azote minéral résultent de l'importance relative des mécanismes produisant  $\text{NH}_4^+$  (minéralisation et reminéralisation) et des mécanismes consommant  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$  (organisation de  $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ ). Si l'organisation brute est supérieure à la minéralisation (et re-minéralisation) brute, on observe une organisation nette (diminution de la quantité d'azote minéral dans le sol) ; si la minéralisation (et re-minéralisation) brute est supérieure à l'organisation brute, on observe une minéralisation nette c'est-à-dire une accumulation d'azote minéral dans le sol.

Minéralisation et organisation sont réalisées par une forte diversité d'enzymes et de microorganismes principalement hétérotrophes au sein desquels les devenir du carbone et de l'azote sont donc indissociables car ces deux éléments sont assimilés ensemble pour assurer

les besoins de maintenance (renouvellement des structures cellulaires) et de croissance des microorganismes.

### **2.1.2. Influence des résidus de culture sur les propriétés physico-chimiques des sols**

La matière organique endogène du sol influence les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol. Elle assure le maintien de la structure et de la stabilité des sols en participant au processus d'agrégation et constitue un réservoir de substances nutritives pour les microorganismes et les végétaux (Oades, 1984). Elle est une des composantes essentielles de la fertilité chimique et physique des sols. L'apport de matières organiques exogènes en général et de résidus de culture en particulier va avoir un effet sur la fertilité physique et chimique des sols agricoles.

La matière organique endogène du sol contribue à la fertilité chimique du sol en fournissant, au cours de leur biodégradation, des éléments nutritifs indispensables à la nutrition des plantes (comme l'azote, le phosphore, le soufre, et d'autres microéléments) et de l'énergie pour les microorganismes (sous forme de carbone). L'apport de résidus de culture dans les sols va contribuer à enrichir la teneur en matière organique du sol et renforcer la fertilité chimique du sol (Moyin-Jesu, 2007). Ceci est particulièrement vrai dans le cas des racines où 40% du carbone total de ces organes sont stabilisés dans le sol après plusieurs années de décomposition, contre 20% dans le cas des feuilles (Rasse et al., 2005). Puget and Drinkwater (2001) suggère que l'augmentation du temps de rétention du carbone dérivé des racines dans les sols est due notamment à une plus forte récalcitrance chimique à la décomposition des racines ayant généralement une forte teneur en paroi cellulaire lignifiée, ainsi qu'à une protection physique accrue du carbone dérivé des racines par les agrégats du sol.

La matière organique du sol joue également un rôle important dans la fertilité physique du sol, en particulier dans les agrosystèmes. Cette matière organique augmente la capacité de rétention en eau des sols, limite la compaction (due au tassement du sol par les machines agricoles, et au poids du sol), et contribue à la structuration et à l'amélioration de la stabilité structurale des horizons de surface. L'apport de résidus de culture dans les sols agricoles augmente la rétention en eau des horizons de surface du sol (Duiker and Lal, 1999), limite la compaction du sol (Hamza and Anderson, 2005) et améliore la structure du sol (Martens, 2000).

Dans les régions de grandes cultures comme celles du Nord de la France, l'intensification des pratiques culturales a conduit à une diminution des taux de matières organiques du sol (Fardeau et al., 1988). Parallèlement, ces sols ont subi une dégradation de leurs propriétés physiques avec, en premier lieu, la diminution de leur stabilité structurale. Cette diminution peut avoir des conséquences graves sur les plans agronomique et environnemental (perte de sol par ruissellement, mise en suspension de particules polluantes). Une gestion raisonnée des pratiques culturales et des résidus de cultures permettrait toutefois de pallier ces problèmes de dégradation des propriétés physico-chimiques des sols (Power et al., 1993).

Le passage du labour profond au semis-direct (un système de travail du sol réduit) induit des modifications à long terme dans la structure du sol et la localisation de la matière organique du sol et des résidus de culture. Les travaux d'Oorts (2006) montrent que pour les deux systèmes de travail du sol différenciés depuis 32 années dans un sol limoneux de grande culture, le semis-direct présente des stocks de carbone 5 à 15% plus importants et des stocks d'azote 3 à 10% supérieurs à ceux mesurés pour le labour profond.

## **2.2. Décomposition des résidus végétaux dans les sols : importance de la composition chimique des résidus végétaux**

Le taux de décomposition de la matière organique endogène et exogène dans les sols est lié à de multiples facteurs, dépendant de la nature des matières organiques (facteurs intrinsèques) et des conditions de l'environnement (facteurs extrinsèques), qui agissent sur l'activité des microorganismes du sol impliqués dans le processus de décomposition.

Les principaux facteurs extrinsèques déterminant la décomposition des matières organiques dans les sols sont l'humidité, la température, le pH du sol, les conditions d'aération, la disponibilité en nutriments (Parr and Papendick, 1978 ; Swift et al., 1979). Certaines pratiques culturales comme le travail du sol sont susceptibles de modifier le taux de décomposition des matières organiques en modifiant les conditions du milieu, ou en modifiant la taille et la localisation des matières organiques exogènes telles que les résidus de culture. La texture des sols influence également la décomposition, notamment par la présence d'argile qui assure une protection physique de la matière organique (Ladd et al., 1995).

Les caractéristiques intrinsèques de la matière organique exogène sont un des principaux facteurs qui influencent largement leur décomposition dans les sols (Heal et al., 1997). Ces caractéristiques propres ont été désignées sous le terme de « qualité » intrinsèque par Swift et

al. (1979), qui est utilisé depuis dans les travaux relatifs à cette problématique (Cadish and Giller, 1997). La description de la qualité la plus souvent utilisée est la composition chimique. Les résidus végétaux qui constituent la majorité des apports exogènes au sol après la récolte sont très hétérogènes. La qualité chimique de ces résidus dépend de nombreux facteurs, notamment du type de plante (espèce), d'organe, du degré de maturité et des conditions de croissance du végétal (Sariyildiz and Anderson, 2003). Dans le cas des racines, le contact direct avec le sol avant la récolte favorise leur colonisation par certains microorganismes du sol (symbiotiques ou phytopathogènes) qui peuvent persister dans les racines après leur récolte (Cook et al., 1978). Dans le cas des microorganismes phytopathogènes, ces derniers induisent des modifications de la composition chimique des racines qui répondent à l'attaque par la synthèse de molécules ayant pour rôle de protéger les cellules non infectées (Boudet et al., 1995 ; De Ascensao et al., 2003).

### **2.2.1. Composition chimique des résidus végétaux**

Les plantes sont composées de différents organes comme les feuilles, les tiges et les racines. Chacun de ces organes est constitué d'un ensemble de tissu qui lui est propre. Chaque tissu est composé de cellules ayant une composition chimique spécifique (Wilson and Hatfield, 1997). Les cellules végétales possèdent une fraction soluble (contenu cytoplasmique) et une fraction insoluble correspondant essentiellement à la paroi cellulaire. La proportion relative entre ces deux fractions varie en fonction du type cellulaire et de sa maturité. La qualité chimique globale d'un résidu végétal résulte donc de la composition chimique des différentes cellules qui le constituent.

D'une manière générale, la teneur en paroi cellulaire des racines est systématiquement supérieure à celle des parties aériennes des plantes de grande culture, et ce quel que soit le stade de maturité considéré (Figure 2). Dans le cas du blé, la teneur en paroi cellulaire des racines représente environ 90% de la matière sèche, tandis que celle des parties aériennes est d'environ 50% (Bertrand et al., 2006). La teneur en paroi cellulaire d'un résidu végétal augmente fortement avec la maturité du végétal considéré, parce que d'une part elle évolue avec les modifications de la proportion relative des organes aériens (feuille/tige) au cours du développement de la culture et d'autre part parce que les tissus végétaux d'un organe donné s'enrichissent en parois cellulaires avec la maturation. Dans le cas des entrenœuds de blé, la teneur en paroi cellulaire augmente de 50% à 85% entre le stade anthèse et la maturité physiologique (Bertrand et al., 2009).

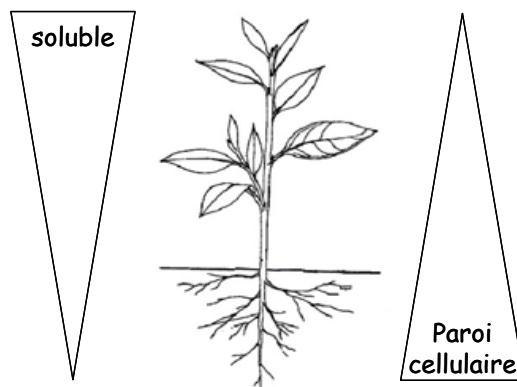


Figure 2 : Représentation schématique des proportions relatives des fractions soluble / paroi cellulaire des organes des végétaux.

### 2.2.1.1. Composition de la fraction soluble

La fraction soluble des végétaux comprend les composés constitutifs des végétaux qui, d'un point de vue méthodologique, sont extraits par des solutions peu « agressives » comme l'eau à 20°C, l'eau à 100°C, un détergent à pH neutre (Van Soest, 1963) ou d'autres détergents comme l'acétone. Cette fraction soluble est constituée :

- d'acides aminés, de peptides, de protéines,
- de sucres solubles (non pariétaux),
- de lipides et autres constituants lipidiques des membranes cellulaires,
- de métabolites secondaires : les tanins, les pigments photosynthétiques, et autres molécules spécifiques aux végétaux (alcaloïdes, terpènes...).

Les tanins sont considérés comme étant le quatrième groupe de composés d'origine végétale le plus abondant après la cellulose, les hémicelluloses et les lignines, représentant ainsi une part importante du carbone de la biomasse terrestre (Hernes et al., 2000 ; Kraus et al., 2003). La teneur en tanins de certaines feuilles peut effectivement dépasser 40% de la masse sèche (Matthews et al., 1997). Certains composés originaires des parois cellulaires sont également solubles dans certaines solutions décrites ci-dessus (composés pectiques).

La composition de la fraction soluble varie en fonction du type d'organe, et la proportion des composés solubles évolue au cours de la croissance du végétal. Par exemple, la

teneur en sucres solubles des entre-nœuds de blé diminue avec la maturité du végétal, passant de 20% de la matière sèche au stade anthèse à 7% au stade de maturité physiologique (Bertrand et al., 2009). Il n'existe pas de microflore spécifique de cette fraction soluble en raison de la diversité des molécules contenues dans celle-ci. Généralement, la fraction soluble des résidus végétaux est rapidement assimilée par les microorganismes du sol au cours de la décomposition, hormis certains composés tels que les tanins qui inhibent l'activité des microorganismes (Mutabaruka et al., 2007).

### 2.2.1.2. Composition des parois cellulaires

La cellule végétale se distingue de la cellule animale notamment par la présence d'une paroi cellulaire qui l'entoure. La paroi cellulaire végétale se définit comme une structure extracellulaire organisée et dynamique. Elle assure dans la plante de nombreuses fonctions mécaniques, physiologiques et morphologiques tant au niveau cellulaire qu'à la plante entière (Brett and Waldron, 1996). La formation de la paroi cellulaire est un processus dynamique qui se fait progressivement sous le contrôle de la cellule végétale par le dépôt de couches successives à partir de la membrane plasmique (Brett and Waldron, 1996) : la lamelle moyenne, commune à deux cellules végétales adjacentes puis la paroi primaire (Figure 3). Ce type de paroi est rencontré dans les tissus participant aux fonctions d'assimilation. Les cellules spécialisées dans le soutien ou la conduction (fibres et vaisseaux) mettent en place, à l'arrêt de leur croissance, une couche pariétale supplémentaire adjacente à la paroi primaire : la paroi secondaire (Figure 3). Ce sont les parois secondaires qui constituent quantitativement la fraction majeure des parois cellulaires rencontrées dans la biomasse lignocellulosique.

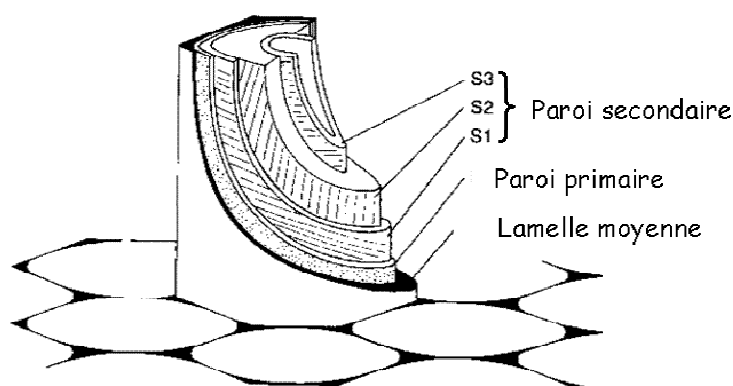


Figure 3 : Représentation schématique des différentes couches constitutives des parois cellulaires (d'après Brett and Waldron, 1996).



Les structures riches en parois secondaires ont fait l'objet de nombreux travaux en raison d'une part de leur importance dans les domaines non alimentaires (production de fibres papetières) et dans ceux de l'alimentation animale (digestibilité des fourrages par les ruminants) et de leur impact sur le processus de biodégradation des matières organiques d'origine végétale par les microorganismes du sol (Swift et al., 1979 ; Jung and Deetz, 1993 ; Jung and Allen, 1995 ; Cadisch and Giller, 1997). Dans les paragraphes suivants seront soulignés les principaux aspects de la structure et du développement des parois cellulaires pouvant être reliés à leur biodégradation par les microorganismes. Une attention particulière sera portée à l'objet de notre étude que sont les graminées.

La structure des parois végétales peut être illustrée par une trame fibrillaire cristalline englobée dans une matrice amorphe. La phase fibrillaire se distingue de la phase matrice par sa forte cristallinité et par sa composition chimique relativement homogène. Elle est constituée de cellulose dont l'organisation en microfibrilles constitue une armature rigide et organisée pour la paroi cellulaire. La cellulose, homopolymère formé par l'association d'unités D-glucopyranose (glucose) liées entre elles par des liaisons de type glycosidique  $\beta$ - $(1 \rightarrow 4)$ , est le principal composant des résidus végétaux et représente chez les dicotylédones 20 à 30% de la masse sèche des parois primaires et 40 à 90% de la masse sèche de leurs parois secondaires selon les tissus (Preston, 1986).

La phase matrice est quant à elle composée de polysaccharides non cellulosiques (hémicelluloses, pectines), de protéines et éventuellement de composés phénoliques (acides phénoliques, lignines) qui sont chimiquement et physiquement interconnectés au sein de la structure tridimensionnelle de la paroi cellulaire.

La croissance et le développement des parois cellulaires peuvent être divisées en deux phases (Iiyama et al., 1993 ; Terashima et al., 1993). Tout d'abord, la cellule met en place une paroi primaire extensible pendant la phase d'élongation cellulaire. Cette paroi primaire est une structure complexe majoritairement composée de polysaccharides et en moindre proportion de protéines. Les pectines, les hémicelluloses et la cellulose sont déposées pendant cette phase de croissance. Chez les dicotylédones, les hémicelluloses sont les principaux polysaccharides non cellulosiques et représentent 30% de la masse sèche des parois primaires et 10 à 20% de la masse sèche des parois secondaires (Carpita et al., 1993). Ils sont majoritairement représentés par des hétéroxylanes, polymère de xylose plus ou moins substitué par des motifs variables (arabinose, acide glucuronique...). Chez les graminées, il s'agit essentiellement d'arabinoxylanes constitués d'une chaîne principale d'unités D-xylopyranose (xylose) liées en



liaisons éther labiles ( $\beta$ -O-4 et  $\alpha$ -O-4 principalement) (Sarkanen and Ludwig, 1971) (Figure 5). Le mode de polymérisation de la lignine est responsable de sa conformation tridimensionnelle (Monties, 1984) (Figure 6). Les lignines rencontrées dans les parois primaire-lamelle moyenne sont généralement riches en unité G de type « condensées » par rapport aux parois secondaires qui renferment des lignines de type mixte G-S (Terashima et al., 1993).

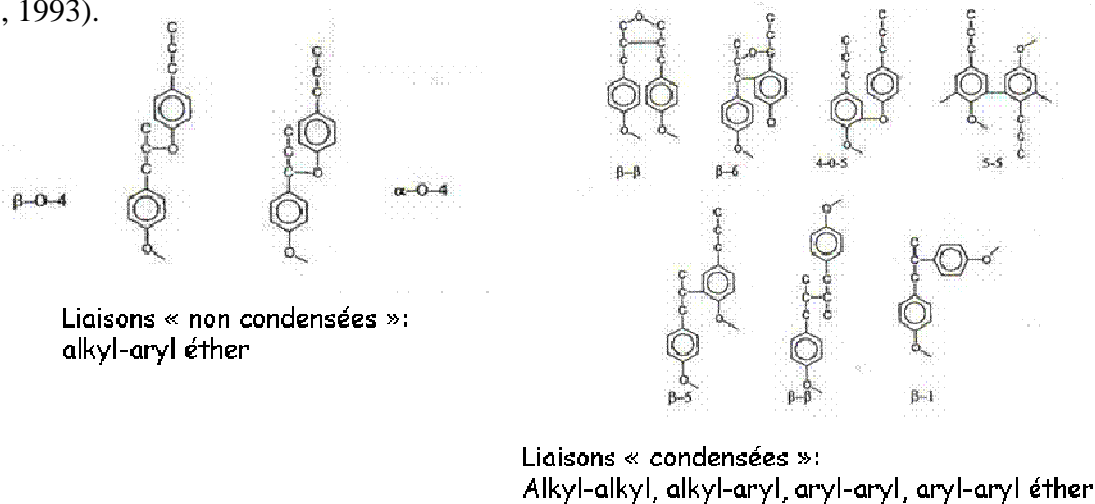


Figure 5 : Principales liaisons inter monomériques identifiées au sein de la lignine et classées suivant la terminologie biochimique en liaisons « non condensées » et en liaisons « condensées ».

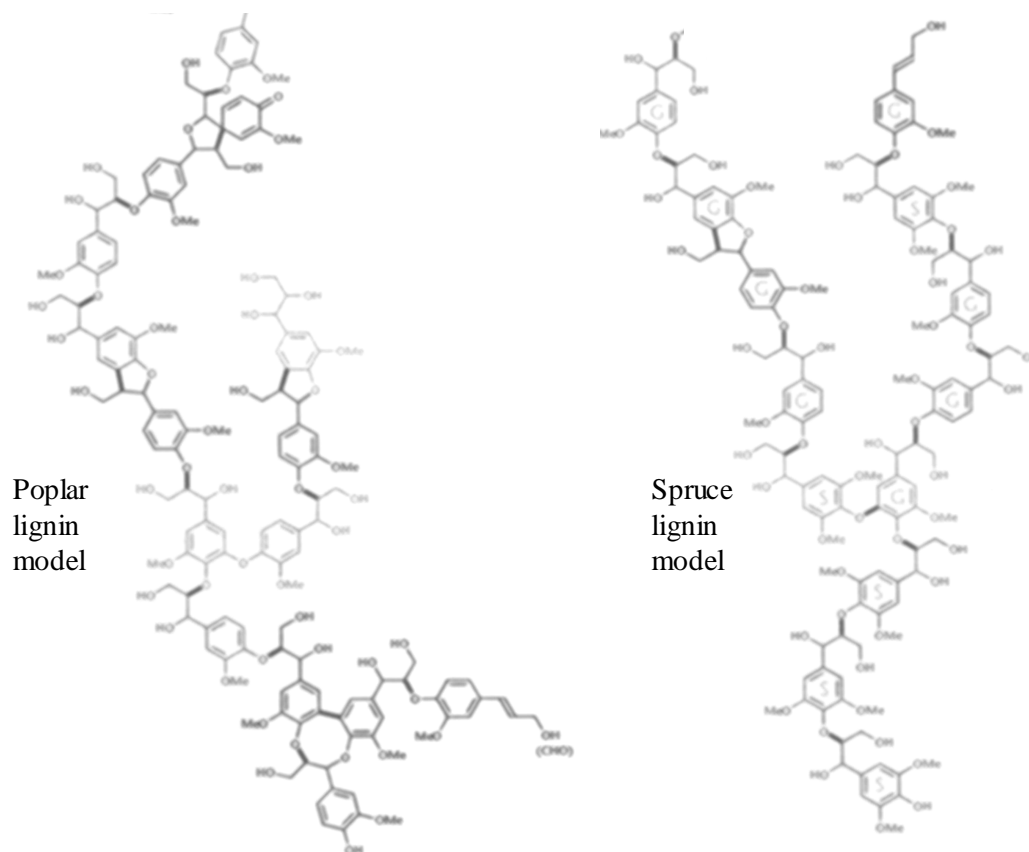


Figure 6 : Modèle de structure de lignine (d'après Ralph et al., 2007).

La formation des parois cellulaires s'accompagne d'une modification de leur composition généralement illustrée par l'existence de gradients chimiques (teneurs et composition) dans l'épaisseur des parois. Ces évolutions chimiques se traduisent par la mise en place d'interactions variables entre les composés pariétaux. La cohésion des parois cellulaires est assurée par des liaisons de nature diverse (covalentes, non covalentes, ioniques). En particulier, les graminées renferment des acides phénoliques qui malgré leur faible proportion (moins de 2% de la masse sèche de paroi) ont un rôle important dans l'établissement de liaisons covalentes au sein des parois (Wallace et al., 1995). L'acide férulique et, dans une bien moindre mesure, l'acide *p*-coumarique (figure 7), sont estérifiés aux arabinoxyanes (Kato and Nevins, 1985 ; He and Terashima, 1989) et participent à l'organisation des parois cellulaires.

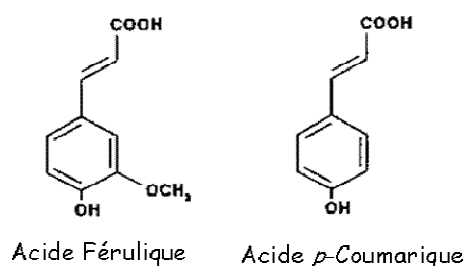


Figure 7 : Les deux principaux acides hydroxycinnamiques rencontrés chez les graminées.

De plus, ces acides sont considérés comme des sites d'initiation de la lignification (Terashima et al., 1993). Des travaux ont montré que l'acide férulique jouait un rôle essentiel non seulement dans la liaison entre les chaînes d'arabinoxyanes mais aussi dans les interactions covalentes avec la lignine contribuant fortement à l'organisation des parois cellulaires (Kato and Nevins, 1985 ; Wallace et al., 1995) (Figure 8). De nombreux travaux ont permis de révéler la complexité et la grande diversité des interactions impliquant les acides phénoliques (Scalbert et al., 1985 ; Iiyama et al., 1994). Par exemple, l'acide férulique peut être estérifié sur la position O-5 des unités d'arabinose des chaînes d'arabinoxyanes et étherifiés à la lignine. Cet acide phénolique augmente la réticulation des polymères pariétaux en permettant la formation de ponts entre les polysaccharides pariétaux et/ou entre la lignine et les polysaccharides pariétaux (Grabber et al., 2004 ; Bunzel et al., 2005).

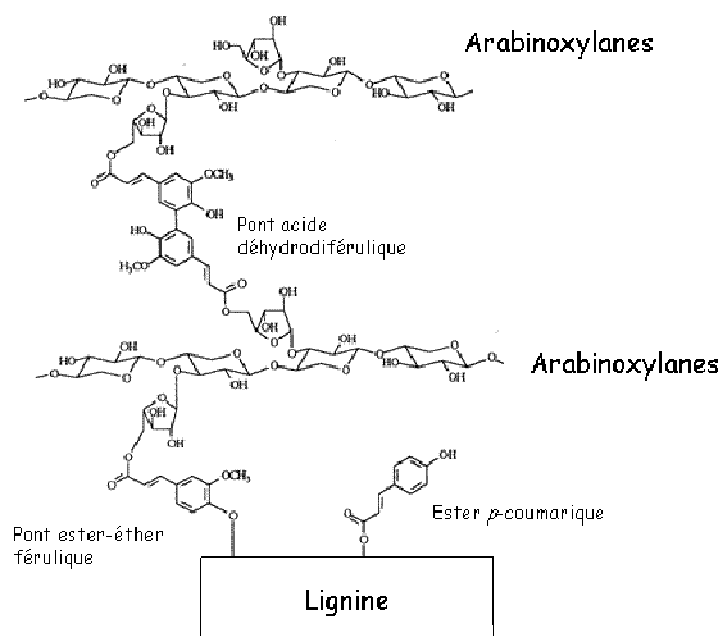


Figure 8 : Exemple de liaisons entre polymères pariétaux via les acides phénoliques (d'après Jung et al., 1993).

Au-delà des multiples liaisons covalentes au sein de la matrice amorphe des parois cellulaires, des interactions non covalentes assurent la cohésion entre cette matrice et l'armature cellulosique. Par exemple, les régions non substituées des arabinoxylanes sont susceptibles de s'associer avec la cellulose par liaisons hydrogènes (Carpita et al., 1993). Ces nombreuses liaisons renforcent la cohésion pariétale et rendent les parois cellulaires plus difficilement biodégradables (Hatfield et al., 1999).

Les parois cellulaires doivent être considérées comme un réseau dynamique et complexe dont l'intime cohésion entre les polysaccharides, les acides phénoliques et la lignine inhibe la dégradation enzymatique en réduisant l'accessibilité des polysaccharides aux microorganismes (Chesson, 1988, Ralph et al., 1993).

### 2.2.2. Relations entre qualité chimique des résidus végétaux et décomposition dans les sols

L'influence de la qualité chimique des matières organiques sur leur décomposition dans le sol est reconnue depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle. Dès lors, des travaux ont été menés pour tenter de prédire la décomposition des résidus végétaux dans les sols par la mise en relation entre la qualité chimique de ces résidus et leur taux de décomposition. Dans les années 1920, des études ont montré que les teneurs relatives en carbone et azote, exprimées par leur rapport

(C/N), étaient des variables descriptives qui permettent de prédire la décomposition des résidus végétaux dans les sols (Waksman, 1924 ; Jensen, 1929). Depuis, de nombreux travaux ont abouti à des conclusions similaires et le rapport C/N est une variable largement utilisée (par exemple, Probert et al., 1998 ; Nicolardot et al., 2001). Cependant, l'utilisation du rapport C/N a été critiquée et remise en question (Fog, 1988, Herman et al., 1977). Des travaux ont montré que ce rapport ne rend pas compte de la disponibilité du carbone et de l'azote, souvent essentielle pour décrire les cinétiques de décomposition (Camiré et al., 1991 ; Recous et al., 1995). Comme décrit précédemment, la présence de carbone organique assimilable est indispensable à la majorité des activités microbiennes, sa métabolisation fournissant l'énergie aux microorganismes hétérotrophes du sol (Nicolardot et al., 1989). En plus du carbone, les microorganismes du sol requièrent de l'azote pour leur croissance. La disponibilité en azote, incluant toutes les formes d'azote pour les microorganismes du sol (azote organique des résidus, azote organique et minéral du sol), peut alors devenir un facteur limitant la décomposition (Mary et al., 1996). Quand la disponibilité en azote est faible, ce qui est le cas dans la majorité des données publiées, la teneur en azote des résidus est alors souvent le principal facteur de prédiction des cinétiques de décomposition (Tian et al., 1992, 1995). Dans ces conditions, l'influence de la qualité chimique des résidus sur la minéralisation du carbone ne peut pas être distinguée de celle de la disponibilité en azote au cours de la décomposition (Henriksen and Breland, 1999 ; Recous et al., 1995).

D'autres études ont été menées afin d'identifier d'autres caractéristiques chimiques susceptibles de prédire la décomposition des résidus végétaux dans le sol. Pour cela, différents types de méthodes de caractérisation des résidus ont été utilisées. Dans les années 1960, une méthode d'extraction séquentielle a été développée pour analyser la composition chimique des résidus végétaux en lien avec la digestibilité des fourrages par les ruminants (Van Soest, 1963 ; Goering and Van Soest, 1970). Cette méthode permet de déterminer la proportion relative de chaque fraction constituant ces résidus végétaux, à savoir la fraction soluble et la fraction pariétale et ses principales composantes : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. La fraction soluble est extraite du résidu par une double extraction à chaud à l'eau et avec un détergent neutre. Le résidu restant correspond globalement aux parois cellulaires. Les hémicelluloses sont ensuite extraites des parois cellulaires par solubilisation à chaud dans un détergent acide. Le résidu restant contient la quasi-totalité de la fraction ligno-cellulosique. La cellulose est solubilisée à froid par hydrolyse dans de l'acide sulfurique concentré. Le résidu final contient la lignine et les cutines. Cette méthode a été adaptée pour prédire la décomposition des résidus végétaux dans le sol en faisant l'hypothèse qu'il y a un

parallèle entre l'augmentation de la force d'extraction chimique des composants et la diminution du taux de décomposition des composants des résidus végétaux (Heal et al., 1997). Cette méthodologie a permis de suivre l'évolution des fractions mentionnées ci-dessus au cours de la décomposition de résidus végétaux. Minderman (1968) montre que l'ensemble des fractions (soluble, hémicellulose, cellulose et lignine) se décomposent simultanément mais à des vitesses différentes, indiquant une dégradation préférentielle de certains de ces composants.

Des travaux ont utilisé cette description de la qualité chimique des résidus pour paramétrer des modèles de prédiction de la décomposition de ces résidus dans le sol. Dendooven et al. (1990) et Quemada and Cabrera (1995) ont utilisé le rapport C/N de chacune des fractions pour prédire la minéralisation du carbone et de l'azote des résidus. Cependant, cette description de la composition chimique des résidus végétaux n'est pas toujours satisfaisante et le manque de robustesse de cette description peut s'expliquer par (i) le rapport C/N des fractions qui varie considérablement selon l'origine des résidus végétaux (Henriksen and Breland, 1999), (ii) la description de la composition des résidus végétaux basée sur des données quantitatives sur chacune des fractions sans tenir compte des interactions existantes entre elles (liaisons cellulose-hémicelluloses-lignine). Des études menées sur la digestibilité des fourrages par les ruminants ont montré que les interactions multiples existantes entre les polymères pariétaux étaient autant de barrières physiques et chimiques à leur biodégradation (Hatfield, 1993 ; Jung and Deetz, 1993).

D'autres caractéristiques de la composition chimique des résidus végétaux ont été reliées à leur taux de décomposition dans le sol. Des travaux ont montré que la minéralisation du carbone sur les premiers jours de décomposition des résidus végétaux était principalement reliée à la quantité de carbone présent dans la fraction soluble à l'eau des résidus (Herman et al., 1977 ; Trinsoutrot et al., 2000 ; Abiven et al., 2005). La proportion de composés solubles, dégradés rapidement par les microorganismes décomposeurs a moins d'influence sur la minéralisation du C à plus long terme (Bertrand et al., 2009). L'influence des composés présents dans la fraction insoluble (polysaccharides des parois cellulaires, lignines) sur la décomposition est quant à elle plus difficile à déterminer. Des relations entre certains de ces composés et les taux de minéralisation du C et de N ont été mises en évidence (Heal et al., 1997 ; Trinsoutrot et al., 2000 ; Jensen et al., 2005). Par exemple, le rapport Lignine/N initial (Mellilo et al., 1982), ou le rapport sucres/(sucres+lignine) (McClaugherty et al., 1987) ont été proposés comme étant des critères de qualité chimique déterminant la décomposition de

litières forestières dans les sols. D'autres études ont montré que la teneur en lignine (Müller et al., 1988), et la teneur en polyphénols (Constantinides et Fownes, 1994) sont de bons indicateurs de la qualité des résidus.

Cependant, il s'avère que les relations quantitatives établies à l'aide de ces caractéristiques chimiques n'expliquent que les cinétiques de minéralisation du C et de N des résidus pour lesquels elles ont été établies, c'est-à-dire qu'aucune de ces relations n'est suffisamment générique pour être validée sur une large gamme de résidus couvrant des qualités chimiques contrastées.

D'autres caractéristiques des résidus pourraient également être prises en considération. L'importance de l'architecture tissulaire des résidus végétaux a été peu prise en compte pour expliquer les différences de décomposition. Les monocotylédones et les dicotylédones présentent des différences anatomiques pour un même organe qui sont susceptibles d'expliquer leurs variations de biodégradabilité (Wilson and Hatfield, 1997). Récemment, Dresboll and Magid (2006) ont montré que des pailles de chanvre et de miscanthus se décomposaient différemment dans un sol alors que leur composition chimique était similaire. Ces travaux ont montré que ces pailles présentaient des différences en termes de rigidité des structures pariétales et de degré de lignification, et ont conclu sur le fait que l'architecture tissulaire des résidus végétaux était aussi importante que la composition chimique des résidus pour déterminer leur taux de décomposition dans le sol. Une autre étude récente a montré que les proportions des tissus vasculaires et du sclérenchyme étaient des facteurs déterminants de la décomposition (Bertrand et al., 2006). D'autres travaux ont montré que la localisation des résidus (Coppens et al., 2006) et leur taille (Angers and Recous, 1997) agissent sur le contact avec le sol et affectent la dynamique de décomposition des résidus.

### **2.3. Parallèle entre décomposition des résidus végétaux dans les sols et digestibilité des fourrages par les ruminants**

Le processus de décomposition des résidus végétaux dans les sols est conceptuellement proche du processus de digestibilité des fourrages (parties aériennes des plantes destinées à l'alimentation animale) par les ruminants (Chesson et al., 1997). La décomposition dans le sol et la digestibilité dans le rumen sont deux processus de biodégradation effectués par des microorganismes impliquant un substrat commun et faisant intervenir des enzymes ayant la même spécificité pour dégrader ce substrat. Cependant, la dégradation des résidus végétaux dans le rumen diffère de celle dans le sol à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'échelle de



temps : la mesure de la biodégradation des parois cellulaires des plantes dépasse rarement 96 heures dans le rumen (Chesson et al., 1997) alors qu'elle est réalisée sur plusieurs mois dans le sol. Une autre différence majeure entre les deux processus est la présence ou non d'oxygène dans le milieu : la décomposition dans le sol s'effectue majoritairement en conditions aérobies (selon les conditions environnementales) alors que la digestion dans le rumen s'effectue exclusivement en condition anaérobie. Ceci implique une différence dans la nature des microorganismes décomposeurs selon le milieu. Malgré ces différences majeures entre les deux processus, les recherches sur la qualité des résidus de culture et leur décomposition dans les sols se sont beaucoup basées sur les concepts de la digestibilité des fourrages et sur leurs modèles expérimentaux, lesquels ont servis à améliorer la compréhension des relations entre la qualité des résidus et leur biodégradabilité.

De nombreuses études ont permis d'établir des relations entre la composition chimique des plantes fourragères et leur taux de digestibilité dans le rumen (Chesson et al., 1983 ; Chesson et al., 1988 ; Jung, 1989 ; Cherney et al., 1990 ; Cherney et al., 1991 ; Akin, 1993). Les études sur la digestibilité des fourrages se sont essentiellement focalisées sur le rôle des parois cellulaires, la fraction soluble des fourrages n'étant pas considérée comme un facteur limitant leur digestibilité. Ces travaux ont montré que l'efficacité d'utilisation des fourrages par les ruminants était principalement limitée par la quantité et la qualité des lignines. La lignine exerce un effet négatif sur la digestibilité des polysaccharides pariétaux en protégeant ces polysaccharides de l'hydrolyse enzymatique (Jung and Deetz, 1993). De plus, particulièrement chez les graminées, la présence d'acides phénoliques, et plus particulièrement d'acide férulique renforce l'effet de la lignine en jouant un rôle majeur dans l'association des polysaccharides pariétaux aux lignines et limitent ainsi l'accès des polysaccharides pariétaux aux microorganismes du rumen (Iiyama et al., 1990 ; Jung and Allen, 1995 ; Ralph et al., 1995 ; Grabber et al., 2004).

La stratégie adoptée pour améliorer la digestibilité des fourrages a été d'étudier les effets d'une réduction de la quantité et/ou d'une altération de la qualité des composés phénoliques (lignine et acides phénoliques) au niveau des résidus. Dans ce but, certaines espèces de céréales comme le maïs, le sorgho ou le millet présentant différentes mutations dans la voie de biosynthèse des lignines ont été utilisées comme plantes modèles (Cherney et al., 1990, Cherney et al., 1991 ; Barrière and Argillier, 1993). Les parties aériennes de certains de ces mutants, nommés brown-midrib (bm), présentent des taux de digestibilité supérieurs à ceux des plantes non mutantes. L'intérêt d'utiliser ces mutants était d'identifier les facteurs chimiques expliquant leur meilleure digestibilité par rapport aux plantes non mutantes, et de

transférer ces facteurs à d'autres espèces de céréales par mutation dirigée ou croisements pour les rendre plus digestes. Chez le maïs, quatre mutations brown-midrib (bm1, bm2, bm3 et bm4) ont été caractérisées (Cherney et al., 1991). Toutes ces mutations sont des mutations naturelles spontanées qui généralement engendrent, dans les parties aériennes, une réduction de la teneur en lignine par rapport aux plantes non mutantes. Certains mutants présentent également une réduction de la teneur en acides phénoliques ainsi qu'une altération de la qualité des lignines par rapport aux plantes non mutantes (Kuc and Nelson, 1964 ; Lapierre et al., 1988 ; Cherney et al., 1991 ; Barrière and Argillier, 1993). Certains mutants montrent un meilleur potentiel de biodégradation dans le rumen que celui des plantes non mutantes (Cherney et al., 1991 ; Barrière and Argillier, 1993), confirmant l'hypothèse selon laquelle la lignification des parois cellulaires était un facteur limitant la digestibilité des polysaccharides pariétaux (Cherney et al., 1991). L'étude de ces mutants a permis d'établir des relations entre la composition chimique des fourrages et leur taux de digestibilité. Par exemple, le meilleur potentiel de biodégradation dans le rumen de certains mutants bm et leur plus faible teneur en lignine par rapport aux plantes non mutantes ont permis de mettre en évidence une relation inverse entre teneur en lignine et taux de digestibilité. Il en est de même pour les agents participant à l'organisation des parois de graminées, les acides phénoliques dont la teneur est inversement corrélée à la digestibilité des parois cellulaires (Kuc and Nelson, 1964; Kuc and Nelson, 1968 ; Cherney et al., 1991 ; Barrière et al., 2004). Cette relation montre que, au-delà de l'aspect quantitatif des composés pariétaux, l'agencement des molécules au sein des parois cellulaires est une caractéristique importante déterminant leur digestibilité dans le rumen.

L'aspect organisationnel des composés pariétaux, dont le rôle dans la digestibilité des parois cellulaires a été souligné depuis de nombreuses années, a été peu pris en compte pour caractériser la décomposition des résidus végétaux dans le sol. Récemment, White et al. (2007) a montré que les cinétiques de minéralisation du carbone de sorgho étaient similaires entre certaines plantes mutantes bm et non mutantes après 194 jours de décomposition. Cependant, Hopkins et al. (2001) a étudié la décomposition des tiges de tabac présentant des modifications génétiques dans la voie de biosynthèse des lignines, et a montré que les plantes transgéniques se décomposaient plus rapidement dans le sol que les plantes non génétiquement modifiées. Une approche basée sur l'ingénierie génétique pourrait permettre de moduler la qualité des résidus végétaux et leur taux de décomposition dans les sols.

D'autres travaux menés sur la digestibilité des fourrages par les ruminants ont souligné l'importance de l'architecture tissulaire dans le processus de biodégradation des résidus végétaux dans le rumen (Akin, 1989 ; Wilson and Mertens, 1995). L'étude réalisée par Travis

et al. (1996) montre que l'épaisseur du sclérenchyme, l'épaisseur et la densité de l'épiderme sont des caractéristiques anatomiques adaptées pour estimer la biodégradation des hémicelluloses du blé et de l'orge par des enzymes spécifiques du rumen. Néanmoins, dans le cas des mutants brown-midrib, la mutation n'aurait pas d'impact significatif sur l'architecture tissulaire des parties aériennes (Méchin et al., 2005). Le potentiel accru de la digestibilité des parties aériennes des mutants bm par rapport à celles des plantes non mutantes serait principalement lié aux modifications de la qualité chimique des parois cellulaires.

La digestibilité des fourrages peut également être limitée par la qualité des lignines et le type de parois cellulaires. La composition des parois cellulaires dépend du type de tissus, de la nature de l'organe et de l'espèce. A teneur égale en lignine, les parois cellulaires riches en lignines de type G et riches en lignines condensées sont généralement moins biodégradables que les parois riches en lignines de type S et/ou moins condensées. Au sein des parois cellulaires, la lamelle moyenne et la paroi primaire sont plus concentrées en lignines par rapport à la paroi secondaire, mais aussi riches en lignines de type G, et sont des zones particulièrement résistantes à la biodégradation (Akin et al., 1993). La cohésion des parois cellulaires est étroitement associée à la nature des polymères. La qualité des polymères peut être une indication complémentaire à la composition des parois cellulaires dans la compréhension des mécanismes de biodégradation.

#### **2.4. Représentation de la qualité chimique des résidus dans les modèles de décomposition des résidus végétaux dans les sols**

Les modèles sont des outils utilisés pour comprendre, décrire et prédire les différentes étapes intervenant dans un processus physique, chimique ou biologique. Les modèles expérimentaux se distinguent des modèles mathématiques. Les paragraphes précédents ont décrit l'utilisation des plantes mutantes brown-midrib comme modèles expérimentaux pour étudier les facteurs déterminants de la digestibilité. Les modèles mathématiques sont une représentation mathématique d'un processus physique, biologique ou chimique, réalisée afin de mieux pouvoir étudier celui-ci.

Depuis les années 1970, de nombreux modèles mathématiques ont été développés pour simuler les dynamiques des matières organiques du sol et prédire leur évolution en réponse aux différents scénarii relatifs au changement climatique global ou aux pratiques culturales (Fang et al., 2005). Le réseau « SOMNET » (Soil Organic Matter Network :

[www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/aen/somnet/index.htm](http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/aen/somnet/index.htm)) du GCTE (Global Change and Terrestrial Ecosystems : [www.gcte.org](http://www.gcte.org)) en rassemble 36.

Ces modèles peuvent être classés en deux catégories. D'une part, les modèles empiriques permettent d'établir une relation linéaire ou non entre les caractéristiques des matières organiques et leur taux de décomposition dans le sol. D'autre part, les modèles mécanistes décrivent les processus liés à la minéralisation des matières organiques par des équations mathématiques. Ce sont des modèles dynamiques qui simulent essentiellement les cinétiques de minéralisation du C et de N à partir des caractéristiques des matières organiques.

Un certain nombre de modèles mathématiques sont dits « compartimentaux ». Les compartiments représentent différentes formes de C et N organique (et minéral) et les flux entre ces compartiments (MO des résidus de culture, MO microbien, MO humifiée, ...) (Jenkinson and Rayner, 1977). Les modèles diffèrent généralement par le nombre et la nature des compartiments organiques considérés et les ordres des cinétiques de biotransformation du C et de N.

La description de la qualité chimique des résidus végétaux varie selon les modèles. Dans les modèles les plus simples, la qualité des résidus est décrite par un seul compartiment. C'est le cas du module « résidus » de STICS qui décrit la qualité des résidus par leur rapport C/N (Nicolardot et al., 2001). Dans d'autres modèles, la qualité des résidus est décrite par plusieurs compartiments qui se différencient par leur récalcitrance plus ou moins grande à la décomposition, celle-ci pouvant être caractérisée par l'analyse chimique (Molina et al., 1983 ; Coleman and Jenkinson, 1995 ; Paustian et al., 1997 ; Garnier et al., 2003 ; Henricken et al., 2007). Par exemple, dans le modèle RothC, la qualité des résidus végétaux est décrite par l'intermédiaire de deux compartiments : un compartiment labile qui se décompose rapidement et un compartiment plus récalcitrant à la décomposition (Jenkinson and Rayner, 1977). D'autres modèles, tel que CANTIS (Neel, 1996), décrivent la qualité des résidus végétaux par quatre compartiments correspondant aux fractions soluble, cellulose, hémicelluloses et lignine des résidus végétaux déterminées par la méthode Van Soest (1963).

Généralement, les flux entre compartiments ou vers l'environnement sont modélisés par différentes équations mathématiques de premier ordre. Chaque compartiment est caractérisé par sa taille (exprimée par sa quantité de C) et une constante de décomposition  $k$  propre et uniforme au cours de la décomposition, et dans le cas des modèles simulant les dynamiques de l'azote, d'une quantité d'azote.

Une étude de Smith et al. (1997) a comparé la performance de neuf modèles mathématiques sur la prévision de l'évolution des matières organiques du sol à long terme à

partir de jeux de données expérimentales obtenus à partir de différentes pratiques culturales. Cette revue montre que les modèles RothC et CENTURY sont les deux modèles capables de simuler au mieux les données expérimentales parmi les neuf modèles utilisés (RothC (Jenkinson et al., 1987), CANDY (Franko, 1996), DNDC (Li, 1996), CENTURY (Parton et al., 1987), DAISY (Jensen et al., 1994), NCSOIL (Nicolardot et al., 1994), SOMN (Chertov et al., 1997), ITE (Thornley and Verberne, 1989), Verberne (Verberne, 1992)). Le modèle RothC (Rothamsted Carbon model), un des modèles compartimentaux les plus utilisés pour simuler les dynamiques des matières organiques dans le sol, a été développé par Jenkinson et Rayner (1977) à partir des données expérimentales sur un site d'étude anglais (The Rothamsted Institute). Ce modèle simule les dynamiques du C organique dans les sols en fonction du type de sol, de la température, de l'humidité et de la présence ou non d'un couvert végétal. Le modèle RothC a pu être validé sur de nombreux sites. Les matières organiques y sont décrites en cinq compartiments : deux compartiments végétaux différenciés par leur récalcitrance à la biodégradation (« DPM » et « RPM »), un compartiment microbien labile (« BIO »), un compartiment stable correspondant à la matière organique humifiée (« HUM ») et un compartiment plus stable encore à l'échelle des millénaires (« IOM ») (Figure 9).

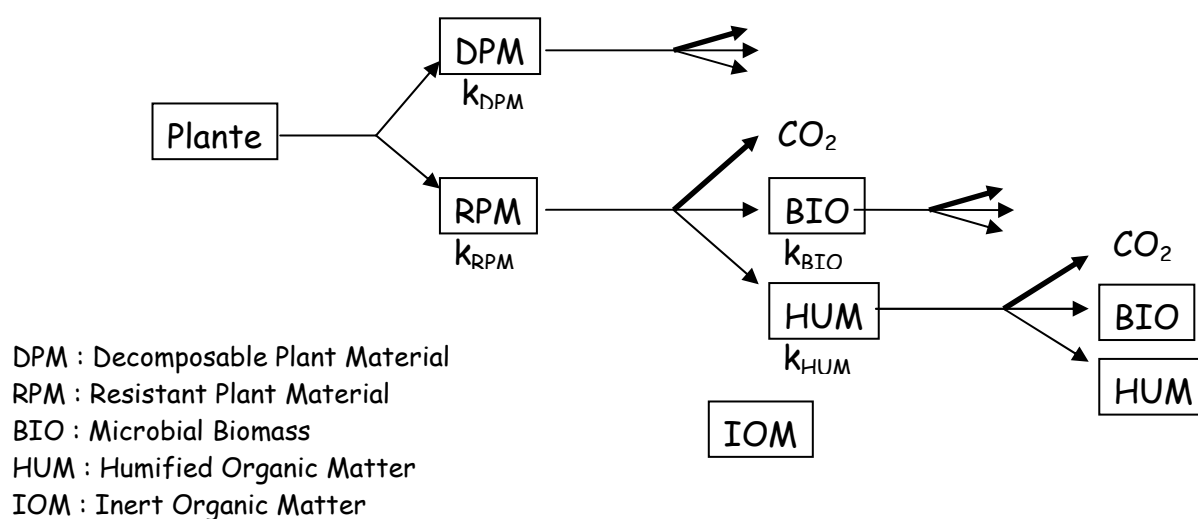


Figure 9 : Structure du modèle RothC (d'après Coleman and Jenkinson, 1996).

Les modèles représentant la qualité chimique des résidus végétaux par un ou plusieurs compartiments permettent généralement de décrire les cinétiques de décomposition et les flux de C et N associés pour un résidu végétal donné. Mais les limites de ces modèles sont liées à la simplification de la représentation de la qualité biochimique et aux limites des critères décrivant la qualité chimique des résidus végétaux évoquée auparavant. Par exemple,

l'utilisation des paramètres du modèle STICS établis sur une large gamme de résidus végétaux (tiges et feuilles d'une diversité d'espèces végétales cultivées) n'a pas permis de décrire la décomposition de racines, leur minéralisation étant alors systématiquement surestimée (Abiven et al., 2005). Une autre faiblesse de ce genre de modèles est qu'ils prennent peu en compte les régulations liées à la disponibilité des éléments (en particulier interactions entre disponibilités du carbone et azote), et les interactions entre nature des substrats et dynamique des communautés microbiennes qui sont susceptibles d'influencer le processus de décomposition. Un modèle récent (Guild-based Decomposition Model ou GDM) prend en compte les interactions entre C et N, et propose notamment de lier de manière dynamique les microorganismes à la composition chimique des substrats au cours du temps (Moorhead and Sinsabaugh, 2006).

Cette étude bibliographique montre que malgré les très nombreux travaux relatifs à l'influence de la qualité chimique des matières organiques sur leur décomposition dans le sol (dynamique et taux) menés depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, la description actuelle de la qualité chimique des matières organiques dans les modèles de biotransformations du carbone et de l'azote est relativement simplifiée et imparfaite. Basée principalement sur des données quantitatives ne représentant « que » les différentes fractions des matières organiques, elle ne tient pas compte, dans la plupart des cas, des interactions multiples existant entre ces fractions (les liaisons cellulose-hémicelluloses-lignine, par exemple) malgré leur influence sur le processus de biodégradation. Pour améliorer notre compréhension des déterminants de la décomposition dans les sols et sa modélisation, il semble nécessaire de caractériser de façon approfondie la composition et l'organisation des constituants des résidus végétaux.

### **3. Stratégie de recherche**

#### **3.1. Problématique et questions scientifiques**

Certains écosystèmes sont directement modifiés par les activités anthropiques (utilisation des terres agricoles, déforestation) à l'origine des modifications des dynamiques du carbone dans les systèmes atmosphère-eau-terre. D'autres écosystèmes, non directement modifiés par ces activités, sont actuellement exposés à de profondes mutations dues notamment au réchauffement global du climat et à l'augmentation des teneurs en CO<sub>2</sub> atmosphérique.

Dans le contexte d'une agriculture pour le développement durable, visant à modifier les pratiques culturales (réduction du travail du sol, réduction de l'apport des intrants), préserver la biodiversité des sols, favoriser la séquestration du carbone dans le sol et limiter sa contribution dans les émissions de gaz à effet de serre, ceci amène à donner un rôle plus important aux matières organiques dans le maintien de la qualité des sols. L'évaluation des impacts environnementaux associés aux cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote nécessite d'améliorer la connaissance des processus de décomposition des matières organiques exogènes. La dynamique de biodégradation de ces matières organiques dans les sols détermine à court terme les flux de carbone et de nutriments dans le sol (disponibilité des nutriments), vers l'hydrosphère (transport de C et N solubles) et vers l'atmosphère (émissions de gaz à effet de serre). A plus long terme, ce processus détermine la nature et la quantité de matière organique des sols et les impacts environnementaux associés : fonction « puits » des sols pour le stockage du carbone, caractéristiques physiques et chimiques, fertilité minérale des sols... Combinées à d'autres pratiques culturales des agro-écosystèmes, ces matières organiques influencent la dynamique d'autres éléments (molécules xénobiotiques) et la biodiversité microbienne des sols. Les racines de la plupart des plantes restent dans les sols et représentent ainsi une des principales sources de carbone entrant dans les sols. Les études menées sur la décomposition des racines dans le sol sont relativement peu nombreuses et la description de leur qualité chimique dans les modèles de biotransformations du carbone et de l'azote nécessite d'être améliorée pour pouvoir mieux gérer les flux de carbone et d'azote dans les agro-écosystèmes.

### **3.2. Objectifs scientifiques**

Les objectifs principaux de ce travail de recherche ont été les suivants :

- (i) Identifier des critères caractérisant la composition chimique initiale de la matière organique constitutive des racines, influençant de façon significative leur décomposition dans les sols,
- (ii) Caractériser le rôle de la microflore colonisatrice des racines sur leur qualité chimique initiale et évaluer son importance sur le processus de décomposition,
- (iii) Déterminer des bio-marqueurs de l'impact de la composition chimique initiale des racines sur la qualité chimique de la matière organique du sol.

### 3.3. Hypothèses de recherche

Nous avons vu dans la synthèse bibliographique que les critères utilisés pour caractériser les résidus végétaux en vue de prédire leur décomposition dans les sols (C/N, récalcitrance chimique caractérisée par différentes méthodes, composés spécifiques tels que les polyphénols et leurs différents rapports) étaient très imparfaits et peu transposables d'un type de résidu à un autre.

La première hypothèse est qu'une analyse plus approfondie de la composition chimique initiale des racines telle qu'elle est pratiquée dans d'autres domaines d'étude des matières ligno-cellulosiques (transformation de la biomasse, digestibilité des fourrages), peut s'appliquer aux résidus végétaux et contribuer à l'amélioration de la compréhension des déterminants de la décomposition dans les sols et sa modélisation. Ces études s'attachent notamment à la caractérisation des polysaccharides et des lignines et à l'agencement de ces macromolécules au sein des parois cellulaires.

Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, les caractéristiques des résidus végétaux qui influencent leur décomposition dans le sol sont multiples (composition chimique, architecture tissulaire, taille) et l'approche qui consiste à faire varier la qualité biochimique en comparant divers résidus provenant d'espèces végétales différentes et/ou d'organes différents d'un même végétal, a pour conséquence de faire varier plusieurs de ces caractéristiques simultanément. Notre deuxième hypothèse est que la difficulté à hiérarchiser les critères génériques de la qualité chimique et leurs rôles sur le processus de décomposition dans le sol provient de cette variation simultanée et non maîtrisée de facteurs chimiques, histologiques et morphologiques. La décorrélation de ces composantes pourrait permettre des progrès décisifs.

La troisième hypothèse est spécifique aux racines et repose sur le constat que des microorganismes colonisent les racines des plantes pendant leur croissance et, ces derniers sont susceptibles d'influencer la qualité chimique initiale des résidus racinaires restant après la récolte. Nous examinerons si cette colonisation est susceptible d'influencer significativement les vitesses de décomposition des racines et par quel processus.

La dernière hypothèse examinée dans ce travail concerne les relations entre la qualité chimique initiale des résidus végétaux et les caractéristiques chimiques de la matière organique humifiée dans le sol à l'issue de la décomposition (moyen à long terme). Cette hypothèse nous a amené à identifier des bio-marqueurs reliant la qualité chimique initiale des racines à la qualité chimique de la matière organique du sol.



### 3.4. Démarche d'étude

La démarche générale adoptée a consisté à sélectionner des résidus végétaux présentant uniquement des variations au niveau de leur qualité chimique. Pour cela, l'utilisation de plantes présentant des variations de la qualité chimique au sein d'un même organe d'une même espèce et cultivée dans des conditions environnementales similaires a été privilégiée. Comme nous l'avons évoqué dans la section état de l'art, cette stratégie a déjà été adoptée dans les études relatives à la digestibilité des fourrages par les ruminants. Nous avons tiré profit de l'impact de la variabilité génétique de la composante pariétale de racines de maïs récoltées au champ à partir de 16 génotypes obtenus à partir d'hybrides et de deux lignées parentales avec leurs différents mutants brown-midrib (cf. annexe I « échantillonnage »). Cependant notre étude ne vise pas à comparer l'impact des mutations sur les caractéristiques des racines, ni même à les comparer aux études réalisées sur les parties aériennes. Ces plantes modèles ont été utilisées comme outils pour identifier des critères de qualité chimique déterminant la décomposition des racines dans le sol. L'impact des différentes mutations brown-midrib sur la composition chimique des parois cellulaires de racines n'a donc pas été spécifiquement étudié. Notre travail est donc basé sur les concepts de ces études de digestibilité et sur leurs modèles expérimentaux, lesquels ont servis à améliorer la compréhension des relations entre la qualité des résidus et leur biodégradabilité.

- ✓ Au niveau de ces racines, l'absence de variations de l'architecture tissulaire entre des plantes mutantes et non mutantes a été vérifiée à travers des mesures d'épaisseur de parois cellulaires en microscopie optique (cf. annexe II « architecture tissulaire »). La première étape a consisté à vérifier l'impact de la variabilité génétique du maïs sur la qualité chimique des parois cellulaires des racines.
- ✓ Une analyse statistique des relations entre la qualité chimique initiale des racines et leur décomposition dans le sol a été menée pour identifier et hiérarchiser les déterminants de la décomposition.
- ✓ Des méthodes de caractérisation des lignines mises au point sur des matrices végétales et sols ont été utilisées pour suivre des bio-marqueurs de l'impact de la composition chimique initiale des racines sur leur évolution à moyen terme dans le sol.
- ✓ L'évaluation du rôle des microorganismes colonisateurs sur la qualité chimique des racines et sur la décomposition dans le sol a été menée à travers des incubations croisées de racines stérilisées ou non dans un sol stérilisé ou non.

- ✓ Enfin, le modèle RothC a été utilisé pour simuler les cinétiques de minéralisation du carbone des racines. Les résultats obtenus sur la composition chimique initiale des racines et son évolution au cours de la décomposition ont servi à paramétrer le critère de qualité utilisé par ce modèle et surtout à en discuter la pertinence.

#### **4. Plan de la thèse**

Ce manuscrit est organisé en six chapitres. Cette présentation repose sur un découpage des travaux en trois articles scientifiques soumis pour publication dans des revues internationales à comité de lecture, et d'un chapitre dont les résultats seront prochainement publiés. Les principaux résultats sont regroupés et commentés dans une discussion générale, incluant les perspectives possibles de ce travail. Enfin, l'ensemble des références bibliographiques utilisées et les annexes sont regroupés à la fin de ce manuscrit.

#### **Chapitre 2 : Décomposition des racines de maïs dans le sol : interactions entre les caractéristiques chimiques et la présence des microorganismes colonisateurs**

Ce chapitre étudie les interactions entre la présence de microorganismes colonisateurs dans les racines et la composition chimique des racines, et quantifie leurs impacts sur la décomposition des racines dans le sol.

#### **Chapitre 3 : Décomposition dans le sol et modifications de la qualité chimiques des racines de maïs caractérisées par des variations génétiques affectant la qualité chimique des parois cellulaires**

Ce chapitre a pour principal objectif d'évaluer le rôle de la composition chimique des racines sur leur décomposition dans le sol. Nous montrons qu'une analyse approfondie de la composition chimique et de l'organisation des composés pariétaux au cours de la décomposition permet d'identifier des critères de qualité chimique qui influencent la décomposition des racines dans le sol.

**Chapitre 4 : Minéralisation du C des racines de 16 géotypes de maïs ayant une composition chimique variable : explication et prévision de la décomposition sur le court et long termes**

Ce chapitre complète les résultats du chapitre 3 et montre que la prise en compte des interactions entre les composés pariétaux améliore la prévision de la décomposition des racines dans le sol. Le modèle RothC a été utilisé pour simuler les cinétiques de minéralisation du C des racines et une nouvelle paramétrisation de la qualité chimique des racines dans ce modèle est proposée.

**Chapitre 5 : Evaluation des composés phénoliques dans les sols et dans les plantes par oxydations alcalines et thioacidolyse**

Ce chapitre vise à identifier des bio-marqueurs de l'impact de la qualité chimique initiale des racines sur leur évolution à moyen terme dans le sol. Des méthodes de caractérisation des lignines mises au point sur des matrices végétales et sols ont été utilisées. Ce chapitre rapporte pour la première fois la capacité de la thioacidolyse à être utilisée sur une matrice sol.

# CHAPITRE 2

## **Soil biodegradation of maize root residues: interaction between chemical characteristics and the presence of colonizing microorganisms**

**Gaylord Erwan Machinet<sup>a</sup>, Isabelle Bertrand<sup>a</sup>, Brigitte Chabbert<sup>a</sup>,  
Françoise Watteau<sup>b</sup>, Geneviève Villemin and Sylvie Recous<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*INRA, UMR614 FARE, 2 esplanade Roland Garros, F-51100 Reims, France*

<sup>b</sup>*Laboratoire Sols et Environnement, Nancy Université, INRA, 2 avenue de la forêt de Haye,  
F-54505 Vandoeuvre les Nancy, France*



## Soil biodegradation of maize root residues: interaction between chemical characteristics and the presence of colonizing microorganisms

### Abstract

Due to their direct contact with the soil, roots are exposed to colonizing microorganisms that persist after the plant has died. These microorganisms may affect intrinsic root chemical quality and the kinetics of root residue decomposition in soil, or interact with soil microorganisms during the decomposition process. The aim in this work was to determine i) the interactions between the presence of colonizing microorganisms on root residues and root chemical quality and ii) to quantify the effect of these microorganisms on root decomposition. Roots were selected from six maize genotypes cultivated in the field and harvested at physiological maturity. The roots of two genotypes (F2 and F2bm1) had a higher N content, lower neutral sugars content and higher Klason lignin content than the other genotypes (F292, F292bm3, Mexxal, Columbus). Location of the root residue microorganisms by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy revealed that F2 and F2bm1 roots were more colonized than roots of the other genotypes. Electron Dispersive XRay microanalyses of *in situ* N confirmed a higher N content in the colonizing microorganisms than in the root cell walls. Residues of F2 and F2bm1 roots decomposed more slowly and to a lesser extent than those of the other genotypes during incubation in a silty loam soil under controlled conditions (15°C, -80 kPa). 40.6% of the total added C was mineralized by F292 but only 20.7% by F2bm1. These results suggest that residue-colonizing microorganisms decompose the cell-wall sugars to varying extents before soil decomposition thereby modifying the chemical quality of the residues and their mineralization pattern in soil. Due to their high N content, colonizing microorganisms also impact on the total N content of root residues, thereby affecting their C to N ratio. Gamma sterilized root residues were incubated under the same conditions as non-sterilized residues to see if microorganisms colonizing root residues could modify the action of soil microorganisms during decomposition. Similar C mineralization rates were observed for both non-sterilized and sterilized residues, indicating that the residue microorganisms did not quantitatively affect the activity of soil microorganisms.

**Keywords:** Root residues, microorganisms, N content, decomposition, chemical characteristics, C kinetics, cell wall.

## 1. Introduction

Most roots remain in the soil after harvest and are known to greatly contribute, possibly more than aerial plant parts, to building up soil organic matter (Puget and Drinkwater, 2001; Rasse et al., 2005). At a given stage of plant maturity, roots contain more cell walls and are more lignified than aerial plant parts (Bertrand et al., 2006; Carrera et al., 2008). These intrinsic characteristics help to explain the low rate of root decomposition in soil but the impact of colonizing microorganisms on root residue quality and decomposition remains unclear.

The fact that most plant residues contain populations of bacteria and fungi has often been overlooked (Parr and Papendick, 1978). These microorganisms, some of which may be plant pathogens, are known to colonize the crop tissues before and after harvest (Cook et al., 1978). Species of *Alternaria*, *Cladosporium* and *Fusarium* (field fungi) are frequently observed in field infections of cereal seeds (Clarke and Hill, 1981; Sauer et al., 1982). Many field fungi are pathogenic on senescent, weakened, or damaged plants and may persist into a saprophytic growth phase after the plant has died (Miller, 1983). These microorganisms are able to modify the chemical composition of above and underground parts of the living plant that may persist after harvest. Lignin, for instance, is formed in response to mechanical damage or wounding and many plants respond to microbial attack by depositing lignin and other wall-bound phenolic materials at the point of attack (Boudet et al., 1995; De Ascensao and Dubery, 2003). The polysaccharides in plant tissues may be degraded during intensive colonization by microorganisms such as rot-fungi so that the residue becomes enriched in microbial organic nitrogen (Villemin et al., 1995; Watteau et al., 2002; Karroum et al., 2005). Tester had shown earlier (1988) that wheat straw was populated with microorganisms able to decompose readily available substrates in the straw during the first stage of decomposition, whereas the final stage of straw decomposition seemed to be accelerated by soil microorganisms. However, to our knowledge, few results have been published concerning the quantitative impact of residue-colonizing microorganisms on the dynamics of residue decomposition in soils.

Roots are probably the plant parts most exposed to microorganisms due to their direct contact with the soil matrix in the rhizosphere. This root-soil contact can lead to beneficial (mycorrhizas) or damaging (pathogenous) associations for the plant, all of which can affect the chemical composition and cell wall structure of the root residues. Maize roots taken up just before harvest i.e. from a living plant, were shown to be colonized by Gram-negative

bacteria that altered root cell wall anatomy and probably the pattern of root biodegradation (Watteau et al., 2006).

The aims in this study were to investigate interactions between root colonizing microorganisms and root chemical quality and to quantify their impact on root decomposition in soil. As part of a larger program to assess the relationships between the chemical characteristics of crop roots and their decomposition in soil (Machinet et al., in press), roots were selected from several maize genotypes with the same tissue architecture but different chemical characteristics and organic N contents. The location and nature (bacteria or fungi) of the residue microorganisms were first examined by scanning electron microscopy (SEM), and then specified by transmission electron microscopy (TEM). Their effects on the chemical quality of the maize roots were determined at an ultrastructural level by EDX microanalysis (TEM/EDX) and by wet chemistry. The impact of microorganisms on root residue decomposition in soil was quantified in incubation experiments under sterile and non-sterile conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Soil and maize roots

Soil was collected from 5 to 30 cm depth at the INRA Experimental Station in Estrées-Mons, France. The soil had a silty loam texture (17.8% clay, 77.3% silt, 3.8% sand), with 0.95% organic C, and a pH (H<sub>2</sub>O) of 7.6. The soil was air-dried to a moisture content of 120 mg. g<sup>-1</sup> dry soil for two days, and then immediately sieved to 2-3.15 mm. All visible organic residues were removed by hand after sieving. The soil was stored at 15°C for a week prior to incubation.

Four maize (*Zea mays* L.) lines (F2, F2bm1, F292, F292bm3), and two maize hybrids (Mexxa1 and Columbus) were studied. All genotypes were grown in experimental fields at the INRA Experimental Station in Lusignan and harvested at physiological maturity. Only the roots were kept for experiments. These roots were washed with a 50 g l<sup>-1</sup> sodium metaphosphate solution for 24 h, rinsed with deionised water to remove soil particles, and then dried for one week at 30°C. Calibrated roots of 2 to 3 mm diameter were selected for the study and represented nearly half of the maize root biomass sampled.

For incubations in sterile conditions, root and soil samples in hermetically sealed plastic bags were sterilized by 45 kGy gamma irradiation from a <sup>60</sup>Co source (Ionisos, Dagneux,



France). After sterilization, the soil was stored at 4°C for eight weeks until the beginning of the experiment to limit the action of active enzymes in the soil samples after irradiation (Lensi et al., 1991). Sterile soil was designated as SS and non-sterile soil as NSS.

### 2.2. Incubation experiment

Soil samples (either sterilized by gamma irradiation (SS) or not sterilized (NSS)) were mixed with 5 mm long pieces of maize roots (sterilized (SR) or not (R)) at a rate equivalent to 3 g C kg<sup>-1</sup> dry soil, and incubated for 49 days at 15°C. Potassium nitrate was added to obtain a final concentration of 65 mg N kg<sup>-1</sup> soil in the SS and NSS treatments so that decomposition would not be limited by N availability (Recous et al., 1995). The concentration of the added N solution was calculated to bring the soil moisture content to 200 g H<sub>2</sub>O kg<sup>-1</sup> soil, equivalent to -80 kPa. Soil moisture was maintained throughout the incubation period by weighing weekly and readjusting with deionized water when necessary. Control treatments (no C added) with sterilized (SS) and non-sterilized soils (NSS) were also included. A glucose solution was added to SS at the rate of 3 g C kg<sup>-1</sup> dry soil (SS-Glu) to check that the soil remained sterile throughout the incubation period (49 days). All the treatments, including sterilized soils or residues, were manipulated under sterile conditions to avoid contamination.

Carbon mineralization was measured in triplicate for each residue-amended, control and glucose treatment, in soil samples (equivalent to 50 g dry soil) incubated in 250 ml glass jars in the presence of a CO<sub>2</sub> trap (10 ml 1 M NaOH). Carbon mineralization was measured 3, 8, 14, 21, 28, 38 and 49 days after the beginning of incubation.

The concentrations of CO<sub>2</sub> trapped in the NaOH solutions were measured by continuous flow colorimetry (Chaussod *et al.*, 1986) using an auto-analyzer (TRAACS 2000, Bran & Luebbe). The mineral N in the soil and residue extracts was analyzed by continuous flow colorimetry (TRAACS 2000, Bran & Luebbe). Concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were determined using an adaptation of the method proposed by Kamphake et al. (1967). Ammonium ions were determined following the method described by Krom (1980).

### 2.3. Chemical analysis of maize roots

The chemical characteristics of the roots were determined on two sample replicates before soil incubation. The total C and N contents of the roots were measured by elemental analysis (NA 1500, Fisons Instruments).

The initial root residues were subjected to a cell wall preparation process, which consisted of extracting the neutral detergent fiber (NDF) fraction as described by Goering and Van Soest (1970). Briefly, the soluble fraction was removed by boiling 1.5 g of roots (about 5 mm long / 2 mm diameter) in deionised water at 100°C for 30 min then extracting with a neutral detergent solution at 100°C for 60 min to remove cytoplasmic components and obtain the NDF fraction. This fraction was designated the cell wall residues. All residues from cell wall preparations were dried for one week at 30°C and ground to 80 µm.

The neutral sugar content of the cell wall residues was determined using the method described by Blakeney et al. (1983). Ten mg of sample were swollen in 125 µl 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 20°C then subjected to acid hydrolysis with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100°C. The monosaccharides released by the acid were separated by high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) on a CarboPac PA-1 column (4X250 mm, Dionex) as described by Beaugrand et al. (2004). Monosaccharide composition was analyzed and quantified using 2-deoxy-D-ribose as internal standard and standard solutions of neutral carbohydrates (L-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-rhamnose, D-mannose and L-fucose).

Klason lignin (KL) was determined as the acid-insoluble residue remaining after sulphuric acid hydrolysis of the cell wall polysaccharides (Monties, 1984). Briefly, 200 mg of cell wall residues were suspended in 2 ml of 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at room temperature. Suspensions were then diluted to 1 M with deionised water, heated at 100°C for 3 h and filtered. The remaining residues were dried at 105°C and ash measurements performed at 550°C for 4 h.

#### *2.4. Microscope observations*

Roots (about 5 mm long / 2 mm diameter) of the six maize genotypes were freeze-dried, mounted on stubs and coated with a gold layer of about 15 nm using a sputter coater (BALZERS SCD 40). The specimens were then transferred to the scanning electron microscope (SEM PHILIPS XL 30) and observed (three replicates per genotype) using an acceleration voltage of 10 KeV.

One millimetre pieces of root (two replicates per genotype) were fixed in 2% (w/v) osmium tetroxide in cacodylate buffer (pH = 7) for 1 h, dehydrated in graded acetone series and embedded in epoxy resin (Epon 812). Ultra-thin sections (80-100 nm) were cut with an ultramicrotome (Leica UltracutS) and set on Cu-grids or Ni-grids. Ultra-thin sections were then stained for transmission electron microscopy (TEM) observations with uranyl acetate

(Valentine, 1961) and lead citrate (Reynolds, 1963) and examined with a JEOL 1200 EMXII model transmission electron microscope (operated at 80 kV). Electron Dispersive XRay (EDX) microanalyses were performed on unstained ultra-thin sections using the same transmission electron microscope but equipped with an EDX microanalysis Brücker system (Silicon Drift detector). TEM microscopy was carried out on two replicates of three genotypes: F2bm1, F292bm3 and Columbus. The EDX microanalyses were performed on two genotypes: F2bm1 and Columbus (seven replicates per genotype).

### *2.5. Data treatment and analysis*

Carbon mineralization was calculated as the difference in released CO<sub>2</sub> between the amended residue and control soils, and expressed as a percentage of the added residue carbon.

Differences between genotypes were evaluated from the least significant difference (LSD,  $P \leq 0.05$ ) derived from the analysis of variance (ANOVA) (Genstat 8.1).

## **3. Results**

### *3.1. Chemical characteristics of maize roots*

The C content of the roots from the different maize genotypes varied significantly and was higher in F2 and F2bm1 than in the other genotypes (Table 1). The variations in N content followed the same patterns, the total root N concentration being significantly higher in F2 and F2bm1 than in F292, F292bm3, Mexxal and Columbus ( $P \leq 0.05$ ). No mineral N was detected in the roots (data not shown). The C to N ratio was therefore significantly lower in F2bm1 than in F2, which in turn had a significantly lower C to N ratio than the other genotypes (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). The NDS soluble fraction accounted for less than 20% of the dry matter whatever the genotype (Table 1), i.e. > 80% of the root dry matter were cell walls.

The major root polysaccharide monomers i.e. glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose, mannose and fucose, were neutral sugars (Table 1). F2bm1 and F2 contained significantly fewer than the other genotypes (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). The three main cell wall monosaccharides were glucose, xylose and arabinose, which together represented more than 97% of the cell wall monosaccharides. Cell wall glucose can be attributed to the cellulose fraction whereas the sum of arabinose and xylose provides a relatively good assessment of the hemicellulose fraction (arabinoxylans) (Brett and Waldron, 1996). The glucose contents of

the genotypes followed the variations in total neutral sugars (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). Hemicellulose accounted for 20.5-20.6 % of the cell wall in F2bm1 and F2 and 22.3-24.3% in the other genotypes (Table 1).

Klason lignin (KL) accounted for less than 24% of the root cell wall in all genotypes. Lignin content was significantly higher in F2bm1 (23.8%) and the lowest proportion of lignin was found in F292 and F292bm3 (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ).

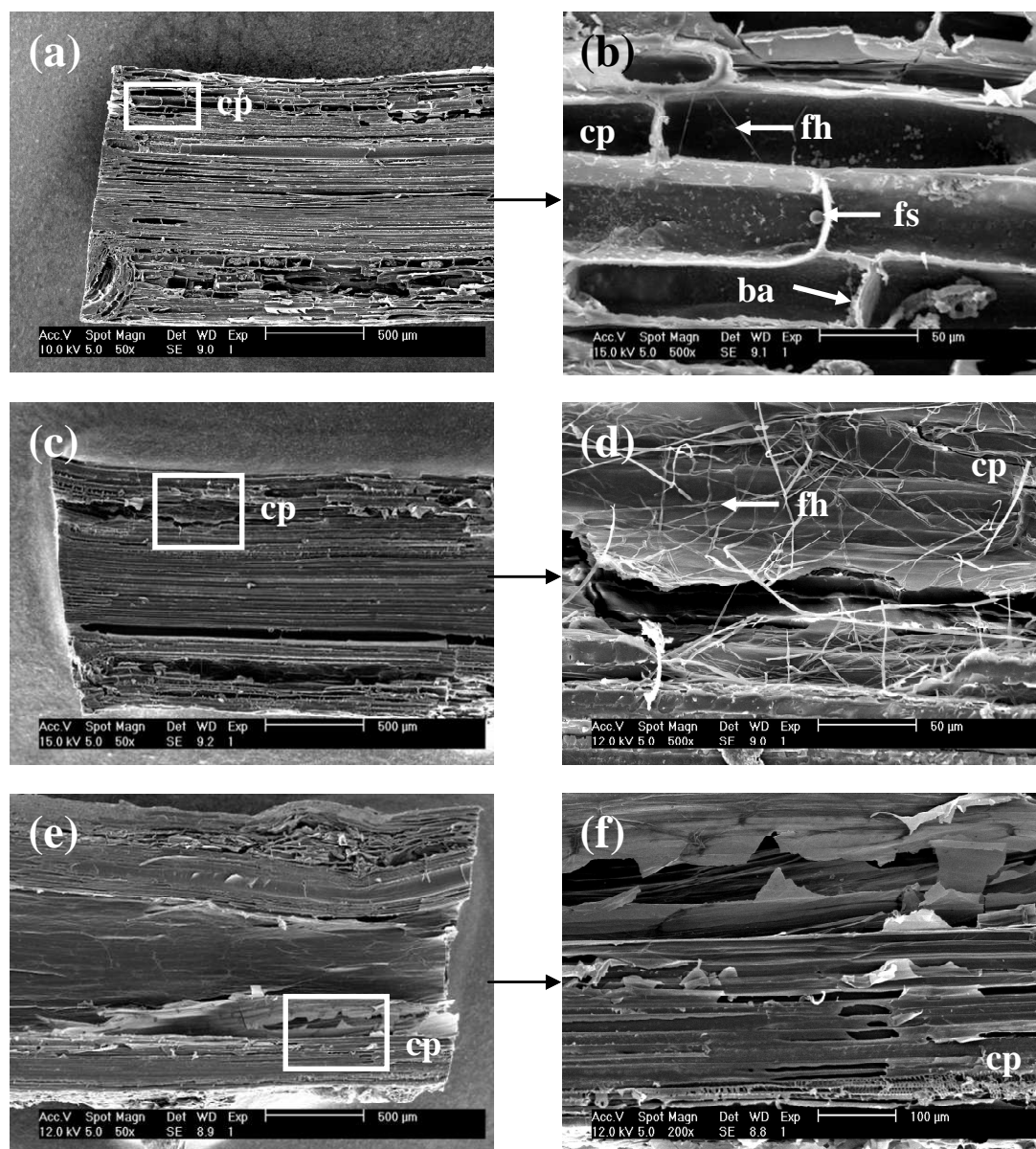
**Table 1:** Total C, N and chemical characteristics of maize root residues. The total amount of neutral sugars was represented by the sum of glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose, mannose, and fucose measured in the cell wall residues (NDF) and expressed as % of cell wall. Data are means of 2 replicates. Means not sharing a common letter within a row are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

	F2	F2 bm1	F292	F292 bm3	Mexxal	Colombus	LSD
Total C /% dry matter	49.3c	49.5c	47.8b	46.9a	46.7a	47.2a	0.42
Total N /% dry matter	1.1b	1.4c	0.9a	0.8a	0.9a	0.9a	0.07
C to N ratio	44b	35a	54c	58c	53c	53c	4.24
<i>Cell wall fraction</i>							
Cell wall /% dry matter	83.9b	80.6a	83.6b	86.0c	83.4b	82.9b	1.48
Total neutral sugars /% cell wall	54.4a	53.3a	60.3b	62.8b	60.5b	61.6b	2.72
Glucose /% cell wall	32.2a	31.4a	36.0b	37.2b	36.9b	38.0b	1.69
Xylose /% cell wall	18.2a	18.1a	20.4b	21.5c	19.9b	19.8b	0.63
Arabinose /% cell wall	2.4a	2.4a	2.6a	2.8a	2.4a	2.5a	0.23
Klason Lignin /% cell wall	21.0d	23.8e	18.6a	18.4a	19.5b	20.3c	0.41

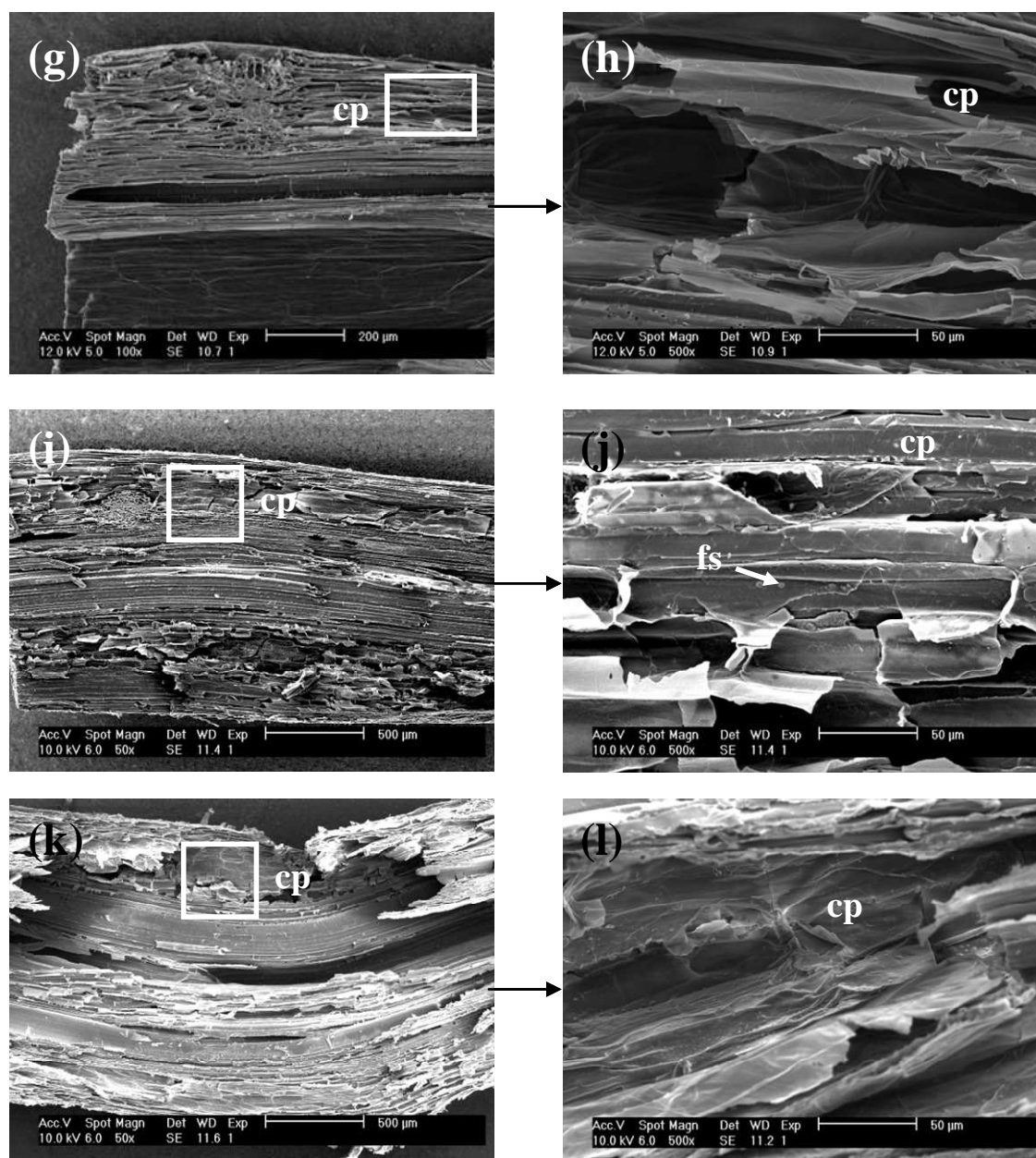
### 3.2. Location of colonizing microorganisms in maize roots

MEB observation of root residues before soil incubation revealed several tissue injuries particularly in the cortical parenchyma of F2 (Figure 1a) and F2bm1 (Figure 1c). No degradation of other root tissues, such as medullar parenchyma, vessels and fibres, was apparent in any of the genotypes. The genotypes with damaged parenchyma were also highly colonized by microorganisms that were principally located in the cortical parenchyma. Differences in colonization between genotypes were clearly apparent. Many bacteria, fungal spores and fungal hyphae were seen on F2 (Figures 1a and 1b) and on F2bm1 (Figures 1c and

1d) roots whereas only a few fungal spores were observed on F292 (Figures 1e and 1f), F292bm3 (Figures 1g and 1h), Colombus (Figures 1k and 1l) and Mexxal (Figures 1i and 1j).



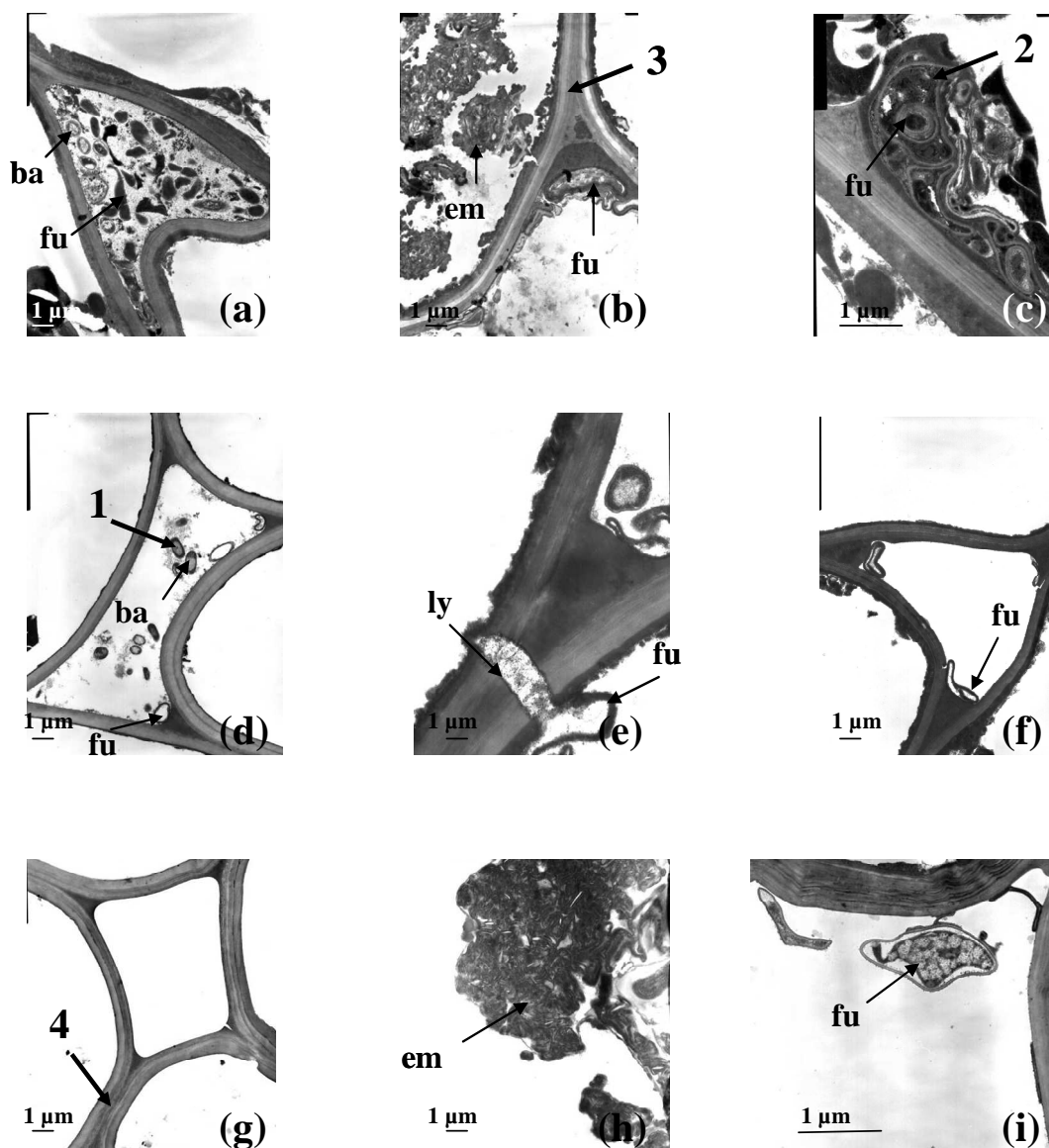
**Figure 1:** Longitudinal-sections of maize roots observed by SEM. (a) and (b) for F2; (c) and (d) for F2bm1; (e) and (f) for F292. ba: bacteria; cp: cortical parenchyma; fh: fungal hyphae; fs: fungal spore.



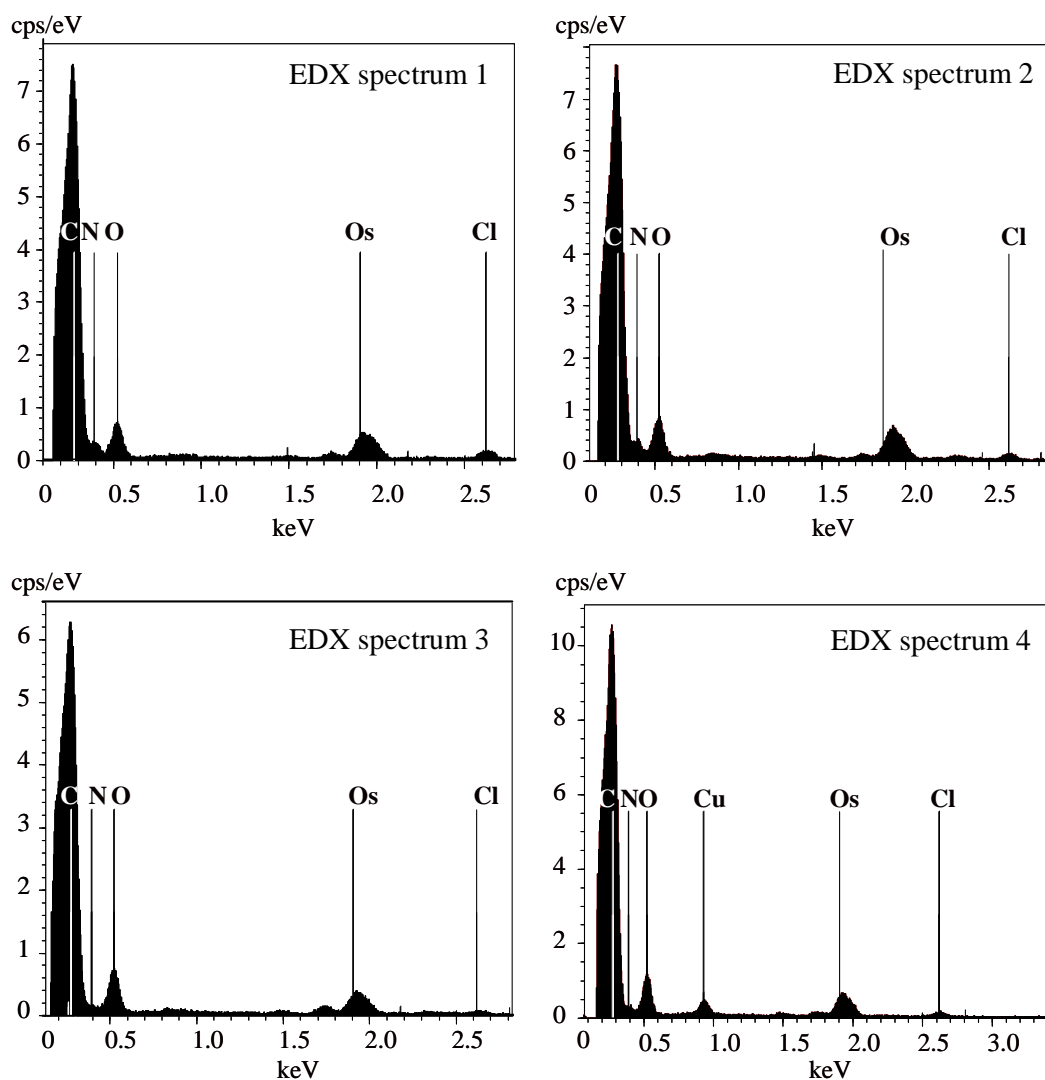
**Figure 1 suite:** Longitudinal-sections of maize roots observed by SEM. (g) and (h) for F292bm3, (i) and (j) for Mexxal, (k) and (l) for Columbus. cp: cortical parenchyma; fs: fungal spore.

The types of microorganism and their sub-cellular location could be more clearly distinguished at higher magnification and the heterogeneous colonization between genotypes was confirmed by TEM observations (Figure 2). The microorganisms were mostly localized in the intercellular spaces. Comparison of Figures 2a, 2d and 2g, representing the intercellular spaces of, F2bm1, F292bm3 and Columbus respectively, revealed that colonization of the

maize root genotypes by fungi and bacteria could be ranked as follows: F2bm1 > F292bm3 > Columbus. A large fungal microflora, consisting of live and dead fungi (as shown by their internal structure and their different opacity towards electrons) was observed in F2bm1 (Figures 2a, 2b and 2c). Residual endomycorrhizas were observed within the cortical parenchyma cells (Figure 2b) and bacteria with dense cytoplasm were more apparent in the intercellular spaces (Figure 2a). In contrast, bacteria were more often observed than fungi, with or without dense cytoplasm, in the F292bm3 genotype (Figure 2f).



**Figure 2:** TEM observations of transverse sections of cortical root cells. (a), (b), and (c) for F2bm1; (d), (e) and (f) for F292bm3; (g), (h) and (i) for Columbus. 1, 2, 3 and 4: locations of the EDX analyses corresponding to spectra 1, 2, 3 and 4. ba: bacteria; em: endomycorrhizas; fu: fungi; ly: cell wall lysis.



**Figure 2 suite:** Spectra 1, 2, 3, 4: EDX detection of N in bacteria, fungus, cell walls of F2bm1 and Columbus, respectively. Spectra also revealed the presence of Cu and Cl, as they were part of the grid and the resin respectively.

However, the walls of adjacent cells in the cortical parenchyma were sometimes perforated by fungal hyphae, as shown in Figure 2e. The Columbus genotype seemed to contain very few microorganisms (Figure 2g), and only residual endomycorrhizas (Figure 2i) and dead fungi were observed (Figures 2i).

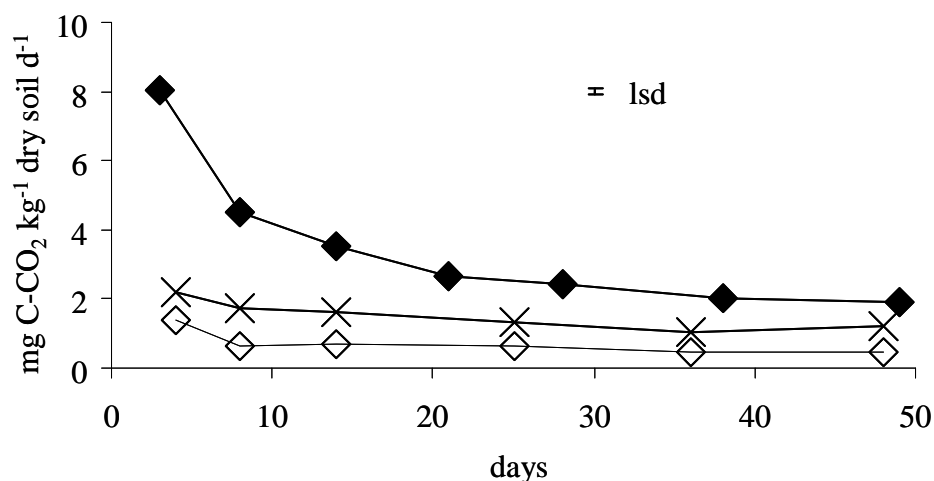
Roots from the F2bm1 and Columbus genotypes, representing the highest and one of the lowest N contents, respectively (Table 1) were used for *in situ* measurement of the amounts of N in the colonizing microorganisms and root cell walls, using EDX analyses coupled with TEM observations (Figure 2). Large amounts of N were detected within the micro-organisms, i.e. bacteria (Figure 2, EDX spectrum 1) and fungi (Figure 2 EDX spectrum 2), whereas lower



N contents were detected in the cell walls (see Figure 2 EDX spectrum 3 for F2bm1 and Figure 2 EDX spectrum 4 for Columbus).

### 3.3. Dynamics of Carbon mineralization

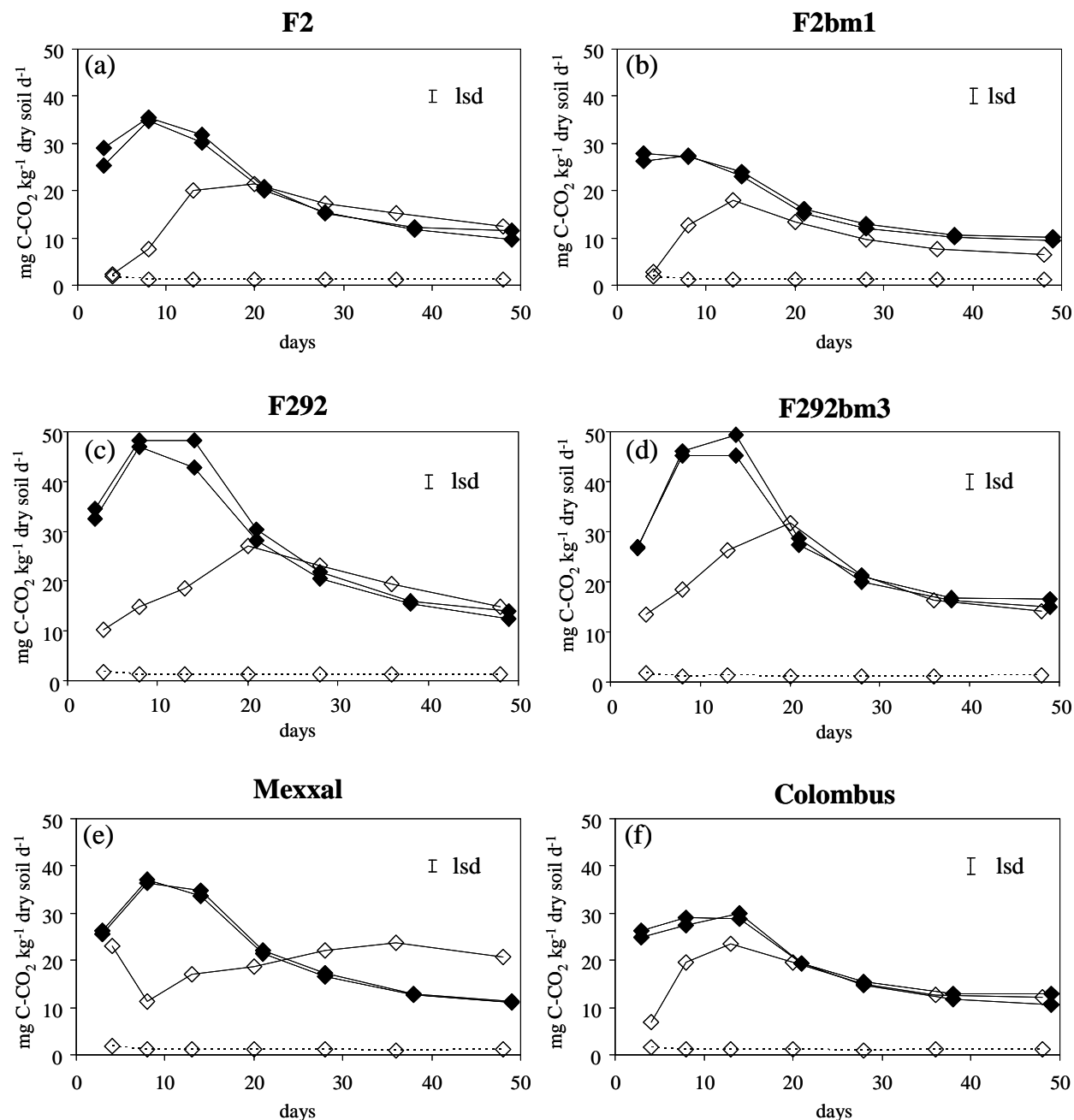
The rate of carbon mineralization in soils without root residues was maximal at the beginning of incubation in the SS, NSS and SS-Glu treatments and then decreased until the end of incubation (Figure 3). C mineralization rates at day 4 could be ranked as follows: SS < SS-Glu < NSS and all differences between these treatments were significant ( $P \leq 0.05$ ). Over the 36-48 day interval, the C mineralization rate was significantly lower in SS ( $0.47 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) than in the SS-Glu ( $1.24 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) and NSS ( $1.88 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) treatments ( $P \leq 0.05$ ).



**Figure 3:** Carbon mineralization rates measured in non-sterilized (NSS, ◆) and in sterilized (SS, ◇) control soils, in sterilized soil + glucose (SS-Glu, ×). Data are the means of 3 replicates.

The C mineralization rates for SS-R, SS-SR, NSS-R, NSS-SR are presented in Figure 4. C mineralization rates in SS-SR were  $< 2 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  for all genotypes over the entire incubation period (Figures 4a-f). C mineralization rates increased in the SS-R treatment and from day 20 were similar to those measured in the NSS-SR and NSS-R treatments (Figure 4a-f). This was the case for all genotypes except Mexxal for which the C mineralization rate was higher in SS-R than in the NSS-R and NSS-SR treatments (Figure 4e).

A maximum rate in non-sterilized soil (NSS-R, NSS-SR) was attained at day 8 for F2 (Figure 4a), F292 (Figure 4c) and Mexxal (Figure 4e), and at day 14 for F292bm3 (Figure 4d) and Columbus (Figure 4f) whereas the rates for F2bm1 were much slower from the beginning (Figure 4b). No significant differences between the rates of C mineralization were observed when maize roots, sterilized (SR) or not (R), were added to non-sterilized soil (NSS).



**Figure 4:** Carbon mineralization rates measured in non-sterilized soil (NSS, ◆), or in sterilized soil (SS, ◇) mixed with non-sterilized residues (R, —) or sterilized residues (SR, ---). Data are means of 3 replicates.

The total amounts of mineralized C were compared between all genotypes for the SS-R and NSS-R treatments (Table 2). The NSS-R treatments mineralized up to 40.6% of the added C and the genotypes ranked as follows: F2bm1 < Columbus < Mexxal = F2 < F292bm3 < F292. The total amounts of C mineralized in the sterilized soil treatment (SS-R), reached 31.1% and were significantly lower in F2bm1 than in the other genotypes ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 2:** Cumulative C mineralization of non-sterilized roots added to non-sterilized soil (NSS-R) or sterilized soil (SS-R). Data are expressed as percent of the added C at day 49 of incubation. Data are means of 3 incubation replicates ( $n=3$ ). Means not sharing a common letter within a row are statistically different ( $P \leq 0.05$ ).

	F2	F2bm1	F292	F292bm3	Mexxal	Columbus	LSD
NSS-R, %added C	27.0c	20.7a	40.6e	37.7d	28.4c	24.0b	2.70
SS-R, %added C	22.2b	14.3a	29.1c	30.7c	31.1c	23.3b	2.44

## 4. Discussion

### 4.1. Relationships between chemical characteristics of root residues and the presence of colonizing microorganisms

Our results suggest that the chemical characteristics of maize root residues are influenced by the microorganisms contained within them. The chemical qualities of F2bm1 root, that was strongly colonized, and F292bm3, one of the least colonized maize root genotypes, were distinctly different. The proportion of cell wall was lower in F2bm1 than in F292bm3 - suggesting that microorganisms had been responsible for some cell wall degradation. This assumption was in agreement with the lower proportion of cell wall polysaccharides in roots of F2bm1 and, to a lesser extent, of the F2 genotypes. Accordingly, the relative proportion of lignin in the cell walls of F2bm1 and F2 was greater than in the other genotypes. Indeed, polysaccharides are the main cell wall components and the most rapidly degraded by microorganisms (Cheshire et al., 1973). The lower cell wall polysaccharide contents in strongly colonized maize roots could therefore be due to cell wall lyses caused by biodegrading microorganisms in the cortical parenchyma cells.

The lowest C mineralization rates were observed in F2bm1 roots which contained fewer cell wall polysaccharides and higher Klason lignin contents than the other genotypes (NSS-R treatments). In contrast, higher C mineralization rates were observed during decomposition of the less lignified F292 and F292bm3 roots. The intermediate rates obtained for Columbus and Mexxal were partially explained by their relatively high lignin contents compared with F292 and F292bm3. Therefore the differences in initial chemical composition agreed well with the observed rates of mineralization during decomposition in soil and supported the hypothesis that the cell wall polysaccharides had already been degraded by root-colonizing microorganisms to produce lignin-enriched residues.

*In situ* location of N at a subcellular level by EDX analyses and TEM revealed that the microorganisms (bacteria, fungi and endomycorrhizas), as compared to the cell walls, were N-enriched i.e., the higher the root N content, the higher the degree of colonization by microorganisms. Roots of the F2bm1 genotype exhibited the highest N content and the most abundant colonization (Figures 1 and 2). This suggests that microorganisms colonizing roots during the life of the plant could have a quantitative impact on the total N content of root residues, prior to their decomposition in soil and after plant death. Assuming that the difference in N content between F2bm1 (the most colonized) and Columbus (the least colonized) was due to microbial N, and that the colonizing biomass had a C to N ratio of 10, we estimated that, in F2bm1, 37% of N and 11% of C would be derived from colonizing microorganisms rather than from the plant roots. When these amounts of microbial N and C were subtracted, the corrected C to N ratio for F2bm1 roots increased to 50. The C to N ratio is very sensitive to variations in residue N content, and can be a fairly good indicator of crop residue mineralization in soils (e.g. Trinsoutrot et al., 2000). However this is only true if the residue N content is an indirect consequence of plant type or plant maturity, or when N availability limits the activity of decomposers (Henriksen and Breland, 1999). The present study suggests that root N content may not only depend on N nutrition of the plant during growth, but also on the presence of microorganisms in the roots before soil decomposition. The fact that the root N contents (and C:N ratios) of the six genotypes studied did not explain the observed ranking for C mineralization is therefore understandable, as the N content reflected the fact that some roots had already been partly degraded by colonizing microorganisms and were not associated with the intrinsic plant chemistry. The presence in the root tissues of microbial- or microbial-derived N that would mineralize differently from plant-derived N, might explain the difficulties encountered when standard parameters

obtained from aerial plant parts are used to model mineralization in roots (e.g. Abiven et al., 2005).

#### *4.2. Impact of colonizing microorganisms on subsequent root decomposition in soil*

The impact of colonizing microorganisms on maize root decomposition in soil was quantified by sterilizing the soil and/or residues by gamma irradiation. The effect of the sterilizing method (autoclaving, chemical fumigation, cobalt-60 irradiation) on soil physical, chemical and biological properties has been dealt in numerous studies (Wolf et al., 1989; Trevors, 1996). Gamma irradiation is generally assumed to have the least damaging effect on soil properties (Trevors, 1996). Gamma irradiation primarily induces mutagenic and/or lethal effects in soil organisms by causing direct ionizing damage to the cell DNA. Gamma irradiation also has an indirect effect through the radiolysis of cell water and the formation of active oxygen species, free radicals and peroxides leading to single and double strand DNA breaks (Jackson et al., 1967). A sub-sterilizing dose of gamma irradiation of 10 kGy typically eliminates fungi, actinomycetes and invertebrates, most bacteria are eliminated by 25 kGy (Jackson et al., 1967) but certain radioresistant bacteria can survive > 50 kGy (Coleman and MacFayden, 1966). The dose used in the present study (45 kGy) was considerably above that observed in normal soil environments. Although gamma irradiation is generally considered to inactivate soil microorganisms, some enzymatic activities (denitrifying potential, potential production of CO<sub>2</sub> and  $\beta$ -glucosidase, as an example of extra-cellular activity) have been shown to persist (Lensi et al., 1991). This is why the C mineralization rates measured in glucose-amended sterilized soil (SS-Glu treatment) were higher than those of sterilized soil alone (SS). However, this hydrolytic activity could not be maintained due to the absence, in sterilized soil, of microorganisms to produce enzymes. Therefore the C mineralization rates measured in sterilized soil mixed with glucose always decreased from the beginning of incubation onwards.

C mineralization rates in sterilized soil were higher when non-sterilized, rather than sterilized, root residues were added. This indicates that the microorganisms within the non-sterilized root residues, whatever the genotype, were active and able to mineralize organic carbon, in agreement with electron microscope observations. However, the amount of mineralized C was always less than in non-sterilized soil, indicating that the soil microbial communities developing on decaying roots were more efficient in decomposing root residues than the initial root-colonizing microorganisms. This might be because an adequate

succession of microbial communities, as observed during the decomposition of plant residues in soil, was absent (e.g. Liebich et al., 2007). The large decrease and similarity of the C mineralization rates observed after 3 weeks in non-sterilized residues mixed with either sterilized or non-sterilized soil, showed that after initial colonization, the decomposition process was limited by the chemical characteristics of the maize roots rather than by the origin of the decomposers. Plant residue degradability is generally considered to decrease during the course of decomposition (Minderman, 1968). The decomposing material consists of an increasing proportion of recalcitrant components originating from the residue or from degradation products of microbial origin or otherwise. The decomposition patterns were fairly soon driven by the intrinsic chemical characteristics of the maize roots, i.e., from day 20 of incubation, and the total amount of mineralized C measured when non-sterilized residues were placed in sterilized or non-sterilized soil was inversely related to the amount of Klason lignin in the cell walls ( $R^2 = 0.72$ , data not shown).

The same patterns of C mineralization rates were observed in non-sterilized soil, whether mixed with sterilized or non-sterilized residues, throughout the incubation period, indicating that the microorganisms in the residue did not affect the activity of soil microorganisms. Tester, in contrast, (1988) had reported that the extent of decomposition in sterilized wheat straw mixed with non-sterilized soil was higher than in non-sterilized wheat straw mixed with non-sterilized soil, and suggested active competition between soil basidiomycetes and endogenous microorganisms in the wheat straw. In our study, the decomposition of maize roots was controlled, from the beginning of incubation, by soil microorganisms and any active competition with root microorganisms would have been apparent from the C kinetics.

### **Acknowledgements**

This study was financially supported by the Champagne-Ardenne region and INRA. The authors wish to thank G. Alavoine, D. Crônier, M.J. Herre and S. Millon for their technical assistance, and Y. Barrière for providing the plant material.

---

**References**

- Abiven, S., Recous, S., Reyes, V., Oliver, R., 2005. Mineralization of C and N from root, stem and leaf-residues in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of Soils* 42, 119-128.
- Beaugrand, J., Crônier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P., Chabbert, B., 2004. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7108-7117.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil* 281, 291-307.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291-299.
- Boudet, M.A., Lapierre, C., Grima-Pettenati, J., 1995. Tansley Review No. 80 Biochemistry and molecular biology of lignification. *The New Phytologist* 129, 203-236.
- Brett, C.T., Waldron, K.W., 1996. In: Black, M., Charlwood, B. (Eds.), *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Chapman & Hall, London, pp. 255.
- Carrera, A.L., Bertiller, M.B., Larreguy, C., 2008. Leaf litterfall, fine-root production, and decomposition in shrublands with different canopy structure induced by grazing in the Patagonian Monte, Argentina. *Plant Soil* 311, 39-50.
- Chaussod, R., Nicolardot, B., Catroux, G., 1986. Mesure en routine de la biomasse des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol* 2, 201-211.
- Cheshire, M.V., Mundie, C.M., Shepard, H., 1973. The origin of soil polysaccharide transformation of sugars during the decomposition in soil of plant material labelled with <sup>14</sup>C. *Journal of Soil Science* 24, 54-68.
- Clarke, J.H., Hill, S.T., 1981. Mycofloras of moist barley during sealed storage in farm and laboratory silos. *Transactions of the British Mycological Society* 77, 557-565.
- Coleman, D.C., MacFayden, A., 1966. The recolonization of gamma-irradiated soils by small arthropods. *Oikos* 17, 62-70.
- Cook, R.J., Boosalis, M.G., Doupnik, B., 1978. Influence of crop residues on plant diseases. In: Oschwald, W.R. (Ed.), *Crop residue Management Systems*, American Society Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 147-163.

- De Ascensao, A.R.F.D.C., Dubery, I.A., 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63, 679-686.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analysis. US Government Printing Office, Washington, DC Agriculture Handbook No. 379, USDA-ARS.
- Henriksen, T.M., Breland, T.A., 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1121-1134.
- Jackson, N.E., Corey, J.C., Frederick, L.R., Picken, J.C., 1967. Gamma irradiation and the microbial populations of soils at two water contents. *Soil Science Society of America Proceedings* 31, 491-494.
- Kamphake, L.J., Hannah, S.A., Cohen, J.M., 1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research* 1, 205-216.
- Karroum, M., Guillet, B., Laggoun-Defarge, F., Disnar, JR., Lottier, N., Villemin, G., Toutain, F., 2005. Evolution morphologique des litières de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) et transformation des biopolymères lignine et polysaccharides lors de la genèse des mull et moder en forêt de Fougères (Bretagne, France). *Journal of Canadian Soil Science* 85, 405-416.
- Krom, M.D., 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst* 105, 305-316.
- Lensi, R., Lesure, C., Steinberg, C., Savoie, J.-M., Faurie, G., 1991. Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a  $\gamma$ -sterilized soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 367-373.
- Liebich, J., Schloter, M., Schäffer, A., Vereecken, H., Burauel, P., 2007. Degradation and humification of maize straw in soil microcosms inoculated with simple and complex microbial communities. *European Journal of Soil Science* 58, 141-151.
- Machinet, G.E., Bertrand I., Chabbert, B., Recous, S., submitted for publication. Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *European Journal of Soil Science*.
- Miller, M.E., 1983. Relationships between onion leaf age and susceptibility to *Alternaria porri*. *Plant Disease* 67, 284-286.
- Minderman, G., 1968. Addition, decomposition and accumulation of organic matter in forests. *Journal of Ecology* 56, 355-362.



- Monties, B., 1984. Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: Influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie* 4, 387-392.
- Parr, J.F., Papendick, R.I., 1978. Factors affecting the decomposition of crop residues by microorganisms. In: Oschwald, W.R. (Ed.), *Crop residue Management Systems*, American Society Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 101-129.
- Puget, P., Drinkwater, L.E., 2001. Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous manure. *Soil Science Society of America Journal* 65, 771-779.
- Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.-F., 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Soil Biology and Biochemistry* 269, 341-356.
- Recous, S., Robin, D., Darwis, D. & Mary, B., 1995. Soil inorganic N availability: effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1529-1538.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Sauer, D.B., Storey, C.L., Ecker, O., Fulk, D.W., 1982. Fungi in U.S. export wheat and corn. *Phytopathology* 72, 1449-1452.
- Tester, C.F., 1988. Role of soil and residue microorganisms in determining the extent of residue decomposition in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 915-919.
- Trevors, J.T., 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26, 53-59.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Linères, M., Chèneby, D., Nicolardot, B., 2000. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64, 918-926.
- Valentine, R.C., 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Advances in Virus Research* 8, 287.
- Villemin, G., Mansot, J. L., Watteau, F., Ghanbaja, J., Toutain, F., 1995. Etude de la biodégradation et de l'humification de la matière organique végétale du sol par la spectroscopie des pertes d'énergie d'électrons transmis (EELS : Electron Energy Loss Specyctroscopy) : répartition du carbone, de l'azote et évaluation du rapport C/N au niveau ultrastructural in situ. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris IIa* 321, 861-868.
- Watteau, F., Villemin, G., Ghanbaja, J., Genet, P., Pargney J.C., 2002. In situ ageing of fine beech roots (*Fagus sylvatica*) assessed by transmission electron microscopy and electron energy loss spectroscopy: description of microsites and evolution of polyphenolic substances. *Biology of the Cell* 94, 55-63.

- Watteau, F., Villemin, G., Burtin, G., Jocteur-Monrozier L., 2006. Root impact on the stability and constitution of the fine organo-mineral associations in a maize cultivated soil. *European Journal of Soil Science* 57, 247-257.
- Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D., Lavy, T.L., 1989. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* 18, 39-44.



# CHAPITRE 3

## **Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality**

**G. E. MACHINET<sup>a</sup>, I. BERTRAND<sup>a</sup>, B. CHABBERT<sup>b</sup> & S. RECOUS<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*INRA, UR1158 Unité d'Agronomie Laon-Reims-Mons, 2 esplanade Roland Garros, F-51686 Reims, France, and* <sup>b</sup>*INRA-URCA, UMR 614 Fractionnement des AgroRessources et Emballage, 2 esplanade Roland Garros, F-51686 Reims, France*



---

## Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality

### Summary

Roots of brown-midrib (F2bm1 and F292bm3) maize mutants and their normal isogenic counterparts (F2 and F292) were used to evaluate the changes in chemical cell wall features regarding polysaccharides, lignin composition and interconnecting phenolic acids during root degradation in soil. To this end, the chemical variability of roots of brown-midrib mutants and their normal counterparts were compared and its subsequent impact on carbon (C) mineralization determined under controlled conditions. The bm1 mutation mainly caused an increase in lignin content and a decrease in polysaccharide content of maize roots whereas the bm3 mutation solely caused a decrease in polysaccharide content. The lignin composition of bm roots differed from that of normal lines and the proportion of cell wall ester-linked hydroxycinnamic acids was also different. C mineralization kinetics differed markedly between the genotypes. Certain relevant factors concerning root decomposition in soil were studied from the relationships between the chemical characteristics of maize roots at different stages of decomposition and C mineralization rates. The Klason lignin to glucose ratio (KL/Glu), the Klason lignin to arabinoxylans ratio (KL/AX) and the arabinose to xylose ratio (A/X) were proposed as promising predictive indicators of C mineralization kinetics. Future estimations of soil residue decomposition could be improved by taking these initial chemical criteria into account on a wider range of residues.

### Résumé

Les racines des maïs mutants brown-midrib (F2bm1 et F292bm3) et celles de leurs lignées isogéniques normales (F2 et F292) ont été utilisées pour évaluer les modifications des caractéristiques chimiques des parois cellulaires, à travers la composition des polysaccharides, de la lignine et la nature des acides phénoliques, au cours de la dégradation des racines dans le sol. Pour cela, nous avons examiné, en conditions contrôlées, l'impact d'une variabilité de la qualité chimique des racines, en comparant les mutants bm et leurs lignées isogéniques normales, sur la minéralisation du C. La mutation bm1 engendre principalement une augmentation de la teneur en lignine et une diminution de la teneur en polysaccharides dans

les racines de maïs alors que la mutation bm3 cause uniquement une diminution de la teneur en polysaccharides. Dans les racines des mutants bm, la composition de la lignine ainsi que les proportions en acides hydroxycinnamiques estérifiés des parois cellulaires diffèrent de celles des lignées non mutantes. Les cinétiques de minéralisation du C varient fortement entre les génotypes. Les relations entre les caractéristiques chimiques des racines de maïs à différents stades de décomposition et les taux de minéralisation du C ont permis d'étudier certains facteurs pertinents concernant la décomposition des racines dans le sol. Les rapports lignine Klason sur glucose (KL/Glu), lignine Klason sur arabinoxylanes (KL/AX) et arabinose sur xylose (A/X) ont été identifiés comme étant de bons indicateurs de prédiction des cinétiques de minéralisation du C. La prise en compte de ces critères de qualité chimique initiale sur une plus large gamme de résidus pourrait améliorer l'estimation de la décomposition des résidus dans le sol.

## 1. Introduction

Crop residues are composed of a soluble fraction and an insoluble fraction corresponding essentially to the cell walls. The cell wall composition of crop residues and the quality of their constitutive polymers have a great effect on their decomposition in soil and on the associated C and N fluxes (Bertrand *et al.*, 2006). The principal cell wall polymers are polysaccharides (such as cellulose and hemicelluloses) and lignin. In Gramineae, arabinoxylans represent the main type of hemicelluloses and consist of a backbone of  $\beta$ 1,4-linked xylose units mainly substituted by  $\alpha$ -linked arabinose. Hydroxycinnamic acids, namely ferulic acid (FA) and *p*-coumaric acid (PCA), are typically encountered in grass cell walls where they are linked through covalent linkages (Kato & Nevis, 1985). FA is ester-linked to the O-5 position of the arabinose side chain of arabinoxylans, whereas PCA mostly esterifies the syringyl moieties of lignin. Ferulic acid thus plays a key role in cross-linking arabinoxylans to lignin (Ralph *et al.*, 1993). The chemical composition of cell wall polymers, as well as their interactions, influences the accessibility of these components to decomposers (Chesson, 1988). The fate of cell wall polymers, during the decomposition process, depends on their interactions within the cell walls. For this reason, a more thorough investigation of cell wall polymer quality should improve our understanding and quantification of the decomposition process.

In previous studies to determine the role of chemical quality of residues on their decomposition in soils, different types of crop residues (species, plant parts) were used. The

chemical variations and differences in residue anatomy were found to be important factors influencing the decomposition process (Akin, 1989). Indeed, plant parts contain different types of tissues and cell wall quality can depend on the nature of these.

To our knowledge, few results have been published concerning the effect of cell wall polymer quality on root decomposition in soil (Herman *et al.*, 1977). Roots have now become the focus of particular interest, firstly because they often remain in the soil after harvest, and secondly because they may make a greater contribution to building up soil organic matter than aerial plant parts (Puget & Drinkwater, 2001; Rasse *et al.*, 2005). In the present study, we focused on roots of two natural maize mutants named brown-midrib (bm). This plant material was selected because i) it has a particularly high cell wall content compared with above-ground parts, ii) it does not suffer from structural and chemical variations related to residue anatomy because the same tissue types are present and iii) the effects of the bm mutations in above-ground parts with respect to forage digestibility have been well reported (Barrière *et al.*, 2004), whereas no studies have as yet been performed on under-ground parts. The above-ground parts of bm1 and bm3 mutants are mainly recognized from their reduced lignin and phenolic acid contents compared with the normal lines (Barrière & Argillier, 1993). In contrast, little is known about the effects of bm mutations on root quality and their decomposition in soil. White *et al.* (2007) showed that total residue C mineralization in sorghum after 194 days of decomposition did not differ between bm mutants and normal lines. However, Hopkins *et al.* (2001) studied the mineralization of tobacco stems with genetic modifications for lignin biosynthesis and found that transgenic plants mineralized more rapidly than the wild-type plants.

The aims of our study were therefore to assess the role of the chemical quality of cell wall polymers and their interactions on root decomposition in soils in order to determine new quality criteria. Identification of these criteria was based on the relationships between the chemical characteristics of maize roots and C mineralization rates determined under controlled conditions.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Soil and maize roots*

Soil was collected from a depth of 5 to 30 cm at the INRA Mons-en-Chaussée experimental station. The soil had a silty loam texture (17.8% clay, 77.3% silt, 3.8% sand),



contained 0.95% organic C, and had a pH (H<sub>2</sub>O) of 7.6. The soil was air-dried for two days to a moisture content of 120 mg g<sup>-1</sup> dry soil, and then immediately sieved to 2 mm. All visible organic residues were removed by hand after sieving. The soil was stored at 15°C for a week prior to incubation.

Two sets of maize (*Zea mays* L.) brown-midrib isogenic lines, within the genetic background of inbreds F2 (F2 and F2bm1) and F292 (F292 and F292bm3) were studied. All genotypes were cultivated in experimental fields at the INRA Lusignan experimental station and were harvested at physiological maturity. Only the roots were kept for experiments. These roots were washed with a 50 g l<sup>-1</sup> sodium metaphosphate solution for 24 h, rinsed with deionised water to remove soil particles, and then dried for one week at 30°C. Roots with a diameter of 2 to 3 mm were selected for the study.

## 2.2. Incubation experiment

Soil samples and maize roots (about 5 mm long) were mixed at a rate equivalent to 2 g C kg<sup>-1</sup> dry soil and incubated for 112 days at 15°C. Potassium nitrate (61 mg N kg<sup>-1</sup>) was added to the soil, which contained 9 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup> (no ammonium was detected), to ensure that decomposition would not be limited by N (Recous *et al.*, 1995). The concentration of the added N solution was calculated such that the soil moisture was maintained at a potential of -80 kPa, corresponding to a water content of 190 g kg<sup>-1</sup>. Soil moisture was maintained throughout the incubation period by weighing at weekly intervals and readjusting with deionised water when necessary. A control incubation experiment was performed in the same way but without the addition of residues.

Carbon mineralization was measured in soil samples (equivalent to 100 g dry soil) incubated in 500 ml glass jars (four replicates per treatment) in the presence of a CO<sub>2</sub> trap (10 ml 1 M NaOH). Mineral N was determined on separate soil samples equivalent to 30 g dry soil (three replicates per treatment) placed in 2 l glass jars containing 30 ml of 1 M NaOH as a CO<sub>2</sub> trap to ensure the same conditions as for the C mineralization measurements. Mineral N was extracted at 0, 14, 36, 57 and 112 days by adding 100 ml of a 1 M KCl solution to the soil. Carbon mineralization was measured at days 3, 7, 10, 14, 21, 29, 36, 42, 51, 57, 70, 80, 87, 95 and 112 after the beginning of incubation.

The chemical quality of the decomposing roots was determined after 14, 36, 57, and 112 days of incubation. At each date and for each genotype, ca 5 g of root dry matter were removed manually from the soil, washed with deionised water and then with a sodium

metaphosphate solution as described earlier, and dried for one week at 30°C prior to chemical analyses.

The concentrations of CO<sub>2</sub> trapped in the NaOH solutions were measured by continuous flow colorimetry (Chaussod *et al.*, 1986) using an auto-analyzer (TRAACS 2000, Bran & Luebbe). Mineral N in the soil and residue extracts was analyzed by continuous flow colorimetry (TRAACS 2000, Bran & Luebbe). Concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> were determined using an adaptation of the method proposed by Kamphake *et al.* (1967). Ammonium ions were determined following the method described by Krom (1980).

### 2.3. Chemical analysis of maize roots

The chemical characteristics of non-decomposed and decomposed roots were determined on two replicates of each sample. The total C and N contents of non-decomposed and decomposed roots were measured by elemental analysis (NA 1500, Fisons Instruments).

Root residues were subjected to a cell wall preparation process which consisted of the extraction of neutral detergent fiber (NDF) according to the method described by Goering & Van Soest (1970). Briefly, the soluble fraction was removed by boiling 1.5 g of roots (ca 5 mm long / 2 mm diameter) in deionised water at 100°C for 30 min and then extracting with a neutral detergent solution at 100°C for 60 min to remove cytoplasmic components and obtain the NDF fraction. This fraction was designated the cell wall residue. All residues from cell wall preparations were dried for one week at 30°C and ground to 80 µm.

The neutral sugar content of cell wall residues was determined according to the method described by Blakeney *et al.* (1983). Ten mg of sample were swollen in 125 µl 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 20°C followed by acid hydrolysis with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100°C. Monosaccharides released by the acid were separated by high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) on a CarboPac PA-1 column (4X250 mm, Dionex) as described by Beaugrand *et al.* (2004). The composition of monosaccharides was analyzed and quantified using 2-deoxy-D-ribose as internal standard and standard solutions of neutral carbohydrates (L-arabinose, D-glucose, D-xylose, D-galactose, D-rhamnose, D-mannose and L-fucose).

Klason lignin (KL) was determined as the acid-insoluble residue remaining after sulphuric acid hydrolysis of cell wall polysaccharides (Monties, 1984). Briefly, 200 mg of cell wall residues were suspended in 2 ml 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at room temperature. Suspensions were then diluted to 1 M with deionised water, heated at 100°C for 3 h and filtered. The remaining residues were dried at 105°C and ash measurements performed at 550°C for 4 h.

The lignin monomer composition was determined by thioacidolysis. This reaction enables the specific disruption of labile-ether inter-monomer linkages, which represent the non-condensed lignin fraction. Ten mg of cell walls were heated in 10 ml dioxane:ethanethiol (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate for 4 h at 100°C (Lapierre *et al.*, 1986). Monomer products were analyzed as trimethylsilyl derivatives of guaiacyl and syringyl by capillary column gas chromatography using a J&W DB-1 column (30 m long, 0.3 mm i.d.; 0.25 µm film thickness) and a temperature gradient of 160-280°C at 2°C min<sup>-1</sup>. The carrier gas was helium at 60 kPa, and detection was by flame ionization. The internal standard was tetracosane.

Ester-linked hydroxycinnamic acids (ferulic acid (FA) and *p*-coumaric acid (PCA)) were released by incubating 10 mg cell wall residue with 2 M NaOH (10 ml) for 2 h at 35 °C with constant stirring under a nitrogen atmosphere. After cooling for 10 min, the reaction was stopped by adjusting the pH to 1 with 6 M HCl, prior to the addition of 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamic acid as an internal standard. Hydroxycinnamic acids were then extracted three times with diethyl oxide (30 ml). The organic fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure. The dried extract was dissolved in 1.5 ml methanol:water (1:1, v/v) and filtered (0.45 µm) prior to injection on to a Spherisorb S50DS2 (Waters, RP-18, 250x2.6 mm) column. Hydroxycinnamic acids in the eluates were detected using a Waters photodiode array UV detector (Beaugrand *et al.*, 2004).

#### 2.4. Data treatment and analysis

Carbon mineralization was calculated as the difference in the CO<sub>2</sub> released after each treatment between the amended residue and control soils, and was expressed as a percentage of the added residue C.

Chemical features related to cell wall residues were expressed in relation to the initial residue dry matter and were corrected by the extraction yield of the cell wall preparation step, i.e., the amount of material lost during NDF extraction. The chemical data for the decomposed roots were expressed as previously described, i.e., by taking into account (1) the material lost during NDF extraction and (2) the loss of mass residue by decomposition which was calculated from the cumulative amounts of mineralized C. In this way, the data obtained from NDF-extracted/soil-decomposed material were directly comparable to those from non-decomposed residues.

Differences in values between genotypes were evaluated by the least significant difference (LSD,  $P \leq 0.05$ ) derived from the analysis of variance (ANOVA) (Genstat 8.1).

### 3. Results

#### 3.1. Chemical characteristics of non-decomposed roots

The cell wall contents of maize roots were particularly high as the NDS soluble fraction accounted for less than 20% dry matter, whatever the genotype (Table 1). The cell wall content rose as follows: F2bm1 < F292 = F2 < F292bm3.

The major constituents of the root cell walls were neutral sugars (Table 1). The total amount of neutral sugars was determined from the sum of glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose, mannose, and fucose. Before soil decomposition, the neutral sugars content differed significantly between genotypes and was ranked as follows: F292 > F292bm3 > F2 > F2bm1 (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). The three main cell wall monosaccharides were glucose, xylose and arabinose. The arabinose levels were low (<3% of dry matter) compared with those of xylose and glucose in all genotypes. The relative proportions of these monosaccharides were similar in all genotypes. Glucose in the cell wall can be attributed to the cellulose fraction whereas the sum of arabinose and xylose gives a relatively good assessment of the hemicellulose fraction (arabinoxylans) (Brett & Waldron, 1996). The main cell wall polymer was cellulose which was present at significantly lower levels in F2bm1 (28.5% of dry matter) than in F2 (30.0%), F292bm3 (31.8%) and F292 (33.0%) (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). Hemicellulose was the second major polymer in root cell walls and the levels were significantly lower in F2bm1 (18.2% of dry matter) than in F2 (19.0%), F292 (20.8%) and F292bm3 (20.9%) (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). The arabinose to xylose ratio (A/X) was equal in all four genotypes before soil decomposition, indicating a similar level of xylan substitution by arabinose.

The amount of Klason lignin (KL) accounted for less than 20% of root dry matter in all genotypes and its levels were significantly lower in the F292 and F292bm3 genotypes than in F2 and F2bm1 (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ). In F2bm1, the amount of KL exceeded that of the hemicellulose fraction (19.2% and 18.2% of dry matter, respectively). The lignin proportion in non-condensed structures, determined by the  $\beta$ -O-4 ether-linked syringyl (S) and guaiacyl (G) unit contents, varied considerably between genotypes: roots of bm mutants contained significantly less non-condensed lignin than their isogenic lines (F2 and F292) (Table 1)

( $P \leq 0.05$ ). In addition, the relative proportion of S units was smaller than that of G units in F292bm3, leading to an S to G ratio  $< 1$  which was only found in this genotype. Ester-linked PCA were more abundant than ester-linked FA and found at significantly higher levels in F2 and F292 than in F2bm1 and F292bm3 (Table 1) ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 1:** Total C, N and biochemical characteristics of maize root residues before soil decomposition (ND). The total amount of neutral sugars was represented by the sum of glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose, mannose, and fucose measured in non-decomposed cell wall residues (NDF-ND) and expressed as % of non-decomposed dry matter (%DM-ND). Means not sharing a common letter within individual genotypes differ in terms of their response to chemical characteristics ( $P \leq 0.05$ ).

	F2	F2bm1	F292	F292bm3	LSD
Total C /% dry matter	47.8c	48.0c	46.6b	45.3a	0.40
Total N /% dry matter	1.1c	1.4d	0.8a	0.9b	0.06
C to N ratio	44b	34a	61d	53c	4.68
<i>Cell wall fraction</i>					
Cell wall /% dry matter	83.9b	80.6c	83.6b	86.0a	1.16
<i>Polysaccharides composition</i>					
Total neutral sugars /% dry matter	50.2b	48.2a	55.0d	53.9c	1.08
Glucose /% dry matter	30.0b	28.5a	33.0d	31.8c	0.96
Xylose /% dry matter	16.7b	15.9a	18.3c	18.4c	0.55
Arabinose /% dry matter	2.3a	2.3a	2.5c	2.5b	0.05
Arabinose to Xylose ratio	0.14a	0.14a	0.14a	0.13a	0.01
<i>Lignin fraction</i>					
Klason Lignin /% dry matter	17.6b	19.2c	15.6a	15.8a	0.37
Uncondensed lignin /% Klason lignin	17.8d	8.2a	15.5c	9.5b	1.03
S to G molar ratio	1.64d	1.30b	1.45c	0.66a	0.11
<i>Esterified phenolic acids</i>					
PCA / $\mu\text{mol g}^{-1}$ cell wall	162c	100a	165d	116b	1.48
FA / $\mu\text{mol g}^{-1}$ cell wall	37c	31a	36c	35b	0.69

### 3.2. Carbon and nitrogen dynamics

The cumulative amounts of mineralized C varied markedly between genotypes (Table 2). At the end of incubation (112 days), the total amounts of mineralized C were significantly smaller in F2bm1 (27.5% of added C) than in F2 (37.2%) and those in F2 were significantly smaller than in F292 (45.8%) and F292bm3 (46.0%) ( $P \leq 0.05$ ).

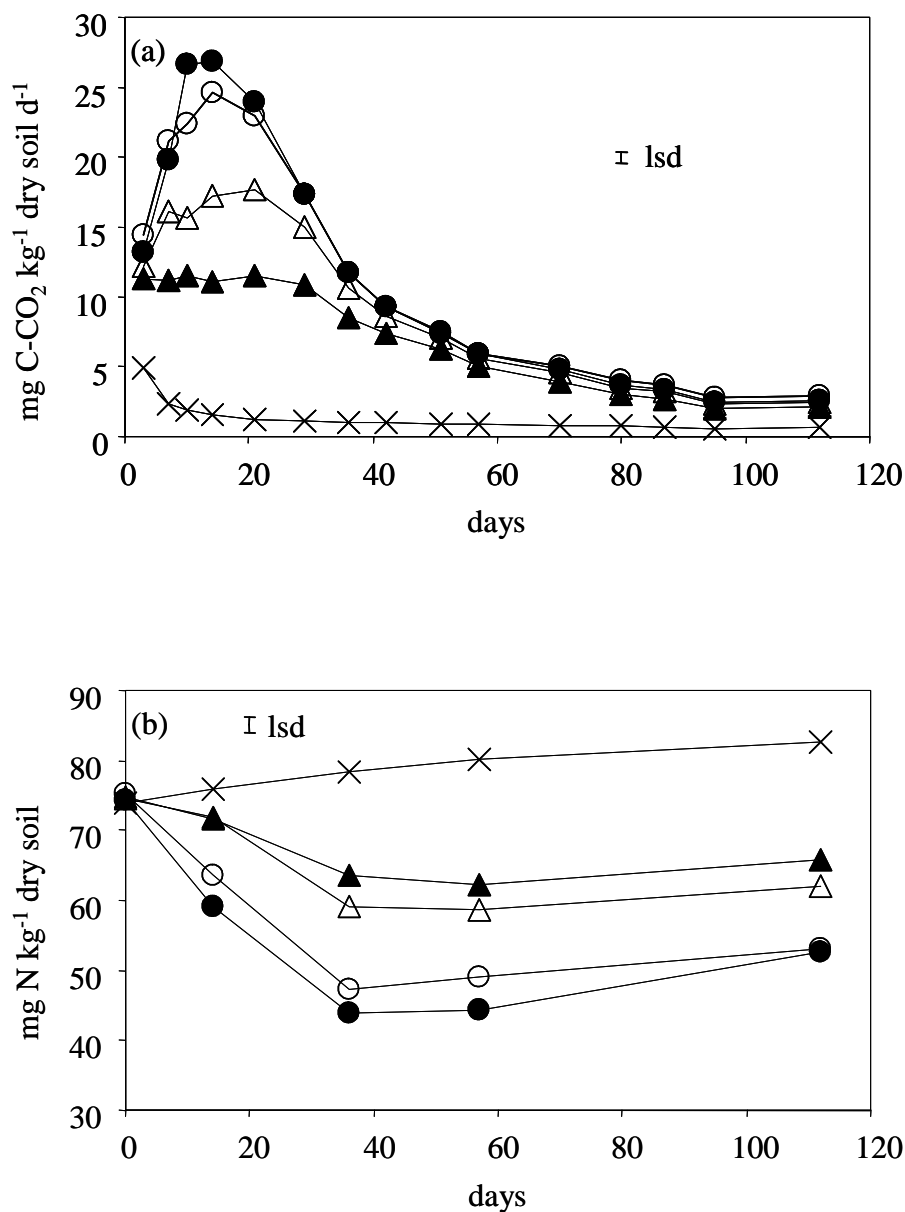
**Table 2:** Cumulative C mineralization and changes in cell wall, lignin quality and esterified phenolic acids as determined on roots decomposed for 112 days. Means not sharing a common letter within individual genotypes differ in terms of their response to chemical characteristics ( $P \leq 0.05$ ).

	F2	F2bm1	F292	F292bm3	LSD
Cumulative mineralized C /% added C	37.2b	27.5a	45.8c	46.0c	1.12
Cell wall /% dry matter-ND	55.2c	63.5d	44.6b	41.9a	0.56
<i>Lignin quality</i>					
Uncondensed lignin /% KL-ND	11.8c	3.6a	8.0b	3.8a	0.60
S to G molar ratio	1.96d	1.34b	1.75c	0.56a	0.11
<i>Esterified phenolic acids</i>					
PCA / $\mu\text{mol g}^{-1}$ cell wall-ND	66.0d	43.0b	64.5c	34.9a	0.89
FA / $\mu\text{mol g}^{-1}$ cell wall-ND	9.7c	10.5d	7.9b	5.7a	0.37

The observed differences in cumulative mineralized C for the entire incubation period resulted mainly from differences in the rates of C mineralization over the first 40 days (Figure 1a). Carbon mineralization rates with F292 and F292bm3 reached a maximum and similar value at day 14 whereas the rates with F2 and F2bm1 were much slower from the beginning, and peaked at day 21 with F2 only. At the end of incubation (95-112 day interval), C mineralization rates were significantly smaller in F2bm1 than in the other genotypes ( $P \leq 0.05$ ).

The average soil mineral N concentration at the beginning of incubation (day 0), was 73.8 mg N  $\text{kg}^{-1}$  dry soil (Figure 1b). Positive and almost linear net mineralization was observed in the control soil, resulting in +8.8 mg N  $\text{kg}^{-1}$  dry soil after 112 days of incubation. During the first 36 days, F292 and F292bm3 exhibited a sharper decrease in soil mineral N (because of net immobilization) than F2 and F2bm1. The concentrations in soil mineral N

then increased slightly under all treatments but remained below those of the control soil until the end of the incubation period.



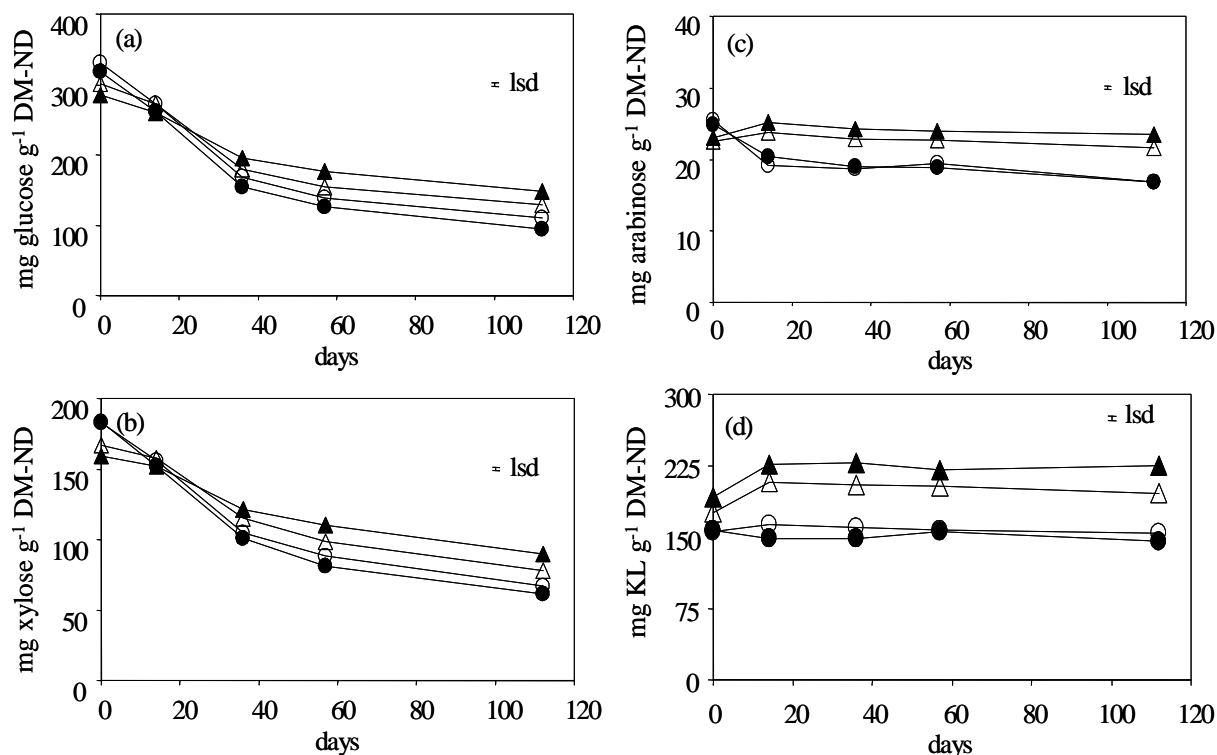
**Figure 1:** Carbon mineralization rates (a) and cumulative nitrogen mineralization kinetics (b) measured in soils without residues (×, control) and after the addition of roots: (△) F2, (▲) F2bm1, (○) F292 and (●) F292bm3. Data are means of 4 incubation replicates for C ( $n=4$ , Figure 1a) and 3 incubation replicates for N ( $n=3$ , Figure 1b).

### 3.3. Evolution of cell wall quality during decomposition

Root dry matter losses were calculated from the cumulative C mineralization values (expressed as a percentage of C added to soil) (Table 2), and represented the total amounts of C mineralized after 112 days. The F292 and F292bm3 genotypes lost more dry matter than F2 and F2bm1. Decomposition significantly affected the cell wall content of all genotypes after 112 days of incubation. A greater decrease was observed in F292 and F292bm3 (47% and 51% of the initial cell wall content, respectively) than in F2 (34%) and F2bm1 (21%) (Table 2) ( $P \leq 0.05$ ).

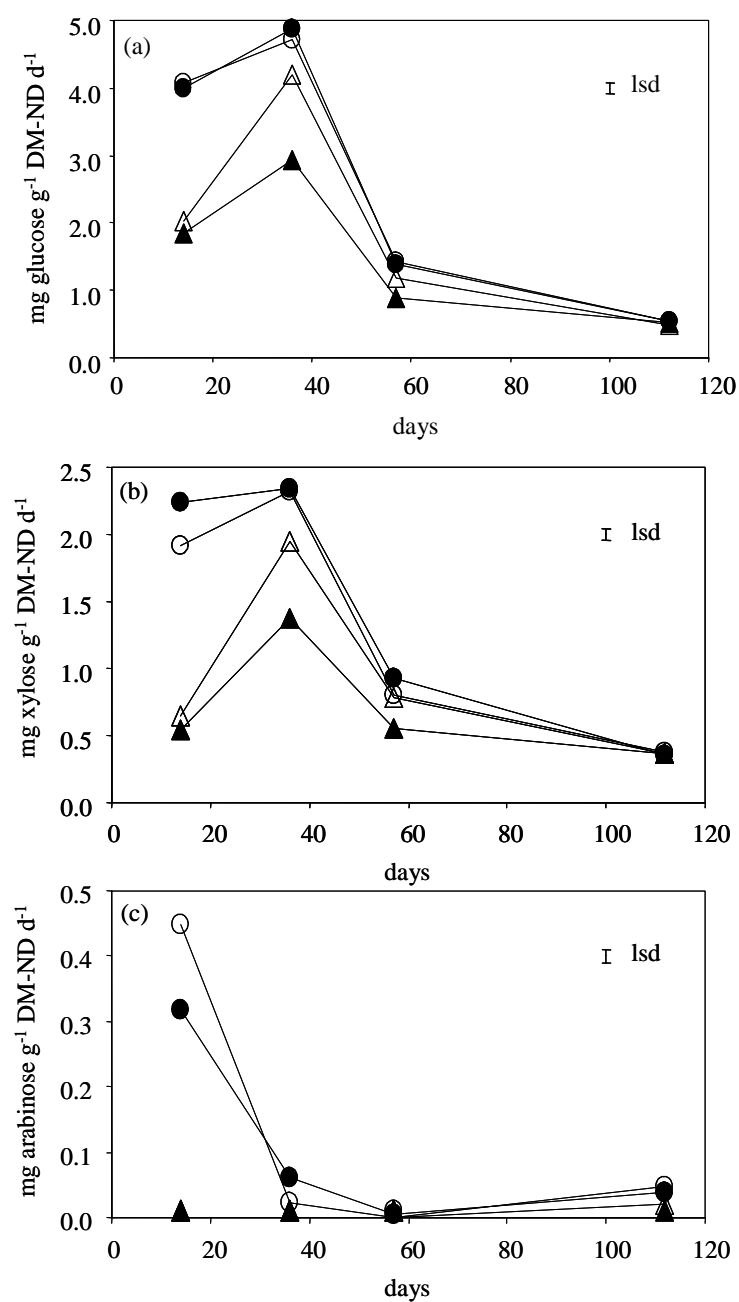
The evolution of cellulose (the main cell wall polymer degraded) was assessed from the changes in glucose content after 14, 36, 57 and 112 days of decomposition (Figure 2a). After 14 days of incubation, the glucose content decreased significantly in all genotypes, and after 112 days, the extent of glucose depletion was significantly greater in F292 and F292bm3 (70% and 67% of the initial glucose content, respectively) than in F2 (57%) and F2bm1 (48%) ( $P \leq 0.05$ ). The evolution of hemicellulose was assessed from the changes in xylose and arabinose contents. Changes in the xylose content closely followed those of glucose (Figure 2b). After 112 days of incubation, the xylose loss was significantly greater in F292 and F292bm3 (63% and 67% of the initial xylose content, respectively), than in F2 (53%) and F2bm1 (44%) ( $P \leq 0.05$ ). The evolution of arabinose differed from that of glucose and xylose. After 14 days, decomposition led to a significant decrease in arabinose content only in F292 and F292bm3 (Figure 2c) ( $P \leq 0.05$ ) whereas the roots of F2 and F2bm1 exhibited constant arabinose values throughout the incubation period (112 days).





**Figure 2:** Changes in glucose (a), xylose (b), arabinose (c) and Klason lignin (d) levels determined on NDF-residues from roots decomposed for 112 days: (△) F2, (▲) F2bm1, (○) F292 and (●) F292bm3. Values were corrected for dry matter loss during decomposition and are expressed as mg g<sup>-1</sup> dry matter of non-decomposed residues (DM-ND). Data are means (n=2).

On day 14 of incubation, the rates of glucose and xylose degradation were significantly greater in F292 and F292bm3 than in F2 and F2bm1 (Figures 3a and 3b) ( $P \leq 0.05$ ). Between 14 and 36 days of incubation, the glucose and xylose degradation rates increased for all genotypes, the slowest rates being observed with the F2bm1 genotype. Thereafter, the glucose and xylose degradation rates decreased in all genotypes to reach similar values at day 112. In contrast, the arabinose degradation rate was significantly greater in F292 than in F292bm3 after 14 days ( $P \leq 0.05$ ) whereas no arabinose degradation in F2 and F2bm1 was noted during this period (Figure 3c). Between days 14 and 36, the arabinose degradation rates decreased significantly in F292 and F292bm3 ( $P \leq 0.05$ ) and were close to zero at the end of incubation, like those of F2 and F2bm1.

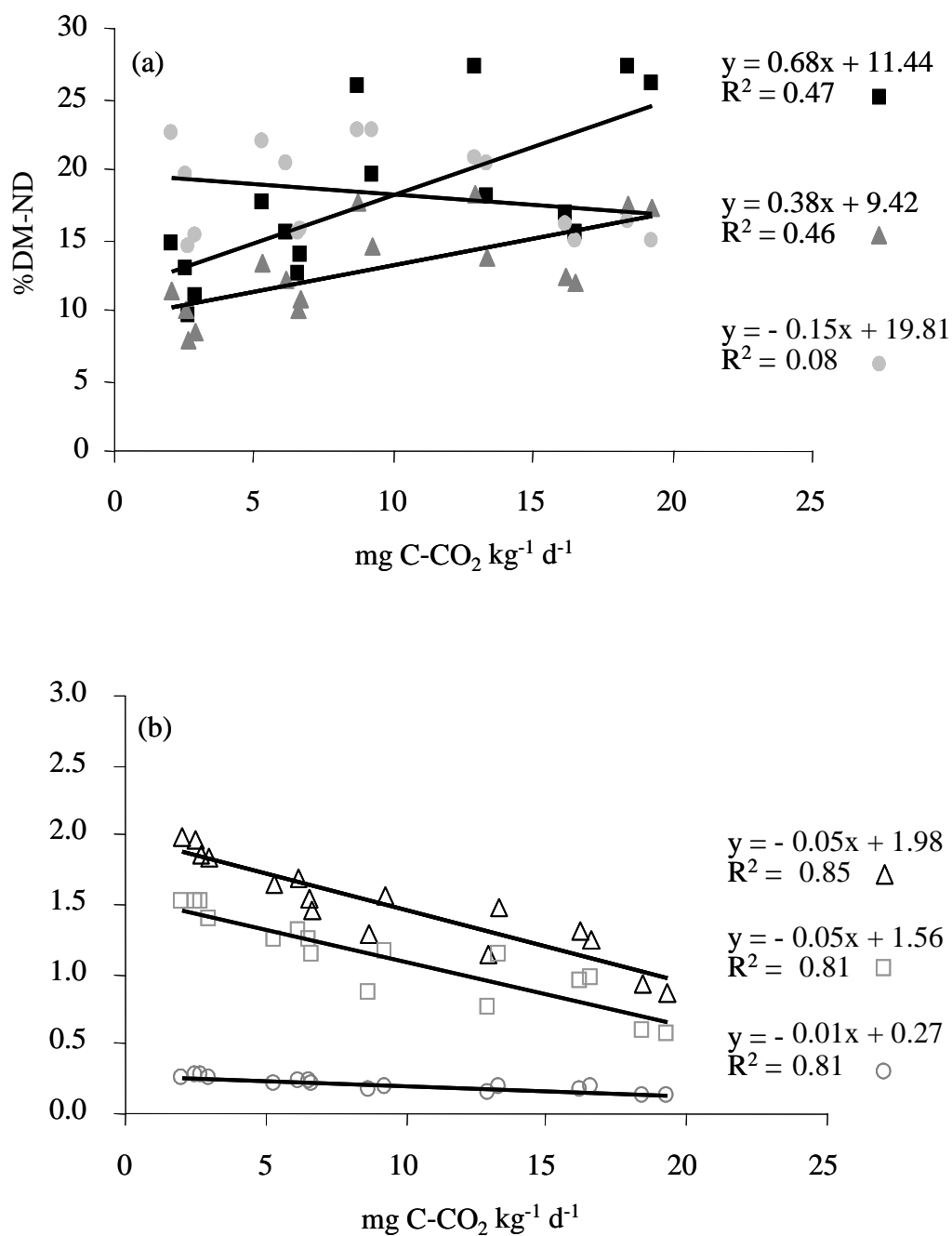


**Figure 3:** Glucose (a), xylose (b) and arabinose (c) degradation rates determined on NDF-residues after 112 days of root decomposition: ( $\Delta$ ) F2, ( $\blacktriangle$ ) F2bm1, ( $\circ$ ) F292 and ( $\bullet$ ) F292bm3. Values were corrected for dry matter loss during decomposition and are expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter of non-decomposed (DM-ND) residues  $\text{day}^{-1}$ . Data are means ( $n=2$ ).

The Klason lignin (KL) levels remained almost stable in F292 and F292bm3 but showed a weak but significant increase in F2 and F2bm1 during decomposition (Figure 2d) ( $P \leq 0.05$ ). After 112 days, the ranking of KL content was similar to that observed before decomposition (Table 1), with F2bm1 presenting significantly greater KL values (22.5% of non-decomposed dry matter) than F2 (19.6%), F292 (15.4%) and F292bm3 (14.5%) ( $P \leq 0.05$ ). The amounts of non-condensed lignin decreased in all genotypes in line with decomposition, compared with the values found before soil decomposition (Tables 1 and 2). The S to G ratio increased during decomposition in F2 and F292 which exhibited a preferential degradation of G units (Tables 1 and 2). The S to G ratios for F2bm1 and F292bm3 remained stable during decomposition.

Residual FA and PCA were determined only after 112 days of decomposition. The levels of esterified FA and PCA were both affected, and a significant decrease was observed in all genotypes (Table 2) ( $P \leq 0.05$ ). The loss of ester-linked PCA was greater in F292bm3 than in F292, F2 and F2bm1. The same pattern was observed for the esterified FA content (Table 2).

Relationships between the cell wall chemical features and C mineralization rates were determined from the glucose, arabinoxylans and Klason lignin contents in roots decomposed for 14, 36, 57 and 112 days and the mean C mineralization rates at 0-14, 14-36, 36-57 and 57-112 days, for all four genotypes. Glucose and arabinoxylans contents exhibited positive relationships with C mineralization rates ( $R^2 = 0.47$  and  $0.46$ , respectively) (Figure 4a). In contrast, the Klason lignin content was not correlated with C mineralization rates ( $R^2 = 0.08$ ) (Figure 4a). The ratios of Klason lignin to glucose (KL/Glu) and of Klason lignin to arabinoxylans (KL/AX) exhibited negative relationships with C mineralization rates ( $R^2 = 0.81$  and  $R^2 = 0.85$ , respectively) (Figure 4b). In addition, the mean C mineralization rates at 0-14, 14-36, 36-57 and 57-112 days were negatively correlated with the A/X ratio ( $R^2 = 0.81$ ) (Figure 4b) whereas no correlation was shown between these rates and either the S/G ratio ( $R^2 = 0.04$ ) or the proportion of non-condensed lignin structure ( $R^2 = 0.30$ ) (data not shown).



**Figure 4:** Relationships between mean C mineralization rates at 0-14, 14-36, 36-57 and 57-112 days of incubation and glucose (■), arabinoxylans (▲), Klason lignin contents (●) expressed as mg g<sup>-1</sup> dry matter of non-decomposed (ND) residues (a), the Klason lignin to arabinoxylans ratio (△), the Klason lignin to glucose ratio (□), and the arabinose to xylose ratio (○) (b).

## 4. Discussion

### 4.1. *Effects of brown-midrib mutations on root characteristics*

Similarities exist between crop residue decomposition in soil and forage digestibility in the rumen (Chesson *et al.*, 1997). Both require specific enzymes to break down the plant structure. Studies of rumen digestibility have shown that the above-ground parts of brown-midrib maize mutants are more digestible than those from normal lines (Cherney *et al.*, 1991; Barrière & Argillier, 1993; Barrière *et al.*, 1994). The impacts of bm1 and bm3 mutations on the cell wall quality of maize stems have thus been characterized (Halpin *et al.*, 1998; Barrière *et al.*, 2004; Méchin *et al.*, 2005), whereas the present study was focused on bm roots and reports for the first time the cell wall quality of bm roots and their decomposition in soil.

The stems of bm1 and bm3 maize mutants are mainly characterized by lower levels of lignin and esterified PCA, and altered lignin composition compared to normal lines. However, the importance of these variations may depend on the genetic background of the plants (Barrière & Argillier, 1993; Barrière *et al.*, 2004). Accordingly, the cell wall chemical composition of roots of the normal F2 and F292 counterparts were also different.

Many of the cell-wall characteristics of brown-midrib maize stems were also found in the roots. Notably, smaller amounts of esterified PCA were found in mutant roots than in the normal lines. In addition the differences in lignin composition (lower S/G ratio in bm3, higher level of condensation) were similar to those of stems. However, the changes in lignin content induced by the mutation differed between the above-ground and under-ground plant materials. Indeed, our results showed that the bm1 mutation caused an increase in the lignin content of maize roots whereas the bm3 mutation had no such effect on lignin content. However, the brown-midrib mutations may impact stems and roots to different extents. Root cell walls are more lignified with higher condensed lignin and contain a lower proportion of ester-linked phenolic acids than stems. These variations can be partly explained by the differences in anatomy and tissues types between root and stems (Esau, 1977).

### 4.2. *Relationships between initial root quality and mineralization*

The C to N ratio of plant residues is often used as an indicator of their potential degradation (Nicolardot *et al.*, 2001), but this is mainly true if the N content of residues is an indirect consequence of plant type or plant maturity, or when N availability limits the activity

of decomposers (Mary *et al.*, 1996). The overall N availability (soil + residue) was not limiting in our experiment and the C to N ratio (or root N content) of the four genotypes did not explain the observed ranking in C mineralization, although it satisfactorily explained the kinetics of soil mineral N. This is in agreement with work by Sall *et al.* (2007) which showed that the N content of residues did not influence the fate of added C when N availability was sufficient to meet overall microbial N requirements.

The genotypic variations in initial cell wall polysaccharides and initial Klason lignin contents followed the ranking of C mineralization rates. The lowest rates of C mineralization were found in the F2 and F2bm1 roots, which contained lower levels of cell wall polysaccharides and more Klason lignin than F292 and F292bm3 before decomposition.

Marked variations in cumulated C quantities were obtained even though the incubated residues were selected roots obtained from a single species (maize), and from plants grown under the same field conditions. The observed variations in total mineralized C were even greater than those measured during other studies using different plant parts from the same species or even different species (Gorissen *et al.*, 2000; Abiven *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2005). For example, Abiven *et al.* (2005) showed that the differences in total amounts of mineralized C observed between wheat or sorghum roots after 100 days of soil incubation, were equivalent to only 5% of the added C, whereas a difference of 18.5% was measured between bm1 and bm3 maize roots incubated under the same conditions. Indeed, variations in chemical quality between wheat and sorghum roots were more marked than those found in the maize roots selected for this study, thus showing the lack of proportionality between variations in residue chemical quality and those of cumulated mineralized C. Crop residue quality in the previously mentioned studies was determined in terms of independent fractions of different types, i.e. soluble, cellulose, hemicellulose and lignin. It should therefore be possible to determine relationships with C mineralization by analyzing the quality of the cell wall polymers in greater detail. These relationships can be established by monitoring the fate of the cell wall polymers during decomposition.

#### *4.3. Dynamics of cell wall components during decomposition*

Polysaccharides were the cell wall components most affected by decomposition. Although polysaccharide decomposition in residue-amended soils mainly originates from the residues, microbial sugars can, to a lesser extent, also participate in C mineralization (Derrien *et al.*, 2007). In the present study, and assuming that only those polysaccharides originating

from residues were degraded, the losses represented 60% of the total C mineralized after 112 days of decomposition (data not shown). The remaining glucose content measured during decomposition indicated that cellulose was the most markedly degraded cell wall polysaccharide, a finding in agreement with previous studies (Cheshire *et al.*, 1973). Cellulose and arabinoxylans were more degraded in the roots of F292 and F292bm3 (which exhibited higher levels of mineralized C at the end of the experiment) than in roots of F2 and F2bm1 which presented lower cumulated C kinetics.

The level of arabinoxylans substitution is represented by the arabinose to xylose ratio (A/X). Studies of the digestibility of cereal straws have shown that highly substituted arabinoxylans are less digestible (Chesson *et al.*, 1983). These studies also demonstrated that the A/X ratio increased with digestion time, showing a preferential degradation of the least substituted arabinoxylans. Our results also showed that the A/X ratio, which was similar in non-decomposed roots, increased with decomposition time in all four genotypes. However, the changes in A/X ratio during decomposition were not the same in all genotypes. After 14 days of incubation, the A/X ratio increased only in the roots of F2 and F2bm1, in which the lowest rates of arabinoxylans degradation were observed. This indicated that the degradation of arabinose-decorated xylans would be a limiting factor of root decomposition at an earlier stage in F2 and F2bm1 than in F292 and F292bm3. At the end of incubation (112 days), the A/X ratios were higher and similar for all genotypes when compared with the non-decomposed residues. Therefore, the remaining arabinoxylans showed relatively high substitution. Interactions between arabinoxylans and other cell wall polymers, as well as the substitution levels, may also hamper degradation (Chesson *et al.*, 1983). In this respect, phenolic acids, which play a key role in cross-linking arabinoxylans and lignin, are potential limiting factors in cell wall decomposition. The highest loss in phenolic acids after 112 days of decomposition was observed for F292bm3 roots in which the highest cumulative C mineralization occurred. A complete investigation of changes in PCA and FA at different incubation times would be required to get a more comprehensive view of their impact on the soil decomposition process.

According to the Klason determinations, the lignin component was not degraded during the incubation period applied in this study. A slight increase in lignin levels was even observed in roots from F2 and F2bm1, as had previously been reported in wheat roots (Bertrand *et al.*, 2006). A preferential loss of non-lignified root material might have occurred when the residues were washed after removal from the soil.

Non-condensed lignins have been reported to be preferentially degraded during decomposition in soil compared to condensed lignins (Shimada, 1980; Bertrand *et al.* 2006). This is in agreement with our results which showed that the levels of non-condensed lignins decreased during decomposition in all four genotypes. However, this reduction was not detectable from the Klason lignin (acid-insoluble lignin) measurements. Indeed, non-condensed lignins, which accounted for less than 20% of the total lignin, may be partly acid-soluble (Yasuda *et al.*, 2001). After 112 days of decomposition, the degradation of non-condensed lignins represented 3% to 5% of the total C mineralized in all four genotypes (data not shown).

#### *4.4. Role of cell-wall chemical factors in the rates of C mineralization*

The Klason lignin to Glucose ratio (KL/Glu) or the Klason lignin to arabinoxylans ratio (KL/AX) improved the relationships with the mineralized C rates compared with those based solely on glucose, arabinoxylans and Klason lignin. These ratios seemed more appropriate to describe the mineralization process because (i) they were not influenced by dry matter losses and (ii) they more clearly reflected the intimate association of lignin and cell wall polysaccharides in a cohesive network, which has been shown to influence biodegradation rates (Chesson, 1988). Therefore, the KL/Glu and KL/AX ratios determined during decomposition apparently constituted good chemical criteria to explain the kinetics of C mineralization. Another explanatory factor, the arabinose to xylose ratio (A/X), may also be relevant as it reflects the quality of one of the major cell wall components degraded during root decomposition. However, these ratios were deduced from dynamic experiments during which the C mineralization rates and changes in polymers were measured at different times during decomposition. Predictive criteria for decomposition are required as such experiments are time-consuming and expensive. If the above ratios (KL/Glu, KL/AX, A/X) are to be predictive of decomposition, as suggested by this study, it will be necessary to take into account the initial chemical characteristics of residues and to use a wider range of maize root residues. In addition, further investigations will be necessary to determine the role of cross-linking between cell wall polymers on the decomposition process.



## 5. Conclusions

Maize roots presented marked variations in cumulated mineralized C which were not proportional to those of their initial chemical quality. By monitoring cell wall quality evolution during decomposition, chemical criteria such as the KL/GLU, KL/AX and A/X ratios can be identified which explain the kinetics of C mineralization. These ratios are better able to discriminate between initial residue qualities than the cell wall polymers considered separately. This is probably because they reflect interactions between polysaccharides and lignin within the cell walls that are suggested to affect soil decomposition.

## Acknowledgements

This study was financially supported by the région Champagne-Ardenne and INRA. The authors wish to thank G. Alavoine, D. Crônier, M.J. Herre and S. Millon for their technical assistance, and Y. Barrière for providing the plant material.

## References

- Abiven, S., Recous, S., Reyes, V., & Oliver, R. 2005. Mineralization of C and N from root, stem and leaf-residues in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of Soils*, **42**, 119-128.
- Akin, D.E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal*, **81**, 17-25.
- Barrière, Y. & Argillier, O. 1993. Brown-midrib genes of maize: a review. *Agronomie*, **13**, 865-876.
- Barrière Y., Argillier, O., Chabbert, B., Tollier, M.T. & Monties, B. 1994. Breeding silage maize with brown-midrib genes. Feeding value and biochemical characteristics. *Agronomie*, **14**, 15-25.
- Barrière, Y., Ralph, J., Méchin, V., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Argillier, O., Chabbert, B. & Lapiere, C. 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 847-860.

- Beaugrand, J., Crônier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P. & Chabbert, B. 2004. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7108-7117.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B. & Recous, S. 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil?. *Plant and Soil*, **281**, 291-307.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. & Stone, B.A. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, **113**, 291-299.
- Brett, C.T. & Waldron, K.W. 1996. The molecular components of the wall. In: *Physiology and biochemistry of plant cell walls* (eds M. Black & B. Charlwood), pp. 4-43. Chapman & Hall, London.
- Chaussod, R., Nicolardot, B. & Catroux, G. 1986. Mesure en routine de la biomasse des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol*, **2**, 201-211.
- Cherney J.H., Cherney, D.J.R., Akin, D.E. & Axtell, J.D. 1991. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advance in Agronomy*, **46**, 157-198.
- Cheshire, M.V., Mundie, C.M. & Shepard, H. 1973. The origin of soil polysaccharide transformation of sugars during the decomposition in soil of plant material labelled with <sup>14</sup>C. *Journal of Soil Science*, **24**, 54-68.
- Chesson, A. 1988. Lignin-polysaccharides complexes of the plant cell wall and their effect on microbial degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, **21**, 219-228.
- Chesson, A. 1997. Plant degradation by ruminants: parallels with litter decomposition in soils. In: *Driven by Nature, Plant Litter Quality and Decomposition* (eds G. Caddish & K.E. Giller, K.E.), pp. 47-66. CAB International, Wallingford, UK.
- Chesson, A., Gordon, A.H. & Lomax, J.A. 1983. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **34**, 1330-1340.
- Derrien, D., Marol, C. & Balesdent, J. 2007. Microbial biosyntheses of individual neutral sugars among sets of substrates and soils. *Geoderma*, **139**, 190-198.
- Esau, K. 1977. The root: primary state of growth. In: *Anatomy of Seed Plants* (ed. J. Wiley), pp. 215-242. London, UK.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J. 1970. Forage Fiber Analysis. US Government Printing Office, Washington, DC Agriculture Handbook No. 379, USDA-ARS.

- Gorissen, A. & Cotrufo, M.F. 2000. Decomposition of leaf and root tissue of three perennial grass species grown at two levels of atmospheric CO<sub>2</sub> and N supply. *Plant and Soil*, **224**, 75-84.
- Halpin, C., Holt, K., Chojecki, J., Oliver, D., Chabbert, B., Monties, B., Edwards, K., Barakate, A. & Foxon, G.A. 1998. Brown-midrib maize (bm1) – a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *The Plant Journal*, **14**, 545-553.
- Herman, W.A., McGill, W.B. & Dormaar, J.F. 1977. Effects of initial chemical composition on decomposition of roots of three grass species. *Canadian Journal of Soil Science*, **57**, 205-215.
- Hopkins, D.W., Webster, E.A., Chudek, J.A. & Halpin, C. 2001. Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1455-1462.
- Jensen, L.S., Salo, T., Palmason, F., Breland, T.A., Henriksen, T.M., Stenberg, B., Pederson, A., Lundström, C. & Esala, M. 2005. Influence of biochemical quality on C and N mineralization from a broad variety of plant materials in soil. *Plant and Soil*, **273**, 307-326.
- Kamphake, L.J., Hannah, S.A. & Cohen, J.M. 1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research*, **1**, 205-216.
- Kato, Y. & Nevis, D.J. 1985. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- $\alpha$ -L-arabinosyl) – (1 $\rightarrow$ 4)-D-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. *Carbohydrate Research*, **137**, 139-150.
- Krom, M.D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst*, **105**, 305-316.
- Lapierre, C., Monties, B. & Rolando, R. 1986. Thioacidolysis of poplar lignins : Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung*, **40**, 113-119.
- Mary, B., Recous, S., Darwis, D. & Robin, D. 1996. Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. *Plant and Soil*, **191**, 71-82.
- Méchin, V., Argillier, O., Rocher, F., Hébert, Y., Mila, I., Pollet, B., Barrière, Y. & Lapierre, C. 2005. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 5872-5881.
- Monties, B. 1984. Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: Influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie*, **4**, 387-392.

- Nicolardot, B., Recous, S. & Mary, B. 2001. Simulation of C and N mineralization during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C:N ratio of the residues. *Plant and Soil*, **228**, 83-103.
- Puget, P. & Drinkwater, L.E. 2001. Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous manure. *Soil Science Society of America Journal*, **65**, 771-779.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D. & Jung, H.G. 1993. The importance of cell wall cross-linking. *Plant Chemistry*, 38-44.
- Rasse, D.P., Rumpel, C. & Dignac, M.F. 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Soil Biology and Biochemistry*, **269**, 341-356.
- Recous, S., Robin, D., Darwis, D. & Mary, B. 1995. Soil inorganic N availability: effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**, 1529-1538.
- Sall, S., Bertrand, I., Chotte, J.L. & Recous, S. 2007. Separate effects of the biochemical quality and N content of crop residues on C and N dynamics in soil. *Biology and Fertility of Soils*, **43**, 797-804.
- Shimada, M. 1980. Stereobiochemical approach to lignin biodegradation. In: *Lignin biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications* (eds T. K. Kirk, T. Higuchi & H.M. Chang), pp. 195-215. CRC Press, Boca Raton.
- White, P.M., Rice, C.W., Baldock, J.A. & Tuinstra, M.R. 2007. Soil biological properties following additions of bmr mutant grain sorghum. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 1518-1532.
- Yasuda, S., Fukushima, K. & Kakehi, A. 2001. Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulphuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood. *Journal of Wood Science*, **47**, 69-72.



# **CHAPITRE 4**

**C mineralization of sixteen maize root genotypes varying by their chemical composition: ability to explain and predict their decomposition rates on the short and long terms, using a range of chemical determinations**



---

## **C mineralization of sixteen maize root genotypes varying by their chemical composition: ability to explain and predict their decomposition rates on the short and long terms, using a range of chemical determinations**

### **Abstract**

This study aimed at determining the chemical characteristics of roots that regulate their C mineralization on the long term in soil. The chemical composition of maize roots from sixteen genotypes was characterized in details before soil decomposition. Roots were also incubated in soil for 796 days under laboratory conditions (15°C, -80 kPa). The chemical quality of maize roots differed markedly between genotypes notably in term of contents and quality of cell wall polysaccharides and lignin, and content in esterified phenolic acids. Depending on the genotype, the mineralization of root-C greatly varied from 41.6% to 70.1% of added-C after 796 days. Statistical relationships were established between the fate of C from roots and their initial chemical characteristics. The role of the intimate associations between the lignin fraction and cell wall polysaccharides in a cohesive network, and the role of esterified PCA are of primary importance and could improve the prediction of residue decomposition in soils. The cumulative amounts of mineralized C were not correctly simulated using the standard parameterization of the RothC model. The optimization of the Decomposable Plant Material to Resistant Plant Material ratios (DPM/RPM) showed that a unique ratio was not applicable to the used maize roots, and suggested that the RPM compartment was systematically higher than the DPM compartment in the case of roots. We proposed that lignin could be a relevant chemical criterion to characterize and model the quality impact of plant residues on C mineralization.

### **1. Introduction**

The chemical characteristics of crop residues are one of the main factors that strongly influence their decomposition in soils (Heal, 1997). Most models that aim at simulating the decomposition of residues take into account the initial chemical quality of residues, but the description is fairly variable. Models that adopt a mechanistic approach to describe C and N biotransformations have included chemical, such as soluble, hemicellulose, cellulose and lignin fractions (Neel, 1996), or easily decomposable and recalcitrant fractions (Coleman and



Jenkinson, 1996). Models that simulate agronomic scenarios often describe the chemical quality of crop residues only by their relative C to N contents (C/N ratio) (Vanlauwe et al., 1996; Probert et al., 1998; Nicolardot et al., 2001). However, this ratio does not account for the availability of C and N, which is often essential to describe the decomposition kinetics (Camiré et al., 1991; Recous et al., 1995). Many studies aimed at finding other chemical characteristics to predict the decomposition of crop residues, and the initial residue N content (Frankenberger and Abdelmagid, 1985), lignin (Müller et al., 1988), polyphenols (Constantinides and Fownes, 1994), and soluble C contents (Oglesby and Fownes, 1992; Trinsoutrot et al., 2000) were useful indicators of the quality of residues studied. However, these chemical parameters often fail at predicting accurately the decomposition of a large set of crop residues in soils, and this is particularly true for plant roots (Abiven et al., 2005). To our knowledge, few results have been published concerning the effect of chemical quality on root decomposition in soil (Herman et al., 1977; Rasse et al., 2005). Roots are one of the major sources of C contributing to soil organic matter build-up (Pujet and Drinkwater, 2001; Rasse et al., 2005), and the understanding of their kinetics of decomposition in soil needs to be improved. Roots are particularly rich in cell walls and are more lignified than aerial plant parts (Carrera et al., 2008). Therefore the nature and the structure of these cell walls could significantly influence the kinetics of C mineralization in the medium and long terms.

In this study, we focussed on a set of roots of the natural maize mutants named brown-midrib (bm) and of maize hybrids. This plant material was selected because it does present a range of chemical properties related to lignin, as shown on maize above-ground parts (Barrière et al., 2004), and it does not suffer from a combined variation of chemical and structural characteristics related to residue anatomy because the same tissue types are present in all plants. We hypothesized that variations in the chemical characteristics of roots of these genotypes of maize would provide sufficient differences to investigate relationships between chemical quality and decomposition in soil.

Recently, several studies suggested that detailed plant analysis could provide a better prediction of C mineralization during decomposition than that offered by traditional proximate analysis (Bertrand et al., 2006; Gunnarsson et al., 2008). We were especially interested to examine whether the detailed characterization of the cell wall composition, i.e. cell wall polysaccharides and lignin composition and the interactions existing between cell wall polymers, could help explaining root decomposition in soil.

The aims of this work were (i) to better understand the role of the chemical quality on the root decomposition in soils and (ii) to improve the designing of parameters that could be

used to describe residue quality in C models. The assessment of these criteria was based on the relationships between the initial chemical characteristics of the set of 16 maize genotypes roots and the cumulative amounts of C mineralization determined under controlled conditions. The RothC model (Coleman and Jenkinson, 1996) was used to simulate the fate of root-C in soil and a parameterization of the quality parameter (the Decomposable Plant Material compartment (DPM) and the Resistant Plant Material compartment (RMP) for maize roots is proposed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Soil and maize roots

Soil was sampled from the 5-30 cm layer of a plot at the INRA experimental station in Estrées-Mons, northern France (49°80'N, 3°60'E). The soil had a silty loam texture (17.8% clay, 77.3% silt, 3.8% sand), contained 0.95% organic C, and had a pH (H<sub>2</sub>O) of 7.6. The soil was air-dried for two days to a moisture content of 120 mg g<sup>-1</sup> dry soil, and then immediately sieved to 2 mm. All visible organic residues were removed by hand after sieving. The soil was stored at 15°C for a week prior to incubation.

Two sets of maize (*Zea mays* L.) brown-midrib isogenic lines, within the genetic background of inbreds F2 (F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3 and F2bm4) and F292 (F292, F292bm1, F292bm2, F292bm3 and F292bm4), and a set of six maize hybrids (F7026bm3\*F2bm3, Mexxal, Anjou 285, Anjou 258, Columbus and Manfusa) were studied, and were indicated by numbers 1 to 16 in figures. All genotypes were cultivated in 2005 in experimental fields at the INRA Lusignan experimental station (49°26'N, 0°07'E, Vienne, France) and were harvested at physiological maturity. Only the roots were kept for experiments. These roots were washed with a 50 g l<sup>-1</sup> sodium metaphosphate solution for 24 h, rinsed with deionised water to remove soil particles, and then dried for one week at 30°C. Roots with a diameter of 2 to 3 mm were selected for the study.

### 2.2. Soil laboratory incubations

Soil samples and maize roots (about 5 mm long) were mixed at a rate equivalent to 2 g C kg<sup>-1</sup> dry soil and incubated for 796 days at 15°C. As the aim of this study was solely to investigate the effect of the chemical composition of maize roots on their decomposition in

soil, it was ensured that maize root decomposition was not limited by external conditions like inorganic N availability (Recous et al., 1995; Henriksen and Breland, 1999). Thus, inorganic N was added to the soil as  $\text{KNO}_3$  to produce an initial concentration of about  $70 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  dry soil. The concentration of the added N solution was calculated such that the soil moisture was kept at a potential of  $-80 \text{ kPa}$ , corresponding to a water content of  $190 \text{ g kg}^{-1}$ . Soil moisture was maintained throughout the incubation period by weighing at weekly intervals and readjusting with deionised water when necessary. A control incubation experiment was performed in the same way but without the addition of residues.

Carbon mineralization was measured in soil samples (equivalent to  $50 \text{ g}$  dry soil) incubated in  $500 \text{ ml}$  glass jars (four replicates per treatment) in the presence of a  $\text{CO}_2$  trap ( $10 \text{ ml}$   $1 \text{ M}$   $\text{NaOH}$ ). It was measured at days 3, 7, 10, 14, 21, 28, 36, 42, 51, 59, 70, 80, 88, 95, 112, 126, 140, 152, 168, 183, 196, 217, 231, 245, 259, 269, 284, 302, 315, 330, 354, 393, 422, 490, 519, 548, 570, 616, 665, 713, 766 and 796 after the beginning of incubation. The apparent mineralization of C from roots was calculated from the difference between the  $\text{CO}_2$ -C produced by the soil-residue mixtures and that produced in the same period by the control soil. It was thus assumed that the priming effects due to the addition of roots to native soil organic matter were comparable for the different experimental treatments.

The concentrations of  $\text{CO}_2$  trapped in the  $\text{NaOH}$  solutions were measured by continuous flow colorimetry (Chaussod et al., 1986) using an auto-analyzer (Futura Alliance Instrument, Frepillon, France). The mineral N ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) in the soil were measured by continuous flow colorimetry (TRAACS 2000, Bran & Luebbe, Norderstedt, Germany). The  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  were measured using an adaptation of the method proposed by Kamphake et al. (1967) and the  $\text{NH}_4^+$  by a method derived from that of Krom (1980).

### 2.3. Chemical characterizations

The chemical characteristics of maize roots were determined on two replicates of each root type. The total C and N contents of maize roots were measured by elemental analysis (NA 1500, Fisons Instruments). The mineral N and soluble C in the residues were obtained by extraction in water for  $30 \text{ min}$  at  $20^\circ\text{C}$ , then for  $1 \text{ h}$  at  $100^\circ\text{C}$  ( $1:100$  material/extractant ratio). The mineral N was measured by continuous flow colorimetry (see above). The concentration of soluble C was determined with an auto-analyser (1010, O.I. Analytical, College Station, TX) by oxidation at  $100^\circ\text{C}$  in a persulfate medium, followed by infrared detection of the  $\text{CO}_2$  evolved (Barcelona, 1984).

Maize root residues before decomposition in soil were analysed for soluble, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) according to Goering and Van Soest (1970) and Van Soest (1963). Briefly, the soluble fraction was obtained by boiling 1.5 g of residues (ca 5 mm long / 2 mm diameter) in deionized water (100°C) for 30 min followed by extraction with a neutral detergent (100°C) for 60 min to obtain the NDF fraction. The resulting non-extracted material was then successively subjected to selective extraction for hemicellulose Van Soest (HVS) and cellulose Van Soest (CVS) as described by Van Soest (1963). Concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used for the last step of the extraction and the final mass of the non-extractable fraction was considered as lignin-like compounds (LVS). Ash measurements were performed at 550°C for 4 h and were very low and not retained for the calculations.

Maize root samples before decomposition in soil were subjected to cell wall preparation which consisted of the extraction of neutral detergent fiber (NDF) fraction (described above) to remove cytoplasmic components (proteins, wax, pigments, tannin, etc...). The NDF-residues were prepared by scaling up the NDF analytical procedure (Goering and Van Soest, 1970) with additional washing to remove traces of detergent. All cell wall preparations were dried for one week at 30°C and ground to 80 µm before analysis.

The polysaccharides were analyzed according to Blakeney et al. (1983) on roots after NDF extraction (cell walls). Ten mg of sample were swollen in 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (125 µl) for 2 h at 20°C followed by a second hydrolysis with 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100°C. The released monosaccharides were separated by high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) on a CarboPac PA-1 column (4 X 250 mm, Dionex) as described by Beaugrand et al. (2004). Monosaccharides composition was analyzed and quantified using both 2-deoxy-D-ribose as the internal standard and standard solutions of neutral carbohydrates (L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-xylose) and acidic carbohydrates (galacturonic and glucuronic acids).

Lignin determined as the insoluble residue remaining after a two step sulphuric acid hydrolysis of the cell wall polysaccharides (Monties, 1984) was Klason lignin (KL). Briefly, 200 mg of cell walls were suspended in 2 ml of 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 20°C. Suspensions were then diluted to 5% with deionised water and boiled for 3 h then filtered. The remaining residues were dried at 105°C and ash measurements performed at 550°C for 4 h.

The lignin monomer composition was determined by thioacidolysis. This reaction enables the specific disruption of labile-ether inter-monomer linkages, which represent the non-condensed lignin fraction. Ten mg of cell walls were put in a tube with a Teflon-lined screw cap, and

heated in 10 ml dioxane:ethanethiol (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate for 4 h at 100°C with occasional shaking (Lapierre et al., 1986). After heating, the tubes were cooled at room temperature for 10 min. Then, 250 µg of tetracosane (C<sub>24</sub>) in a dichloromethane solution was added to the reaction mixture as internal standard. The boron trifluoride etherate was neutralized by 0.4 M NaHCO<sub>3</sub> and the liquid was acidified to pH 1-2 using 6 M HCl. The reaction mixture was then extracted three times with 25 ml of dichloromethane. Anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the combined organic phases to remove any remaining water. The dichloromethane extract were evaporated at 40°C to a 0.5 ml final volume, and then transferred to 2 ml glass vials. Ten µl of the sample were silylated with 20 µl pyridine and 70 µl N, O bis(trimethylsilyl) trifluoro-acetamide in a conical bottomed tight vial of 200 µl capacity fitted with a Teflon-lined screw cap. The silylation is complete after few hours, at room temperature. Monomer products were analyzed as trimethylsilyl derivatives of guaiacyl (G) and syringyl (S) by capillary column gas chromatography using a J&W DB-1 column (30 m long, 0.3 mm i.d.; 0.25 µm film thickness) and a temperature gradient of 160-280°C at 2°C min<sup>-1</sup>. The carrier gas was helium at 60 kPa, and detection was done by flame ionization. Yields of lignin extracted by thioacidolysis from maize root residues could be assess using the following equation:

$$\text{Yield (\%KL)} = ((S + G) * 200 * 100) / \%KL$$

The sum of (S + G) is expressed in mol/g of maize root residues, and the average C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> molecular weight was estimated as 200, according to Lapierre et al. (1993). Yields are expressed as percentage of Klason lignin.

Ester-linked hydroxycinnamic acids (ferulic acid (FA) and *p*-coumaric acid (PCA)) were released by incubating 10 mg cell wall residues with 2 M NaOH (10 ml) for 2 h at 35 °C with constant stirring under a nitrogen atmosphere. After cooling for 10 min, the reaction was stopped by adjusting the pH to 1 with 6 M HCl, prior to the addition of 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamic acid as internal standard. Hydroxycinnamic acids were then extracted three times with diethyl oxide (30 ml). The organic fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure. The dried extract was dissolved in 1.5 ml methanol:water (1:1, v/v) and filtered (0.45 µm) prior to injection on to a Spherisorb S50DS2 (Waters, RP-18, 250x2.6 mm) column. The elution gradient was: A (acetonitrile, orthophosphoric acid 15 mM in Milli-Q water, 10:90, v/v) 100-92% for 6 min; then 92-0% A with solvent B (methanol; orthophosphoric acid 15 mM in Milli-Q water, 80:20, v/v 0-50%) and C (acetonitrile; orthophosphoric acid 15 mM in Milli-Q water, 80:20, v/v) 0-50% for 29 min.

Hydroxycinnamic acids in the eluates were detected using a Waters photodiode array UV detector. HCA monomers were quantified at 302 nm using commercial standards.

Total hydroxycinnamic acids (THA) (ester- and ether-linked PCA and FA) were released by incubating 30 mg cell wall residues with 4 M NaOH (10 ml) for 2h at 170°C. THA were then extracted as described above for the determination of ester-linked hydroxycinnamic acids. Ether-linked PCA and FA were calculated as the difference between THA and ester-linked PCA and FA.

The total polyphenols content of maize roots was determined using an adaptation of the Folin-Ciocalteu method (1927). Briefly, 100 mg of maize roots (ground to 1 mm) were suspended in 20 ml of an acetone-water solution (70:30) for 24 h at room temperature in the dark. Five ml of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma F9252) were then added to 0.5 ml of the total polyphenols extract diluted in 0.5 ml of deionised water and, after 3 min, 4 ml of 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were added to the solution which stayed for 2 h at room temperature. The total polyphenols released were quantified by a spectrophotometer (HELIOS, Thermo) at 760 nm using a standard solution of tannic acid (Sigma 403040).

#### 2.4. Modelling

The RothC model was chosen for its capacity to simulate C mineralization of crop residues on long term (Coleman and Jenkinson, 1996) and therefore to quantify the impact of soil use and management (which determines the nature of crops and of recycled crop litter) on soil C. It is a soil organic matter decomposition model in which incoming plant-C residues are divided in Decomposable Plant Material (DPM) and Resistant Plant Material (RPM). Both decompose to form microbial biomass (BIO) and Humified Organic Matter (HUM). Mineralized residue-C is evolved as CO<sub>2</sub>. Each compartment decomposes by first order kinetics, and each has a maximum decomposition rate. The model also includes a pool of Inert Organic Matter (IOM). The actual decomposition rate is calculated using three multiplicative factors taking into account effects of temperature, soil moisture and plant residue type, and is attributed at each time step (month). Clay content of the soil determines the partitioning of soil organic carbon between BIO, HUM and evolved CO<sub>2</sub>. The Roth-C model was partly validated in several studies (Powlson et al., 1996), for tropical soils (Diels et al., 2004) and in particular for French cereal cropping systems (Balesdent, 1996).

The default values of the model were used for all parameters, with exception for the DPM/RPM ratio which reflects the chemical plant residue quality. The decomposition rate

constants of the different compartments were multiplied by a climatic factor of 1.90, corresponding to the applied conditions of incubation (temperature at 15°C and optimal soil moisture). Consequently, the rate constants used in the simulation were,  $k_{DPM} = 19.07 \text{ year}^{-1}$ ;  $k_{RPM} = 0.57 \text{ year}^{-1}$ ;  $k_{BIO} = 1.26 \text{ year}^{-1}$ ;  $k_{HUM} = 0.04 \text{ year}^{-1}$ . The model was run with a 1-day time step for 796 days and the DPM/RPM ratio was optimized by minimizing the sum of squared differences between observed and simulated C-CO<sub>2</sub>.

### 2.5. Data treatment and analysis

All of the statistical analyses were performed with the Genstat 8.1 software. The dataset employed to perform the simple correlation study and the multiple regression analysis was composed of the 16 genotypes characterized for all chemical variables, the cumulative amounts of mineralized C, and the optimized DPM/RPM ratios. The multiple regression models incorporating these variables were calculated using the STEPWISE option.

## 3. Results

### 3.1. Chemical characteristics of maize root residues before decomposition

Table 1 summarizes the data obtained for the chemical characteristics of the 16 genotypes of maize roots before decomposition in soil. Total C contents varied from 45.7% to 47.9% of dry matter while the amounts of total N ranged from 0.5 to 1.3% of dry matter (Table 1). These contents lead to C to N ratio from 37 (F2bm1) to 97 (Manfusa). The NDS soluble fraction accounted for < 22% of dry matter, therefore cell wall contents were high (Table 1). F2bm4 was characterized by the highest soluble C and N contents at 20°C and 100°C, which accounted for less than 3% of dry matter (Table 1).

Two methods were used to quantify the cellulose and hemicellulose contents of the root residues: the Van Soest extraction procedure and the hydrolysis of cell wall neutral sugars. In the later method, the amount of glucose can be attributed to the cellulose fraction while the sum of arabinose, galactose and xylose gives a fairly good approximation of the hemicellulose fraction (Brett and Waldron, 1996). Both methods indicated that cellulose (i.e. cellulose Van Soest (CVS) or glucose) was the major constituent of the root cell walls, except for F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3, F2bm4 and F292 where the Hemicellulose Van Soest (HVS) contents were higher than those of glucose (Table 1). The glucose content ranged from 30.7%

to 41.1% of dry matter (Table 1) and was significantly related to CVS contents (Figure 1a). The sum of galactose, arabinose and xylose contents (i.e. equivalent to hemicellulose) was also lower than HVS (Table 1), but without significant relationship between them (Figure 1b). The arabinose to xylose ratio (A/X) slightly varied between genotypes, indicating a similar level of xylan substitution by arabinose (Table 1). The galacturonic and glucuronic acids contents accounted for less than 2% of dry matter (Table 1).

The amounts of lignin in root cell walls were measured by the Van Soest procedure and the Klason method. The amount of Klason lignin (KL) varied from 15.2% to 19.4% DM (Table 1). The acid detergent lignin determined by Van Soest method (LVS) was always lower than Klason Lignin content but closely and significantly correlated to it (figure 1c). The amounts of S unit ranged from 25.1 to 90.5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  of cell wall, while the amounts of G unit varied from 21.2 to 54.2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  of cell wall (Table 1). Furthermore, the relative proportion of S unit was smaller than that of G unit in all bm3 mutants, leading to S to G ratios  $<1$  which were only found in these genotypes (Table 1). Considering that the Klason determination, performed on NDF-residues, gave a correct estimation of the lignin structures, the proportion of non-condensed lignin structures in each residue could be estimated (Lapierre, 1993). Overall, lignin from brown-midrib roots had the lowest proportions of non-condensed structures (Table 1).

Ester-linked PCA were more abundant than ester-linked FA and ranged from 1.6% to 3.6% of cell wall. The ether-linked FA slightly varied from 0.2 to 0.4% of cell wall while ether-linked PCA was detected only in trace amounts. The total polyphenols contents ranged from 0.7% to 2.2% of dry matter (Table 1).



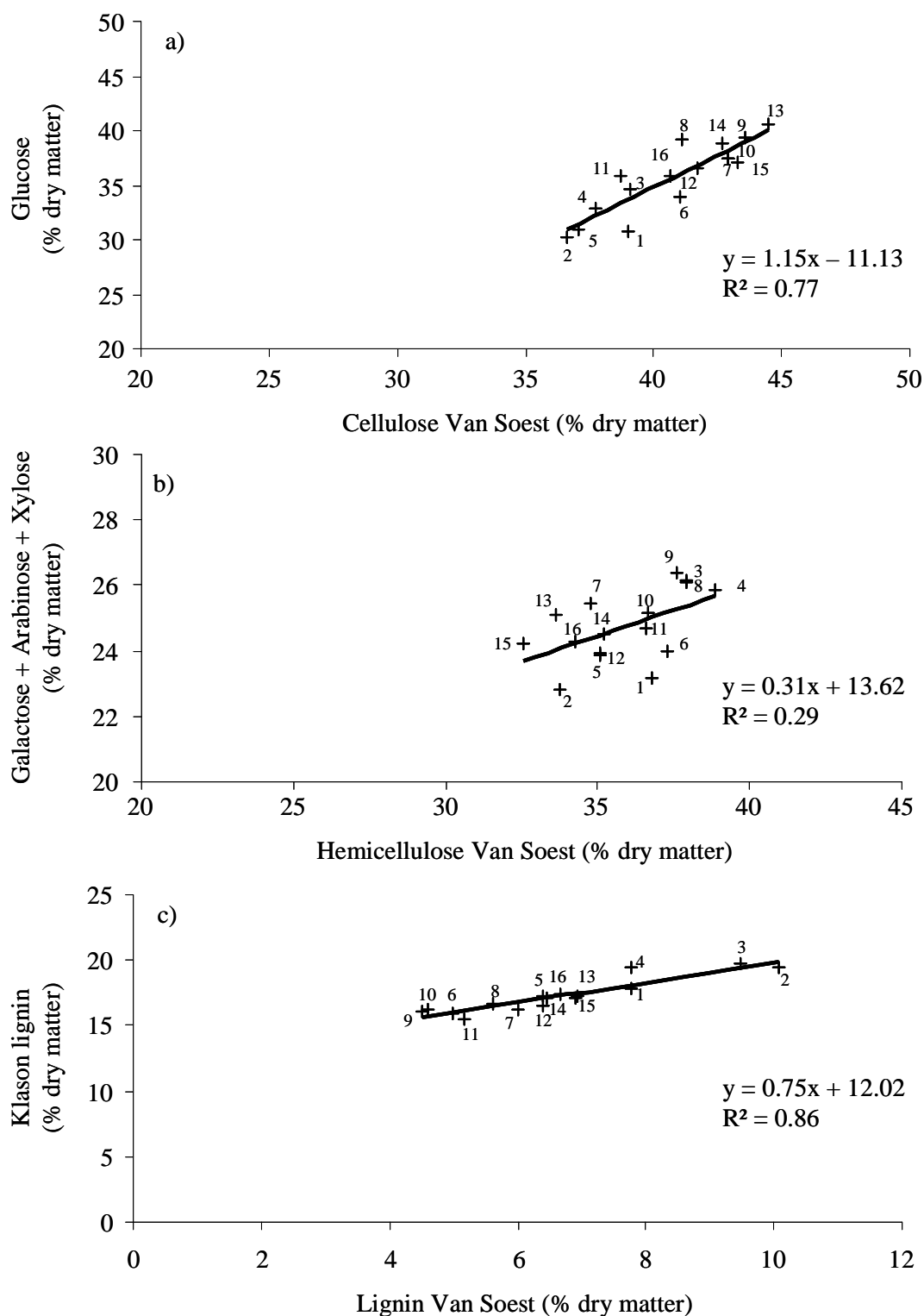
**Table 1**

Chemical properties of maize root residues before decomposition in soil.

	F2	F2 bm1	F2 bm2	F2 bm3	F2 bm4	F292	F292 bm1	F292 bm2	F292 bm3	F292 bm4	F7026 bm3* F2bm3	Mexxal	Anjou 285	Anjou 258	Col- ombus	Man- fusa
Corresponding number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C (% dry matter)	47.7	47.8	47.9	47.6	47.4	46.8	46.3	46.2	46.3	46.6	45.8	45.7	46.6	47.1	46.2	46.8
N (% dry matter)	0.9	1.3	1.1	1.0	1.0	0.7	0.8	0.8	0.7	0.7	0.7	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5
C/N ratio	54	37	45	47	50	71	59	60	67	65	63	78	85	86	96	97
Soluble (% dry matter)	16.1	19.4	13.2	15.2	21.2	16.4	16.1	15.0	14.0	15.6	19.3	16.6	14.8	15.2	17.1	18.4
Soluble C at 20°C (% dry matter)	0.30	0.25	0.14	0.18	0.67	0.26	0.14	0.19	0.20	0.20	0.38	0.40	0.51	0.44	0.30	0.58
Soluble C at 100°C (% dry matter)	1.71	1.70	1.07	1.40	1.91	1.30	1.75	1.70	1.59	1.53	1.74	1.47	1.23	1.42	1.24	1.34
Soluble N at 20°C (% dry matter)	0.05	0.06	0.04	0.05	0.14	0.05	0.06	0.07	0.07	0.09	0.09	0.07	0.08	0.11	0.14	0.09
Soluble N at 100°C (% dry matter)	0.11	0.14	0.09	0.12	0.18	0.11	0.16	0.18	0.17	0.16	0.16	0.10	0.09	0.13	0.08	0.08
<i>Van Soest fractions</i>																
Cellulose (CVS) (% dry matter)	39.2	36.8	39.3	38.0	37.3	41.3	43.1	41.3	43.8	43.1	38.9	41.9	44.7	42.9	43.5	40.9
Hemicellulose (HVS) (% dry matter)	37.0	33.8	38.1	39.1	35.2	37.5	34.8	38.1	37.8	36.8	36.7	35.2	33.7	35.3	32.5	34.3
Lignin (LVS) (% dry matter)	7.7	10.0	9.4	7.7	6.3	4.9	5.9	5.5	4.4	4.5	5.1	6.3	6.9	6.6	6.8	6.4

Table 1. Suite

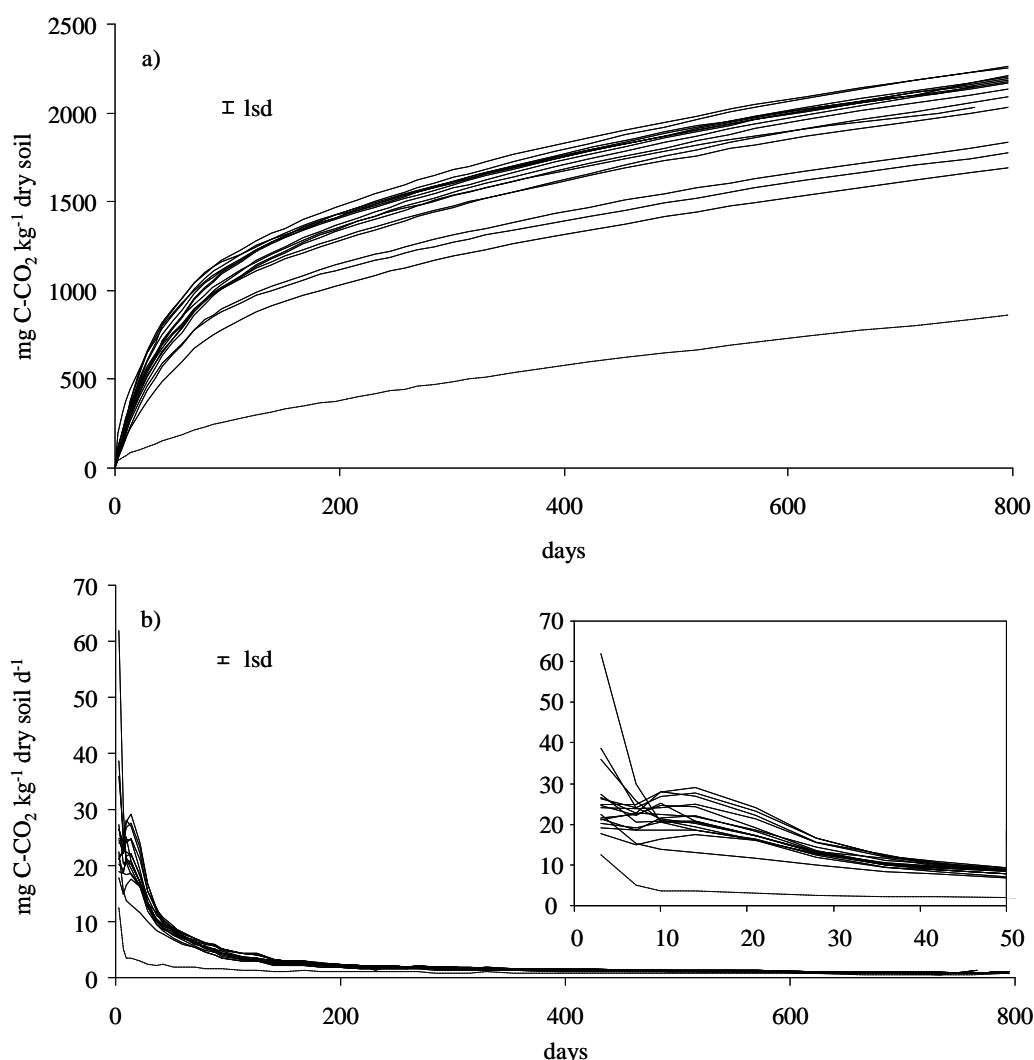
	F2	F2 bm1	F2 bm2	F2 bm3	F2 bm4	F292	F292 bm1	F292 bm2	F292 bm3	F292 bm4	F7026 bm3* F2bm3	Mexxal	Anjou 285	Anjou 258	Col- ombus	Man- fusa
Corresponding number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>Polysaccharides composition</i>																
Glucose (% dry matter)	31.3	30.7	35.0	33.3	31.3	34.3	37.9	39.7	39.8	37.9	36.3	36.9	41.1	39.4	37.6	36.3
Xylose (% dry matter)	18.5	17.9	20.3	20.3	19.6	19.1	20.9	20.8	21.2	20.5	19.6	19.3	20.5	19.6	19.6	19.5
Arabinose (% dry matter)	3.5	3.6	4.4	4.1	3.2	3.8	3.5	4.1	4.1	3.6	3.9	3.4	3.5	3.6	3.5	3.5
A/X ratio	0.19	0.20	0.21	0.20	0.16	0.20	0.17	0.20	0.19	0.18	0.20	0.18	0.17	0.18	0.18	0.18
Galactose (% dry matter)	1.0	1.2	1.3	1.3	0.9	1.1	1.0	1.1	1.0	0.9	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1
Galacturonic acid (% dry matter)	0.3	0.4	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.8	1.0	0.7	0.8	0.4	0.9	0.4	0.4	0.3
Glucuronic acid (% dry matter)	0.2	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
<i>Lignin fraction</i>																
Klason lignin (KL) (% dry matter)	17.6	19.2	19.4	19.1	17.0	15.6	15.9	16.3	15.8	16.0	15.2	16.3	16.9	17.1	16.9	16.7
S unit ( $\mu\text{mol/g NDF}$ )	90.5	51.2	53.3	25.1	62.1	58.2	31.5	60.6	28.1	63.8	41.8	76.9	65.4	68.4	82.6	73.5
G unit ( $\mu\text{mol/g NDF}$ )	50.9	46.9	31.3	46.5	44.2	44.9	21.2	32.3	43.2	42.2	44.8	46.8	52.1	49.8	54.2	48.3
S/G ratio	1.78	1.09	1.70	0.54	1.40	1.32	1.52	1.88	0.66	1.51	0.94	1.65	1.26	1.38	1.52	1.53
Uncondensed lignin (% KL)	13.5	8.2	7.6	6.4	9.8	11.1	5.5	9.7	7.8	11.2	9.2	12.7	11.8	11.7	13.4	11.9
<i>Phenolic acids</i>																
Esterified PCA (% NDF)	2.8	1.7	2.2	1.8	2.9	2.6	1.6	2.6	1.9	2.8	2.4	3.6	2.7	3.0	2.8	3.5
Esterified FA (% NDF)	0.7	0.5	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7	0.8	0.8	0.6	0.8	0.7
Etherified FA (% NDF)	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3
<i>Total polyphenols</i>																
Polyphenols (% dry matter)	1.2	2.2	1.2	1.2	1.2	0.9	0.9	0.7	1.0	0.7	0.9	0.8	0.9	0.9	0.8	1.0



**Figure 1:** Relationships between a) the cellulose Van Soest and the glucose contents, b) the hemicellulose Van Soest and the sum of (galactose + arabinose + xylose) contents, and c) the lignin Van Soest and the Klason lignin contents. Data are mean (n=2). Genotypes were identified by numbers 1 to 16.

### 3.2. Carbon mineralization

The mineralization of maize roots varied markedly amongst genotypes (Figure 2a). At the end of the incubation (796 days), the total amounts of mineralized C were significantly smaller in F2bm1 ( $41.6 \pm 2.2\%$  of added C) than in Manfusa ( $70.1 \pm 1.9\%$  of added C) ( $P \leq 0.05$ ) (Table 2). The observed differences in cumulative mineralized C over the entire incubation period resulted mainly from differences in the rates of C mineralization during the first 40 days (Figure 2b). It is noteworthy to mention that the rate of C mineralization was significantly smaller for F2bm1 than for Manfusa over the whole incubation period ( $P \leq 0.05$ ) (Figure 2b).



**Figure 2:** Cumulative amounts (a) and rates (b) of carbon mineralization in soil without maize roots (in dotted lines) and after addition of maize root (in full lines). Data are means of 4 incubation replicates.

**Table 2:** Cumulative C mineralization of maize roots decomposed after 796 days. Data are means of 4 incubation replicates. Means not sharing a common letter are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

	F2	F2 bm1	F2 bm2	F2 bm3	F2 bm4	F292	F292 bm1	F292 bm2	F292 bm3	F292 bm4	F7026b m3* F2bm3	Mexxal	Anjou 285	Anjou 258	Colom- bus	Man- fusa	lsd
Corresponding number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Cumulative mineralized C (% of added C)	58.5 c	41.6 a	45.9 b	48.8 b	65.8 de	66.5 de	61.4 cd	67.2 e	69.9 e	66.1 de	60.1 c	67.5 e	65.4 de	63.9 d	66.6 de	70.1 e	3.23

### 3.3. Correlation between C mineralization and initial maize root chemistry

Simple correlation was performed to further establish the relationships between the cumulative amounts of mineralized C at different steps of decomposition and the initial chemical characteristics of maize roots. All data are given on Table 3.

On the short term, the amounts of C-CO<sub>2</sub> were positively correlated with the soluble fraction (soluble Van Soest, soluble C at 20°C and 100°C, but not with soluble N) over the first 10 days, and particularly highly correlated with the soluble C at 20°C at day 3 ( $P \leq 0.001$ ). Thus, the amounts of C-CO<sub>2</sub> were slightly but significantly negatively correlated with arabinose between days 3 and 7, the A/X ratio between days 7 and 14 and the KL/Soluble ratio between days 3 and 14 ( $P \leq 0.05$ ). They were also negatively correlated with galactose during the whole incubation period.

On the medium to long term, there was a negative relationship between the C mineralized and the LVS/Soluble ratio from day 10 until day 796, and as expected the effect of lignin fractions on C mineralized became important. The amounts of mineralized C were strongly negatively correlated with the lignin fraction (LVS and KL) and their corresponding ratios (LVS/CVS, LVS/HVS, KL/AX and LVS/(LVS+CVS+HVS)) between days 14 and 796, and with the KL/glucose ratio from day 21. The correlation coefficients ( $r$ ) were generally higher when LVS, rather than KL, was used. The LVS/CVS ratio was the quality criteria the most strongly negatively correlated with C mineralization over the 152-796 day period. Mineralized C correlated also negatively with polyphenols from day 21 onwards.

Regarding root N, mineralization was negatively correlated with %N from day 59. Conversely, from day 112, there were positive relationships between cumulative C-CO<sub>2</sub> and the roots C/N ratio, the glucose/N ratio and ester PCA. They were also positively correlated with the KL/N and the (POL+LVS)/N ratios from days 196 and 302, respectively.

The cumulative amounts of mineralized C were positively correlated with CVS, ester FA and still with the A/X ratio between days 152 and 796. They were negatively correlated with ether-linked FA only between days 519 and 796.

At the end of the incubation (over the 766-796 day period), we found no significant relationship between the rates of C mineralization and the chemical characteristics of maize roots before decomposition, despite significant differences in the rates of C mineralization observed during this period amongst genotypes ( $0.19 \pm 0.04$  mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> for F2bm1 to  $0.35 \pm 0.03$  mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> for Columbus) ( $P \leq 0.05$ ) (data not shown).

**Table 3:** Correlation coefficient (*r*) between maize root residues variables and cumulative C mineralized.

	3	7	10	14	21	28	36	59	112	152	196	302	519	796
	Cumulative C mineralized (days)													
C	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	-0.528*	-0.590*	-0.643**	-0.680**	-0.693**	-0.680**	-0.690**	-0.687**
N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.511*	-0.681**	-0.748***	-0.777***	-0.794***	-0.825***	-0.853***
C/N ratio	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.501*	+0.583*	+0.621*	+0.647**	+0.686**	+0.727**
Soluble VS	+0.639**	+0.557*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Soluble C 20°C	+0.748 ***	+0.677**	+0.595*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Soluble C 100°C	ns	+0.507*	+0.517*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Soluble N 20°C	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Soluble N 100°C	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CVS	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.520*	+0.545*	+0.575*	+0.622*	+0.656**
Glucose	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.503*	+0.522*	+0.557*	+0.579*
Glucose/N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.510*	+0.589*	+0.626**	+0.654**	+0.694**	+0.734**
Arabinose	-0.540*	-0.505*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Xylose	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HVS	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Arabinoxylane (AX)	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A/X ratio	ns	-0.504*	-0.525*	-0.518*	ns	ns	ns	ns	ns	-0.506*	-0.530*	-0.553*	-0.584*	-0.610*
galactose	-0.511*	-0.618*	-0.712**	-0.773***	-0.752***	-0.720**	-0.706**	-0.709**	-0.727**	-0.721**	-0.717**	-0.736**	-0.742***	-0.716**
galacturonic acid	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
glucuronic acid	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\*, \*\*, \*\*\* Significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively; “ns” means not significant.

Table 3. Suite

	3	7	10	14	21	28	36	59	112	152	196	302	519	796
	Cumulative C mineralized (days)													
LVS	ns	Ns	ns	-0.656**	-0.785***	-0.824***	-0.852***	-0.895***	-0.894***	-0.887***	-0.874***	-0.872***	-0.870***	-0.835***
KL	ns	Ns	ns	-0.639**	-0.730**	-0.754***	-0.775***	-0.819***	-0.849***	-0.860***	-0.856***	-0.853***	-0.859***	-0.836***
LVS/N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
KL/N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.504*	+0.532*	+0.574*	+0.623**
LVS/Soluble	ns	Ns	-0.585*	-0.679**	-0.710**	-0.713**	-0.729**	-0.777***	-0.806***	-0.804***	-0.796***	-0.796***	-0.792***	-0.754***
KL/Soluble	-0.526*	-0.552*	-0.571*	-0.522*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LVS/CVS	ns	Ns	ns	-0.606*	-0.749***	-0.793***	-0.821***	-0.862***	-0.886***	-0.891***	-0.886***	-0.890***	-0.898***	-0.876***
KL/glucose	ns	Ns	ns	ns	-0.554*	-0.607*	-0.637**	-0.681**	-0.732**	-0.761***	-0.769***	-0.777***	-0.802***	-0.804***
LVS/HVS	ns	Ns	ns	-0.631**	-0.775***	-0.823***	-0.853***	-0.889***	-0.854***	-0.833***	-0.811***	-0.800***	-0.788***	-0.746***
KL/AX	ns	Ns	ns	-0.549*	-0.708**	-0.759***	-0.788***	-0.819***	-0.793***	-0.786***	-0.773***	-0.771***	-0.778***	-0.755***
LVS/(LVS+CVS+HVS)	ns	Ns	ns	-0.619*	-0.768***	-0.815***	-0.845***	-0.885***	-0.880***	-0.873***	-0.860***	-0.857***	-0.856***	-0.824***
S	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
G	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S/G ratio	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Non-condensed lignin	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Polyphenols	ns	Ns	ns	ns	-0.607*	-0.649**	-0.670**	-0.706**	-0.762***	-0.782***	-0.784***	-0.781***	-0.796***	-0.800***
POL/N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(POL+LVS)/N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
(POL+KL)/N	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.518*	+0.559*	+0.609*
Esterified FA	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.544*	+0.572*	+0.574*	+0.554*	+0.558*
Etherified FA	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.528*	-0.565
Esterified PCA	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	+0.543*	+0.594*	+0.617*	+0.600*	+0.590*	+0.606*

\*, \*\*, \*\*\* Significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels, respectively; “ns” means not significant.



### 3.4. Relationships between C mineralization and initial maize root chemistry

A multiple-regression analysis was attempted to explain more comprehensively the variations of the C mineralization kinetics observed among the 16 genotypes of maize roots. When using all chemical characteristics as explanatory variates, the best-fitting regression equation included the LVS/CVS ratio, ester PCA and HVS according to the following equation ( $p < 0.001$ , residual standard error RSE = 52.4):

#### Equation 1:

Cumulative C-CO<sub>2</sub> at day 796 =

$$2001 - 2981 * \text{LVS/CVS} + 95.1 * \text{ester PCA} - 15.06 * \text{HVS}$$

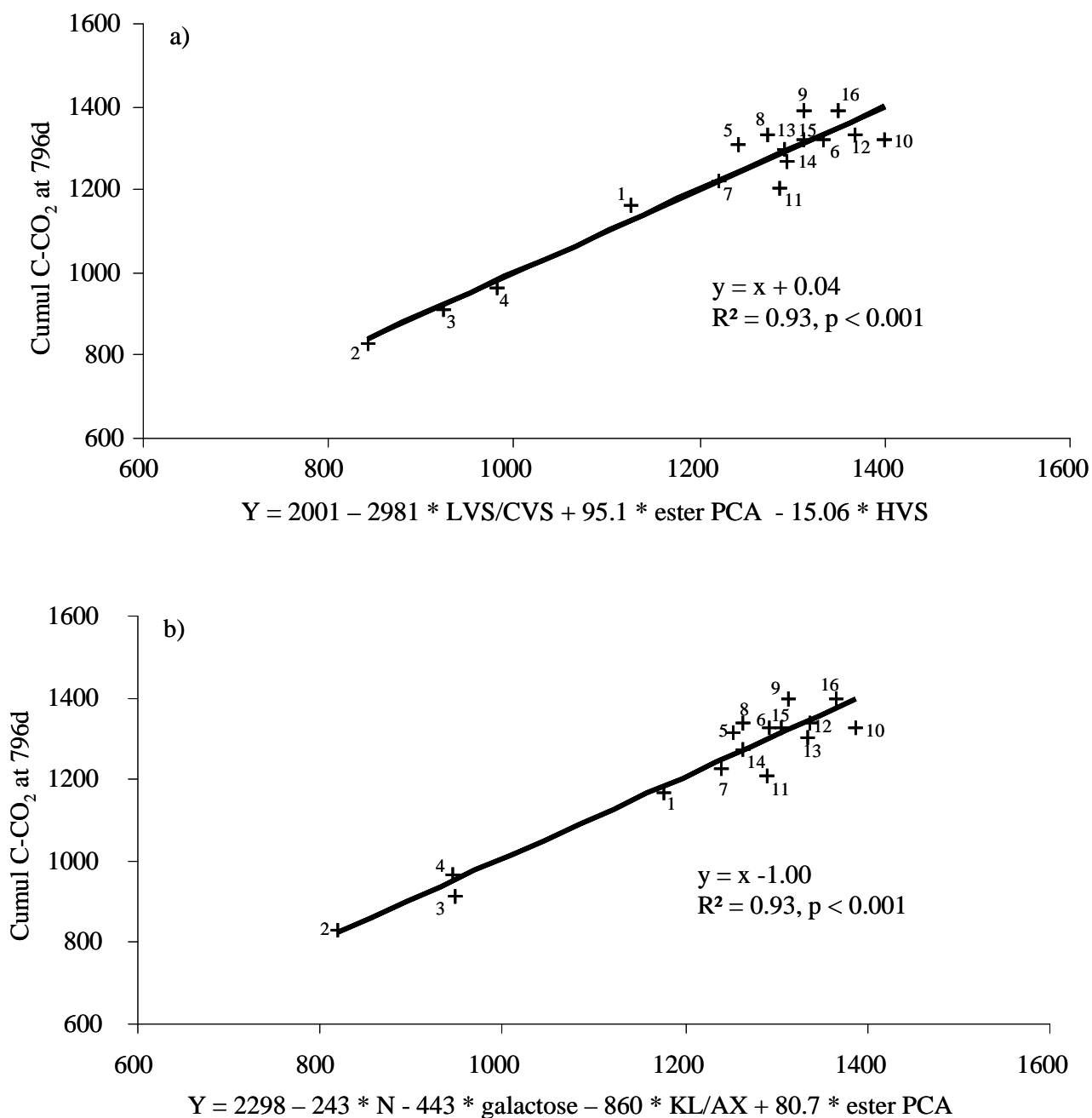
This three-variates-based equation accounted for 93% of the observed cumulative amounts of C-CO<sub>2</sub> (Figure 3a). When using all chemical characteristics, after excluding the Van Soest fractions data, the best-fitting regression equation included the KL/AX ratio and N, galactose and ester PCA according to the following equation ( $p < 0.001$ , residual standard error RSE = 52.5):

#### Equation 2:

Cumulative C-CO<sub>2</sub> at day 796 =

$$2298 - 243 * \text{N} - 443 * \text{Galactose} - 860 * \text{KL/AX} + 80.7 * \text{ester PCA}$$

This equation allowed to significantly explaining 93% of the observed cumulative amounts of C-CO<sub>2</sub> mineralized (Figure 3b), as the equation 1. Equations 1 and 2 were also highly and significantly correlated with the cumulative amounts of C-CO<sub>2</sub> evolved from days 36 and 21 respectively, until day 796 ( $p < 0.001$ ), with correlation coefficients  $R^2 > 0.80$  from day 112, for both equations (Table 4).



**Figure 3:** Relationships between the cumulative amounts of C mineralized after 796 days (in mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> dry soil) and the equations of the multiple-regression model (a) including or (b) excluding the Van Soest fractions. Genotypes were identified by numbers 1 to 16.

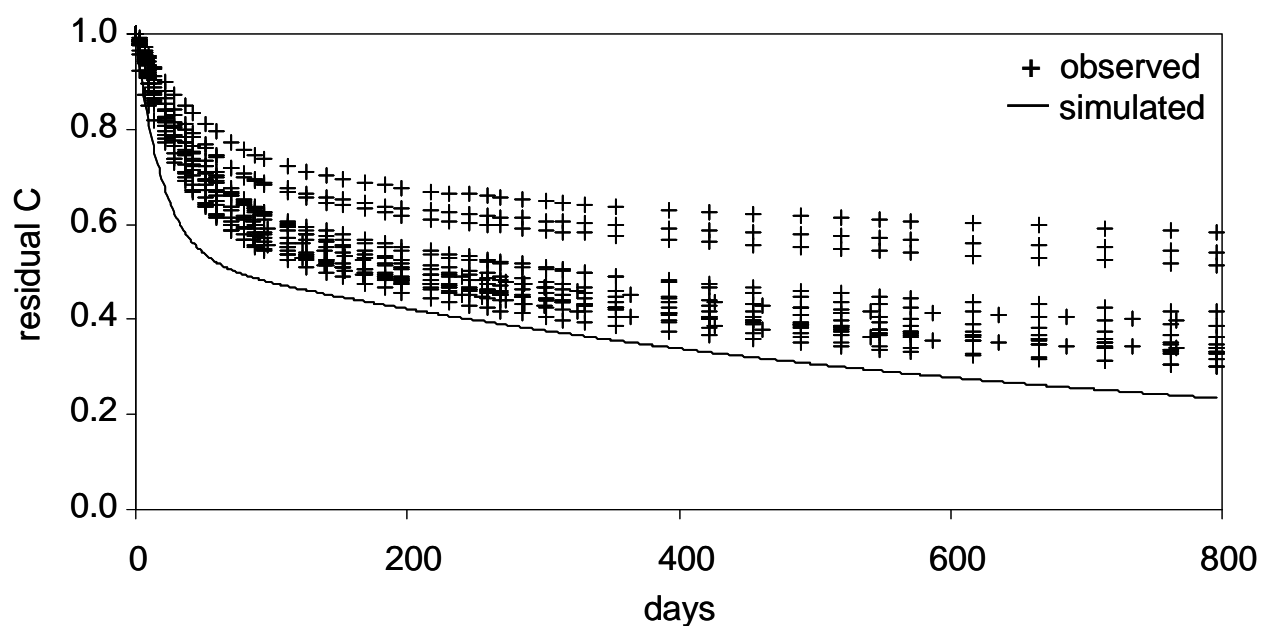
Table 4: Coefficient of correlation ( $R^2$ ) between equations 1 and 2 (described in the text) and the cumulative amounts of C mineralized at different time of decomposition.

Cumulative C mineralized (days)	3	7	10	14	21	28	36	59	112	152	196	302	519	796
Equation 1	0.04	0.11	0.24	0.40**	0.52**	0.54**	0.57***	0.65***	0.82***	0.89***	0.91***	0.91***	0.94***	0.93***
Equation 2	0.07	0.16	0.30*	0.47**	0.56***	0.57***	0.59***	0.65***	0.82***	0.88***	0.90***	0.92***	0.94***	0.93***

\*, \*\*, \*\*\* Significant at the 0.05, 0.01 and 0.001 probability levels

### 3.5. Simulation of root-C mineralization with RothC

When standard parameters of the RothC model were used, particularly using the DPM/RPM default ratio of 1.44, the model systematically overestimated the measured amounts of C mineralized (Figure 4). These results showed that the 1.44 value for DPM/RPM ratio, where the DPM and RPM compartments represent 59% and 41% of root-C respectively, was not appropriate to estimate C mineralization from maize roots.



**Figure 4:** Simulation of C mineralization of maize roots with the Roth-C model, using the initial DPM to RPM ratio of 1.44.

The DPM/RPM ratio was optimized for each genotype by minimizing the sum of squared differences between observed and simulated C-CO<sub>2</sub>. Generally speaking, the optimized DPM/RPM ratios allowed to improve the simulation for all genotypes, expected for F2, F2bm1, F2bm2, and F2bm3 (Figure 5). However, the model tended to systematically overestimate the C mineralization after 600 days of decomposition. The optimized DPM/RPM ratio ranged from 0.126 for F2bm1 (the least decomposed) to 0.949 for F292bm3 (one of the more decomposed) (Figure 5). As all optimized DPM/RPM ratios were < 1, these results indicate that the model characterize roots chemical characteristics by a RPM compartment size > DPM compartment size. Indeed the RPM compartment represented 51% to 89% of root-C, and the DPM compartment 49% to 11% of root-C (Table 5), with the more recalcitrant roots to decomposition being characterized by the highest RPM compartment (F2bm1).

Our dataset of chemical characteristics and optimized DPM/RPM were then used to model a DPM/RPM ratio for maize roots. The best-fitting regression equation was obtained by including LVS, ester PCA, galactose and arabinose according to the following equation ( $p < 0.001$ , residual standard error RSE = 0.0788):

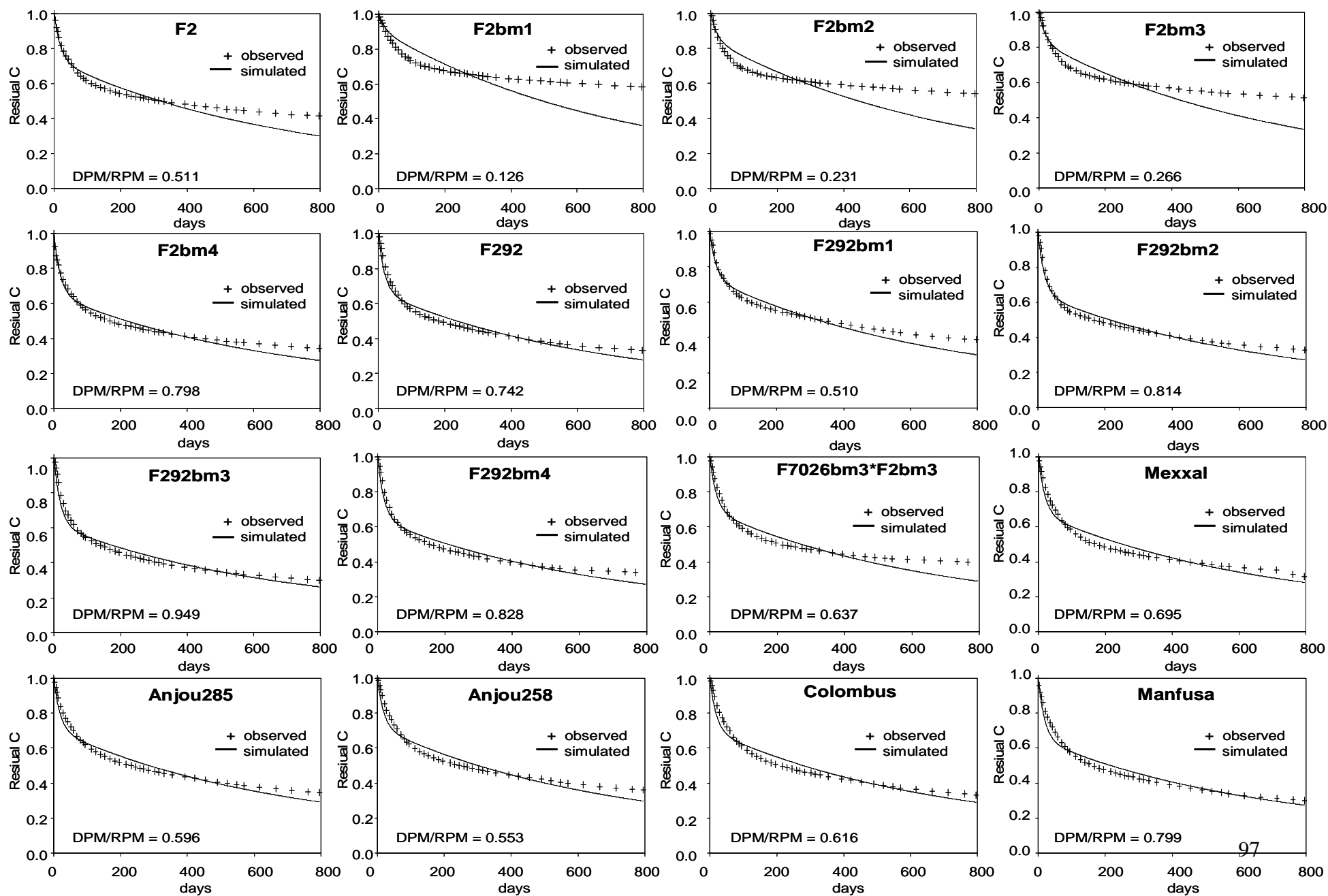
**Equation 3:**

DPM/RPM =

$$0.834 - 0.0716 * \text{LVS} + 0.1527 * \text{ester PCA} - 0.892 * \text{Galactose} + 0.217 * \text{Arabinose}$$

This equation allowed to significantly explaining 92% of the optimized DPM/RPM ratio variations (Figure 6). These calculated DPM/RPM ratios were tested by running again the RothC model against the cumulative C mineralization data over 0-796 day period. The simulated C-CO<sub>2</sub> were highly and significantly correlated with the cumulative C mineralization from day 14 to day 796 ( $p < 0.001$ ), and the coefficient of correlation ( $R^2$ ) was > 0.80 from day 36 (Table 6).

**Figure 5:** Simulation of C mineralization of maize roots with the Roth-C model. Only the parameter DPM/RPM was optimized.



**Table 5:** Characterization of chemical maize root properties in Roth-C. Values of Decomposable Plant Material (DPM) and Resistant Plant Material (RPM) are obtained by optimization on experimental data of C mineralization of the 16 genotypes.

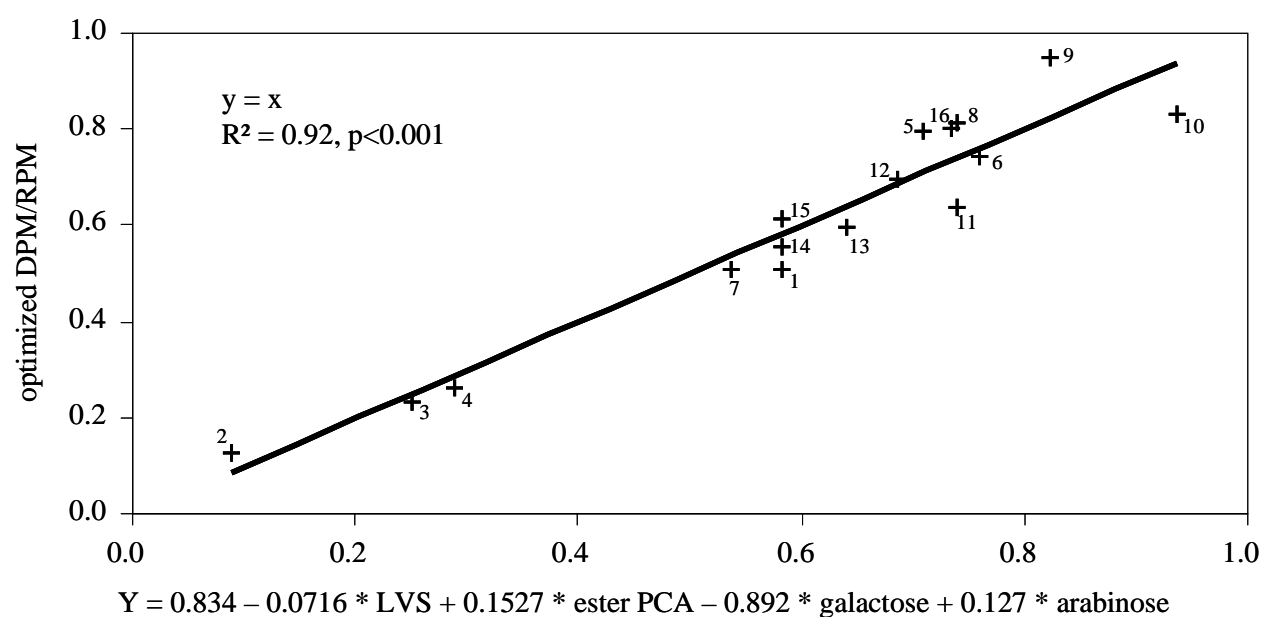
	F2	F2 bm1	F2 bm2	F2 bm3	F2 bm4	F292	F292 bm1	F292 bm2	F292 bm3	F292 bm4	F7026 bm3* F2bm3	Mexxal	Anjou 285	Anjou 258	Col- ombus	Man- fusa
Corresponding number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DPM (%)	34	11	19	21	44	43	34	45	49	45	39	41	37	36	38	44
RPM (%)	66	89	81	79	56	57	66	55	51	55	61	59	63	64	62	56

**Table 6**

Coefficient of determination ( $R^2$ ) between equation 3 (described in the text) and the cumulative amounts of C mineralized at different time of decomposition.

Cumulative C mineralized (days)	3	7	10	14	21	28	36	59	112	152	196	302	519	796
Equation 3	0.10	0.23	0.40**	0.62***	0.76***	0.78***	0.81***	0.88***	0.94***	0.94***	0.93***	0.92***	0.90***	0.84***

\*\* , \*\*\* Significant at the 0.01 and 0.001 probability levels



**Figure 6**

Estimation of the parameter DPM/RPM from chemical maize root characteristics. Genotypes were identified by numbers 1 to 16.

#### 4. Discussion

To determine the role of residues chemical quality on their decomposition in soils, most of the studies had used different types of crop residues (species, plant parts). Both the chemical variations and the differences in residue anatomy were found to be important factors influencing the decomposition process (Akin, 1989). Indeed, plant parts contain different types of tissues and the characteristics of the cell walls depend on the cell types and function of plant tissues. In this study, the brown-midrib mutants of maize, repeatedly used as important models in digestibility studies (Lam et al., 1994, Barrière et al., 2004; Grabber et al., 2004), as well as maize hybrids, are powerful tools to better understand the role of the chemical characteristics in the decomposition process. This plant material does not combine structural and chemical variations related to residue anatomy because the same tissue types are present. Consequently, the variations observed in the C mineralization kinetics can be unambiguously related to differences in root chemical characteristics.



#### 4.1. *Effect of root chemical features in C mineralization*

This study aimed at better characterizing the relationships between C mineralization kinetics and the chemical characteristics of plant residues, focusing especially on maize roots. It completes a previous study performed on 4 genotypes of maize roots over 112 days of incubation which concluded that the KL/glucose, KL/AX, and A/X ratios were good chemical indicators of C mineralization kinetics for these maize roots (see chapter 3, Machinet et al., 2009, accepted). The present study used a wider range of root quality (obtained with 16 genotypes) and confirms that the initial KL/glucose and KL/AX ratios, and to a lesser extent the A/X ratio, were strongly correlated with the cumulative amounts of mineralized C on the longer term (800 days). By using simple correlation method, we also show that C mineralization was highly correlated with the soluble fraction at the beginning of decomposition, as previously shown (e.g. Trinsoutrot et al., 2000).

Our results confirm also the well-known negative relationship between plant residues decomposition and the lignin content (measured by the Van Soest method (LVS) or by the Klason method (KL)). The differences in the results of the two methods agree well with previous studies (Bertrand et al., 2006). These differences result from the fact that the acid detergent used in the Van Soest method solubilised some of the lignin (Monties, 1984; Hatfield et al., 1994). From the comparison with the Klason lignin, we deduce that the amount of material lignin lost ranged from 48% to 72% of the KL (Table 1). However, the Van Soest method provides directly the quantification of a lignin fraction having a higher degree of recalcitrance compared to the lignin quantified by the Klason method. This could explain why the LVS fraction was better correlated with cumulative amount of mineralized C than KL fraction.

The negative correlation of cumulative C-CO<sub>2</sub> obtained with the galactose contents was in contradiction with several studies suggesting an immediate degradation of galactan after crop residues incorporation in soils (Berg and McClaugherty, 2003; Lemma et al., 2007). Our results suggest that galactose, yet in low level in maize roots, is rather involved in the formation of a complex network within the cell wall that is recalcitrant to decomposition. Indeed, galactose occurs in pectic polysaccharides as rhamnogalacturonan which are characteristic of the middle lamella and primary wall of dicotyledonous plants, and to a lesser extent of monocotyledonous plants (Brett and Waldron, 1996; Harris and Smith, 2006).

We used the multiple-regression analyse to improve our understanding of the role of the chemical quality in the decomposition process. Our results showed that the interactions

existing between cell wall polymers are of primary importance and could improve the prediction of the residue decomposition in soils. When all chemical characteristics were considered, the best regression model was obtained by using a combination of three chemical variates to significantly account for 93% of the variation in cumulative C mineralization (Equation 1). The three retained variates were the LVS/CVS ratio, the esterified PCA and the HVS. The negative impact of LVS/CVS ratio may reflect a restricted access of cellulose towards hydrolytic bioconversion owing to the cohesive cell-wall network, which has been shown to influence biodegradation rates (Chesson, 1988). After the early period of residue decomposition where free or non-protected cellulose is decomposed, the remaining cellulose is physically shielded by lignin encrustations forming the lignin-carbohydrate matrix of plant cell walls (Chesson, 1997). Consequently the remaining cellulose cannot be decomposed independently of lignin, and residue decomposition becomes limited by the decomposition rate of lignin (McClaugherty and Berg, 1987; Adair et al., 2008). Despite their relative small level in cell walls (less than 4% of dry matter), the phenolic acids (PCA and FA) play a key role in the organization of cell walls, resulting in less degradable walls (Hatfield et al., 1999 ; Bertrand et al., 2006). Notably, FA could be esterified to hemicelluloses and associated with the lignin moiety (Grabber et al., 2004). Ferulic was also reported to esterify galactose in pectin (Brett and Waldron, 1996). However, our study showed positive relationships between cumulative amounts of mineralized C and the ester-PCA and ester-FA contents. This could be explained by the fact that ester-PCA would be linked to the S units in root-lignins which are sensitive to decomposition, as suggested by Bertrand et al. (2006).

It is worthy to note that F2bm1, F2bm2 and F2bm3, which were distinguished in terms of chemical composition (mainly cell wall polysaccharides and lignin) and C mineralization (the least decomposed genotypes), strongly influenced the multiple-regression analysis compared with the other genotypes and were determinant for the quality of prediction. A multiple-regression analysis performed on all genotypes without F2bm1, F2bm2 and F2bm3 gave similar results: any other chemical criterion determined the decomposition and the quality of prediction was lower (data not shown).

When the Van Soest fractions, which partially recovered the other chemical factors, were not taken into account, the best regression model was obtained by using a combination of four chemical variates (Equation 2) which present similarities with the equation 1. The four retained variates are the KL/AX ratio, the esterified PCA, the galactose and the N contents. The KL/AX ratio may reflect the association of lignin and cell wall polysaccharides as the LVS/CVS ratio does. Galactose reflects the HVS fraction of the equation 1. The additional

variate in equation 2 is residue N content. In our study, results obtained by simple correlation as well as by multiple-regression clearly showed that N was inversely related to the cumulative amount of mineralized C. In other words, higher the root N content was lower was C mineralization. This seems in contradiction with most studies showing a positive influence of crop residue N content on residue decomposition (e.g. Frankenberger and Abdelmagid, 1985; Trinsoutrot et al., 2000). However, this is only true if the residue N content is an indirect consequence of plant type or plant maturity, or when N availability limits the activity of decomposers (Henriksen and Breland, 1999). Sall et al. (2007) showed that in non-limiting conditions of N availability, residue N content did not influence C decomposition. We showed (see chapter 2, Machinet et al., submitted), that root-N content may not only depend on N nutrition of the plant during growth, but also on the presence of colonizing microorganisms in the roots prior to any decomposition in soil. We demonstrated earlier that the most colonized roots were enriched in N and impoverished in cell wall polysaccharides and were subsequently decomposed in soils to a lower extent compared with non-colonized roots. Therefore, the measured root N content included partly microbial N associated to the presence of colonizing microorganisms, i.e. root N was not entirely plant N. Thus, we suggest that colonizing microorganisms partly degraded root-C (as cell wall polysaccharides) before decomposition in soil, resulting in more recalcitrant roots to decomposition. That could explain the negative relationship found between the initial N content and C mineralization. Assuming that the difference in N content between F2bm1 (the less decomposed) and Mexxal (the most decomposed) was due to microbial N, we estimate that, in F2bm1, 62% of N would be derived from colonizing microorganisms rather than from the plant roots. When the multiple-regression model was performed with a corrected N content excluding microbial-derived N, N did not appear in the equation anymore. Consequently in the case of roots, N appears not to be an explanatory variate of decomposition, which confirms previous findings (e.g. Bertrand et al., 2006; Sall et al., 2007).

#### 4.2. Simulation of root-C mineralization

We found that the standard parameterization of the RothC model was not adapted to simulate the C mineralization from maize root residues. The DPM/RPM default value of 1.44 for crop residue, which means a constant partitioning of organic C as easily decomposable (DPM= 59%) and recalcitrant fraction (RPM= 41%) whatever the crop residue, overestimates the C mineralization rates for all the root genotypes studied. After optimization we found that the DPM/RPM ratios were much lower, i.e. that the recalcitrant fraction (RPM) was higher in roots than in shoots or leaves, as it was previously shown by Coppens (2005). The mean value obtained from optimized DPM/RPM ratios are  $0.6 \pm 0.2$ , which is also identical to the ratio attributed to forest litter in the standard parameterization of the RothC model (DPM to RPM ratio = 0.6) (Coleman and Jenkinson, 1996). However, we found that it is difficult to consider using a single mean value of DPM/RPM to describe the chemical quality of root residues in the RothC model. Indeed, the distribution of root-C in the DPM compartment according to genotypes, varied by a factor 4.5 between F2bm1 (the least decomposed root) and F292bm3 (one of the most decomposed roots). Our investigation of root chemical properties allows us to attempt modelling the RothC quality parameter DPM/RPM ratio (equation 3). The four retained variates were LVS, esterified PCA, galactose and arabinose contents. These characteristics confirmed that hemicelluloses are made of fractions having specific behaviour with regard to biodegradation. Even if this model should be tested independently on other data sets, it allows already us to enlighten what residue C compartments could reflect the simple decomposable and recalcitrant C pools of the RothC model. The RothC model however, has the vocation to be easily usable and its parameterization cannot be based on such complex chemical characterization of crop residues. This implies that the model for calculating RPM/DPM according to residue quality should be much simpler. For example, if the Lignin Van Soest (LVS) is only considered, the regression equation would become  $DPM/RPM = 1.455 - 0.1303 * LVS$  ( $p < 0.001$ , residual standard error RSE = 0.113). This single-variate based equation still accounts for 78% of the variation in optimized DPM/RPM ratios.

## 5. Conclusions

The 16 maize root genotypes used presented significant variations in terms of chemical characteristics that translated into large differences in kinetics and cumulative C mineralization during their decomposition. This material was therefore very suitable for investigating relationships between quality and decomposition. The detailed analysis of chemical composition by different methods evidenced the role of soluble C on the short term, lignin fraction of the longer term, but also the importance of the intimate associations between the lignin fraction and cell wall polysaccharides in a cohesive network. The positive role of esterified PCA was shown by regression analysis, thereby providing improvement of the prediction of residue decomposition in soils despite its negligible quantitative importance in root tissues. However etherified ferulic acids were negatively correlated with C mineralization on long term, showing the complexity of interactions between phenolic acids, cell wall structure and C mineralization. Optimization and regression procedures with RothC allowed us to parameterize the Resistant (RPM) and Decomposable (DPM) fractions of maize roots considered by this model.

## Acknowledgements

This study was financially supported by the région Champagne-Ardenne and INRA. The authors wish to thank G. Alavoine, D. Crônier, M.J. Herre and S. Millon for their technical assistance and Y. Barrière for providing the plant material.

## References

- Abiven, S., Recous, S., Reyes, V., Oliver, R., 2005. Mineralization of C and N from root, stem and leaf-residues in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of Soils* 42, 119-128.
- Adair, E.C., Parton, W.J., Del Grosso, S.J., Silver, W.L., Harmon, M.E., Hall, S.A., Burke, I.C., Hart, S.C., 2008. Simple three-pool model accurately describes patterns of long-term litter decomposition in diverse climates. *Global Change Biology* 14, 2636-3660.
- Akin, D.E., 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal* 81, 17-25.

- Balesdent, J., 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *European Journal of Soil Science* 47, 485-493.
- Barcelona, M.J., 1984. TOC determinations in ground water. *Ground Water* 22, 18-24.
- Barrière, Y., Ralph, J., Méchin, V., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Argillier, O., Chabbert, B., Lapiere, C., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Comptes Rendus Biologies* 327, 847-860.
- Beaugrand, J., Crônier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P., Chabbert, B., 2004. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7108-7117.
- Berg, B., McClaugherty, C., 2003. *Plant litter: Decomposition, humus formation, carbon sequestration*. Springer, Berlin.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil* 281, 291-307.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291-299.
- Brett, C.T., Waldron, K.W., 1996. In: *Physiology and biochemistry of plant cell walls*, (second edition), pp. 255, Chapman & Hall, London.
- Camiré, C., Côté, B., Brulotte, S., 1991. Decomposition of roots of black alder and hybrid poplar in short-rotation plantings : Nitrogen and lignin control. *Plant and Soil* 138: 123-132.
- Carrera, A.L., Bertiller, M.B., Larreguy, C., 2008. Leaf litterfall, fine-root production, and decomposition in shrublands with different canopy structure induced by grazing in the Patagonian Monte, Argentina. *Plant Soil* 311, 39-50.
- Chaussod, R., Nicolardot, B., Catroux, G., 1986. Mesure en routine de la biomasse des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol* 2, 201-211.
- Chesson, A., 1988. Lignin-polysaccharides complexes of the plant cell wall and their effect on microbial degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21, 219-228.
- Chesson, A., 1997. Plant degradation by ruminants: parallels with litter decomposition in soils. In: *Driven by Nature, Plant litter quality and decomposition*, Caddish, G. and Giller, K.E. (Ed). CAB International, Wallingford, UK, pp. 47-66.
- Coleman, K., Jenkinson, D.S., 1996. A model of turnover of carbon in soil. In: *Powelson D.S. et al. (Eds.) Evaluation of soil organic matter models using existing, long term datasets*. Springer, Berlin, pp. 237-246.

- Constantinides, M., Fownes, J.H., 1994. Nitrogen mineralization from leaves and litter of tropical plants: relationship to nitrogen, lignin and soluble polyphenol concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 49-55.
- Coppens, F., (2005). Water, carbon and nitrogen dynamics in soil. Influence of crop residue location and quality. Thèse de doctorat, pp. 203.
- Diels, J., Vanlauwe, B., Van der Meersch, M.K., Sanginga, N., Merckx, R., 2004. Long-term soil organic carbon dynamics in a subhumid tropical climate: <sup>13</sup>C data in mixed C3/C4 cropping and modelling with RothC. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1739-1750.
- Folin, O., Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 73, 627-649.
- Frankenberger, W.T., Abdelmagid, H.M., 1985. Kinetic parameters of nitrogen mineralization rates of leguminous crop incorporated into soil. *Plant Soil* 87, 257-271.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analysis. US Government Printing Office, Washington, DC Agriculture Handbook No. 379, USDA-ARS.
- Grabber, J. H., Ralph, J., Lapierre, C., Barrière, Y., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies* 327, 455-465.
- Gunnarsson, S., Marstorp, H., Dalhin, A.S., Witter, E., 2008. Influence of non-cellulose structural carbohydrate composition on plant material decomposition in soil. *Biology and Fertility of Soils* 45, 27-36.
- Harris, P. J., Smith, B. G., 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 129-143.
- Hatfield, R.D., Jung, H.J.G., Ralph, J., Buxton, D.R., Weimer, P., 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and Acid detergent lignin procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, 51-58.
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1999. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Science* 39, 27-37.
- Heal, O.W., Anderson, J.M., Swift, M.J., 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. In: Caddish, G., Giller, K.E. (Eds.) *Driven by nature. Plant litter quality and decomposition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-30.
- Henriksen, T.M., Breland, T.A., 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1121-1134.

- Herman, W.A., McGill, W.B., Dormaar, J.F., 1977. Effects of initial chemical composition on decomposition of roots of three grass species. *Canadian Journal of Soil Science* 57, 205-215.
- Kamphake, L.J., Hannah, S.A., Cohen, J.M., 1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research* 1, 205-216.
- Krom, M.D., 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst* 105, 305-316.
- Lam, T. B. T., Iiyama, K., Stone, B.A., 1996. Lignin and hydroxycinnamic acids in walls of brown midrib mutants of Sorghum, pearl millet and maize stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 174-178.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, R., 1986. Thioacidolysis of poplar lignins : Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung* 40, 113-119.
- Lapierre, C., 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.133-166.
- Lemma, B., Nilsson, I., Kleja, D. B., Olsson, M., Knicker, H., 2007. Decomposition and substrate quality of leaf litters and fine roots from three exotic plantations and a native forest in the southwestern highlands of Ethiopia. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2317-2328.
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Chabbert, B., Watteau, F., Villemin, G., Recous, S., submitted for publication. Soil biodegradation of maize root residues: interaction between chemical characteristics and the presence of colonizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Machinet, G.E., Bertrand I., Chabbert, B., Recous, S., submitted for publication. Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *European Journal of Soil Science*.
- McClaugherty, C., Berg, B., 1987. Cellulose, lignin and N concentrations as rate regulating factors in late stages of forest litter decomposition. *Pedobiologia* 30, 101-112.
- Monties, B., 1984. Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: Influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie* 4, 387-392.
- Müller, M.M., Sundman, V., Soininvaara, O., Meriläinen, A., 1988. Effect of chemical composition on the release of nitrogen from agricultural plant materials decomposing in soil under field conditions. *Biology and Fertility of Soils* 6, 78-83.



- Neel, C., 1996. Modélisation couplée du transfert et des transformations de l'azote : paramétrisation et évaluation d'un modèle en sol nu. Thèse de doctorat, Université Paris VI, 254p.
- Nicolardot, B., Recous, S., Mary, B., 2001. Simulation of C and N mineralization during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C:N ratio of the residues. *Plant and Soil* 228, 83-103.
- Oglesby, K.A., Fownes, J.H., 1992. Effect of chemical composition on N mineralization from green manures of seven tropical species. *Plant Soil* 143, 127-132.
- Powlson, D.S., Smith, P., Smith, J.W., 1996. Evaluation of soil organic matter models. Springer Verlag, Berlin.
- Probert, M.E., Dimes, J.P., Keating, B.A., Dalal, R.C., Strong, W.M., 1998. Apsim's water and nitrogen modules and simulation of the dynamics of water and nitrogen in follow systems. *Agricultural System* 56, 1-28.
- Puget, P., Drinkwater, L.E., 2001. Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous manure. *Soil Science Society of America Journal* 65, 771-779.
- Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.F., 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Soil Biology and Biochemistry* 269, 341-356.
- Recous, S., Robin, D., Darwis, D., Mary, B., 1995. Soil inorganic N availability: effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1529-1538.
- Sall, S., Bertrand, I., Chotte, J.L., Recous, S., 2007. Separate effects of the biochemical quality and N content of crop residues on C and N dynamics in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 43, 797-804.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Linères, M., Chèneby, D., Nicolardot, B., 2000. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64, 918-926.
- Van Soest, P.J., 1963. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 46, 825-835.
- Vanlauwe, B., Nwoke, O.C., Sanginga, N., Merckx, R., 1996. Impact of residues quality on the C and N mineralization of leaf and root residues of three agroforestry species. *Plant Soil* 183, 221-23.

# CHAPITRE 5

## **Assessment of lignin-related compounds in soils and plant samples by alkaline oxidations and thioacidolysis**

**Gaylord Erwan Machinet<sup>a</sup>, Isabelle Bertrand<sup>a</sup>, Brigitte Chabbert<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>*INRA, UMR 614 FARE, 2 esplanade Roland Garros, BP 224, F-51686 Reims, France*



## Assessment of lignin-related compounds in soils and plant samples by alkaline oxidations and thioacidolysis

### Abstract

This study aimed at determining the capability of the thioacidolysis procedure to be performed, for the first time, on soil samples. Thioacidolysis was compared with cupric oxide (CuO) and nitrobenzene oxidations on soils and plant samples. The sensitivity of the methods to the levels of organic C was assessed in determining the yields of VSC-lignin in soil, where increasing amounts of maize root cell walls were added. We suggested that interferences between soil minerals and chemical reagents may prevent accurate VSC-lignin determination in the case of soil samples with low organic C content, whatever the method used. Thioacidolysis and CuO methods were also applied to soil incubated with maize roots for 796 days in order to identify biomarkers of lignin-derived compounds in soil. We showed that the S/V ratio was the most appropriate biomarker of lignin in soil. At contrary, the C units, which are specific to plant cell walls, would not be a biomarker of lignin-related compounds in soil. Compared with the CuO oxidation, thioacidolysis was more sensitive to detect the low level of the non-condensed structures of lignin in soil organic matter.

*Keywords:* Lignin, Soil, Root, Hydroxycinnamic acids, Thioacidolysis, Cupric oxide oxidation, Nitrobenzene oxidation.

### 1. Introduction

Lignin compounds are the main phenolic polymers occurring in the cell walls of plant vascular tissues (Baucher et al., 1998). Lignin is deposited in the primary and mostly in the secondary cell walls which contain up to 60% of total lignin in plants (Chesson, 1997; Terashima et al., 1993). Different types of interconnection between lignin and other wall polymers provide cohesiveness to plant cell walls. For instance, non-lignin phenolics like hydroxycinnamic acids play a key role in cross-linking wall polysaccharides and lignin in grass species while they represent less than 3% plant dry matter (Jung and Deetz, 1993). Due to their specificity of vascular plants, lignin also serves as indicator for the fate of plant-derived organic matter in soils (Guggenberger et al., 1994; Otto and Simpson, 2006; Heim et

al., 2007; Bahri et al., 2008; Bierke et al., 2008) and sediments (Hedges and Mann, 1979; Goñi et al., 1995; Pepe et al., 1995). In addition, because lignin decomposition is relatively slow, this indicator could be used on long term experiments (Dignac et al., 2005; Bahri et al., 2006).

Lignin is a complex polymer synthesized by radical coupling of mainly three hydroxycinnamyl alcohols: coumaryl alcohol, coniferyl alcohol and sinapyl alcohol. These building units differ in the degree of methoxylation of the aromatic ring and are designated as *p*-hydroxyphenyl (H, non-methoxylated), guaiacyl (G, mono-methoxylated) and syringyl (S, dimethoxylated) (Sarkanen and Ludwig, 1971). Gymnosperm lignins are mainly composed of G units while angiosperm lignins are a mixture of G and S units, accompanied with few but typical H units in the case of grass lignins (Baucher et al., 1998). These phenylpropane units are interconnected through various bonding patterns by a series of ether (carbon-oxygen) and of more resistant carbon-carbon linkages (Adler, 1977). The most frequent interunit  $\beta$ -O-4 bonds, classified as the non-condensed bonds, are the targets of lignin depolymerization processes. In contrast, the other  $\beta$ -5,  $\beta$ -1,  $\beta$ - $\beta$ , 5-5, and 5-O-4 interunit bonds, referred to as the condensed bonds, are more resistant towards degradation (Boudet et al., 1995).

The amounts of lignin in plant material can be assessed by gravimetric methods. Most of these consist in a sulphuric acid hydrolysis of the carbohydrate component of the lignified material, thus leaving a lignin residue which is then quantified gravimetrically (Van Soest, 1963; Monties, 1984). Spectroscopic methods could also be applied, such as the acetyl bromide method, which is based on the complete cell wall solubilisation and subsequent UV absorbance measurement (Dence, 1992). However, none of these methods could be applied to determine the amounts of lignin in a soil matrix. Poirier et al. (2003) tested methods to isolate the « insoluble macromolecular fraction » that occurs in soil organic matter. Several of the treatments, including the Klason lignin protocol, proved to be unsuitable. Indeed, the main drawback is the occurrence of soil minerals which are responsible of weight interferences using gravimetric methods and the formation of colloids which prevent accurate spectroscopic determinations (Kalbitz et al., 2006).

In contrast to lignin content determination, methods performed to assess lignin quality, i.e. its monomer composition, are commonly used in plant, soil and sediment samples. These chemical degradations are based on oxidative degradation (Hedges and Mann, 1979; Chen, 1992; Sun et al., 1995; Hepditch and Thring, 1997) or acidolysis (Lapierre et al., 1986; Pepe et al., 1995), and convert lignins to low molecular weight phenolics amongst which monomers are then analyzed to assess structural information relative to the starting polymer

(Sarkanen and Ludwig, 1971; Chen 1992; Lapierre, 1993). Amongst these, mild alkaline oxidations with nitrobenzene or cupric oxide (CuO) are the most commonly used methods. An abundant literature showed these extractions provide lignin-derived monomers in satisfactory yield (Hedges and Ertel, 1982; Chen, 1992). These oxidative degradations which were initially developed for plant samples proved to be suitable for the characterization of small amounts of lignin in complex organic mixtures and, the CuO was thus applied to soils or sediments (Hedges and Parker, 1976; Hedges and Ertel, 1982; Goñi and Hedges, 1995; Otto and Simpson, 2006).

Nitrobenzene and CuO oxidations mainly degrade the  $\alpha$ -O-4 and  $\beta$ -O-4 non-condensed structures and partly the  $\beta$ -5,  $\beta$ -1 and  $\beta$ - $\beta$  condensed bonds. These methods also cleave the C $\alpha$ -C $\beta$  side chain and yield a suite of single-ring C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> phenols, consisting of *p*-hydroxyphenyl (H), vanillyl (V), syringyl (S) units, deriving from *p*-coumaryl, coniferyl, and syringyl units, respectively.. These oxidations also enable the cleavage of covalent linkages within the cell walls, thereby leading to C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> hydroxycinnamic acids (*p*-coumaric and ferulic acids) (Chang and Allan, 1971; Iiyama and Lam, 1990; Chen, 1992) The C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> hydroxycinnamic acids are usually referred to C units in studies dealing with soil organic matter .

One of the main drawbacks of these oxidative procedures is the possible interference between lignin and non-lignin phenolics. The cleavage of the C $\alpha$ -C $\beta$  side chain gives rise to C<sub>6</sub>C<sub>1</sub> phenols that may stem from the C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> lignin units, as well as from other phenylpropane compounds such as *p*-coumaric and ferulic acids or from tyramine and tyrosine residues in proteins (Lapierre, 1993). Using oxidative methods, the hydroxycinnamic acids as *p*-coumaric and ferulic acids are partly degraded to the corresponding benzaldehydes thus leading to an underestimation of the C units (Hedges and Parker, 1976).

Lignin characterization in plant cell walls mostly rely on the quantification of the H, G and S units recovered by alkaline oxidations (Iiyama et al., 1990; Chen, 1992; Billa et al., 1996). In soil samples, the C units are usually considered as part of the lignin fraction (Hedges and Mann, 1979; Hedges and Ertel, 1982). If the hydroxycinnamic acids are considered as a lignin biomarker in the same way than the G and S units, an evaluation of the above-mentioned interferences with the CuO method should be carried out.

To better examine plant lignins, a more specific method, thioacidolysis, was developed (Lapierre et al., 1986). One of the main advantages of thioacidolysis is that no interference comes from the cell wall-linked phenolic acids in contrast to the commonly used CuO or nitrobenzene oxidations. Thioacidolysis is an acidic depolymerization reaction which allows

the specific cleavage of the lignin  $\beta$ -O-4 and  $\alpha$ -O-4 bonds while preserving the side chains and the C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> lignin skeleton (Lapierre et al., 1986; Rolando et al., 1992). The ether-cleaving reagent, a combination of BF<sub>3</sub> etherate and ethanethiol efficiently cleaves ether bonds without concomitant recondensation reaction and give rise to lignin monomer as C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> trithioethyl-derivatives. The ester- and/or ether-linked phenolic acids such as *p*-coumaric and ferulic acids in grass cell walls can also be disrupted. However, the corresponding products are distinct from the lignin-derived compounds (Lapierre, 1993). To our knowledge, only one study (Pepe et al., 1995) used this specific method in order to characterize the principal source of plant-derived organic matter in river suspension samples.

The main aim of the present paper was to test the capability of the thioacidolysis procedure to be performed, for the first time, on soil samples. The use of this method that specifically targets the non-condensed lignin structure could offer the possibility to better identify a new fraction of soil lignin that is more subject to biological degradation than the more condensed fractions. The thioacidolysis method was compared with the CuO and nitrobenzene oxidations on soil and plant samples and sensitivity to the levels of organic C was assessed. The use of S, G and C units as biomarkers of lignin-derived compounds when determined with the CuO and thioacidolysis methods was tested on a long term incubation experiment with roots of different maize genotypes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant samples and cell wall preparation

Seven genotypes of maize plants termed Mexxal, F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3, F292, and F292bm3, were cultivated in experimental fields at the INRA Lusignan experimental station (49°26'N, 0°07'E, Vienne, France) and were harvested at physiological maturity. Only the roots were kept for experiments. These roots were washed with a 50 g l<sup>-1</sup> sodium metaphosphate solution for 24 h, rinsed with deionised water to remove soil particles, and then dried for one week at 30°C. Roots with a diameter of 2 to 3 mm were selected for the study.

Before lignin analysis, maize root cell walls were isolated as neutral detergent fiber (NDF) according to the method described by Goering and Van Soest (1970). The soluble fraction was removed by boiling 1.5 g of roots (about 5 mm long / 2 mm diameter) in deionised water at 100°C for 30 min then extracting with a neutral detergent solution at 100°C for 60 min to

remove cytoplasmic components and obtain the NDF fraction. This fraction was designated as maize root cell walls (MR-CW). Cell wall residues were dried for one week at 30°C and ground to 80 µm before analyses using a ZM 1000 ultra-centrifugal mill (Retsch, Haan, Germany). The chemical properties of maize roots (MR) and MR-CW are listed in table 1.

**Table 1:** Chemical properties of maize roots (MR) and maize root-cell walls (MR-CW). Data are means  $\pm$  standard deviation (n=2).

	Mexxal	F2	F2bm1	F2bm2	F2bm3	F292	F292bm3
<i>Maize Roots (MR)</i>							
Total C (% dry matter)	45.7 $\pm$ 0.2	47.7 $\pm$ 0.1	47.8 $\pm$ 0.1	47.9 $\pm$ 0.1	47.6 $\pm$ 0.1	46.8 $\pm$ 0.1	46.3 $\pm$ 0.2
Total N (% dry matter)	0.6 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Cell wall (% dry matter)	83.4 $\pm$ 0.2	83.9 $\pm$ 0.5	80.6 $\pm$ 0.3	86.8 $\pm$ 0.6	84.8 $\pm$ 0.1	83.6 $\pm$ 0.5	86.0 $\pm$ 0.2
<i>Maize Root-Cell Walls (MR-CW)</i>							
Total C (% cell wall)	46.5 $\pm$ 0.3	48.4 $\pm$ 0.1	48.5 $\pm$ 0.2	48.5 $\pm$ 0.1	48.1 $\pm$ 0.3	47.8 $\pm$ 0.1	46.7 $\pm$ 0.7
Total N (% cell wall)	0.5 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Klason lignin (% cell wall)	19.5 $\pm$ 0.2	21.0 $\pm$ 0.1	23.8 $\pm$ 0.3	22.3 $\pm$ 0.5	22.5 $\pm$ 0.2	18.6 $\pm$ 0.1	18.4 $\pm$ 0.1

## 2.2. Soil samples

Two soils, an agricultural and a forest soil respectively termed Agri-Soil and Fo-Soil thereafter, were selected for their contrasting organic carbon contents. The Agri-Soil was collected from a depth of 5 to 30 cm at the INRA Mons-en-Chaussée experimental station (49°80'N, 3°60'E, Somme, France). This soil was non-cultivated when sampled but contained few wheat residues due to the previous culture. It is a neoluvisol developed on decarbonated loess which had a silty loam texture. The Fo-Soil was taken from the “Breuil-Chenué” experimental forest site located in the Morvan (47°18'N, 4°4'E, Nièvre, France) from a depth of 5 to 10 cm and the plant residues were removed. This soil developed on granite is a coarse-textured acid alocrisol which had a sandy loam texture. The forest was composed of a coppice-with-standards stand with high trees dominated by European beech (*Fagus sylvatica* L.), sessile oak (*Quercus patraea* Liel.), birch (*Betula pendula* Roth), hazel (*Corylus avellana* L.), and coniferous (*Picea abies* Karst., *Pseudotsuga menziesii* Franco, *Abies nordmanniana* Spach., *Pinus nigra* Arn. ssp *laricio* Poiret. Var *corsicana*). The chemical properties of the soils are given in table 2.



**Table 2:** Chemical properties of the soils.

	Agri-Soil	Fo-Soil
pH <sub>(H<sub>2</sub>O)</sub>	7.6	3.9
Sand (g kg <sup>-1</sup> )	38	640
Silt (g kg <sup>-1</sup> )	773	199
Clay (g kg <sup>-1</sup> )	178	161
Total C (g kg <sup>-1</sup> )	11.5	39.7
Organic C (g kg <sup>-1</sup> )	9.5	39.7
CaCO <sub>3</sub> (g kg <sup>-1</sup> )	2.0	0

Soils were air-dried for two days to a moisture content of 120 mg g<sup>-1</sup> dry soil, and then immediately sieved to 2 mm. All visible organic residues were removed by hand after sieving. Then, a fraction of soil samples was air-dried for two days to a moisture content inferior to 20 mg g<sup>-1</sup> dry soil, and ground before analyses using a PM 100 Planetary ball mills (Retsch, Haan, Germany).

### 2.3. Soil laboratory incubation

The Agri-Soil sieved to 2 mm was mixed with maize roots (about 5 mm long) at a rate equivalent to 2 g C kg<sup>-1</sup> dry soil and incubated in the dark, in glass jars for 766 days at 15°C (four replicates per treatments). Soil moisture was kept, throughout the incubation period, at a potential of -80 kPa, corresponding to a water content of 190 g kg<sup>-1</sup> by weighing at monthly intervals and readjusting with deionised water when necessary. A control incubation experiment was performed in the same way but without the addition of maize root residues (Incubated Control Soil, ICS). CO<sub>2</sub> traps (10 ml 1 M NaOH) were frequently changed to avoid CO<sub>2</sub> accumulation in glass jars. At the end of the experiment (766 days), for each maize genotype, the four replicates of soil + decomposed maize roots were pooled and dried for two days at 30°C then ground before analyses using a PM 100 Planetary ball mills (Retsch, Haan, Germany). Soil samples incubated with maize roots were termed Incubated Soil-Maize Root (IS-MR).

#### 2.4. C and N analyses

The total C and N contents of maize roots before (MR) and after cell wall preparations (MR-CW) were determined by elemental analysis (NA 1500, Fisons Instruments). Lignin determinations were performed on MR-CW whatever the method used. In MR and MR-CW samples, total C was considered as organic carbon. In soil, total C was determined without previous acidification in Fo-Soil (acidic soil), while in Agro-Soil (basic soil) a slow acidification with 1 M HCl was performed to remove mineral C before analysis.

#### 2.5. Lignin content of MR-CW

Klason lignin (KL) was determined as the acid-insoluble residue remaining after sulphuric acid hydrolysis of cell wall polysaccharides (Monties, 1984). Briefly, 200 mg of MR-CW were suspended in 2 ml 12 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at room temperature. Suspensions were then diluted to 1 M with deionised water, heated at 100°C for 3 h and filtered. The remaining residues were dried at 105°C before weighing and ash measurements performed at 550°C for 4 h. Mass differences of samples before and after ash measurement give the amount of Klason lignin.

#### 2.6. Determination of phenolic monomers using alkaline oxidations

Alkaline oxidations were performed on plants (MR-CW), soils (Agri-Soil, Fo-Soil, and ICS), and mixtures of plants and soils (Agri-Soil\_MR-CW, Fo-Soil\_MR-CW, and IS-MR) as described in table 3.

**Table 3:** Summary of the experiments. The CuO and nitrobenzene oxidations, the total hydroxycinnamic acids method (THA), and thioacidolysis were performed on: MR-CW: Maize Root-Cell Walls; Agri-Soil: Agricultural soil; Fo-Soil: Forest soil; Agri-Soil\_MR-CW: mixtures of Agricultural Soil and Mexxal Maize Root-Cell Walls; Fo-Soil\_MR-CW: mixtures of Forest Soil and Mexxal Maize Root-Cell Walls; ICS: Incubated Control Soil; IS-MR: Incubated Soil-Maize Roots. Each quantity is expressed as mg of organic C.

		CuO oxidation				Nitrobenzene oxidation				THA	Thioacidolysis			
MR-CW (Mexxal)						11.6								
MR-CW (all genotypes)		11.6								11.6	11.6			
Agri-Soil		5 - 10				5 - 10				10	5 - 10			
Fo-Soil		5 - 10				5 - 10				10	5 - 10			
Agri-Soil_MR-CW	Soil	10	10	10	10	10	10	10	10	-	10	10	10	10
	MR-CW	0.2	0.7	4.7	11.6	0.2	0.7	4.7	11.6	-	0.2	0.7	4.7	11.6
Fo-Soil_MR-CW	Soil	10	10	10	10	10	10	10	10	-	10	10	10	10
	MR-CW	0.2	0.7	4.7	11.6	0.2	0.7	4.7	11.6	-	0.2	0.7	4.7	11.6
ICS		10				-				10	10			
IS-MR		10				-				10	10			

### 2.6.1. Cupric oxide oxidation

MR-CW, soil samples (Agri-Soil and Fo-Soil) mixed or not with MR-CW, and incubated soils (ICS and IS-MR) were oxidized with cupric oxide (CuO) following the procedure of Hedges and Ertel (1982) and adapted from Kögel (1986) (Table 3). One gram of CuO, 100 mg ammonium iron (II) sulfate hexahydrate  $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$  and 15 ml of 2 M NaOH purged with nitrogen gas were added to Teflon-lined bombs containing samples. After heating 2 h at 170°C, the bombs were cooled at room temperature and methanol-water (1:1, v/v) solutions of ethylvanillin and 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamic acid were added to the reaction mixture as internal standards. The reaction mixture was acidified to pH 1-2 using 6 M HCl and centrifuged (10 min at 10000 rpm). The residues were washed with 10 ml of deionized water prior to centrifugation. The combined supernatants were extracted three times with 25 ml of dichloromethane. Anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was added to the combined organic

phases to remove any remaining water. The dichloromethane extract were evaporated at 40°C to dryness under reduced pressure.

### 2.6.2. Nitrobenzene oxidation

Nitrobenzene oxidation was performed on the same samples than CuO oxidation, unless the incubated samples (ICS and IS-MR) (Table 3). The reaction was carried out in Teflon-lines bombs according to the procedure of Freudenberg et al. (1940) and adapted from Bernard Vailhé et al. (1998), using nitrobenzene (1 ml) and 2 M NaOH (15 ml). After 3 h heating at 160°C, the bombs were cooled at room temperature for 2 h. Then, ethylvanillin and 3,4,5,trimethoxy-*trans*-cinnamic acid were added as internal standards and the reaction mixture was extracted three times with dichloromethane (25 ml) to remove nitrobenzene reduction products and any excess nitrobenzene. Then, the reaction mixture was acidified to pH 1-2 using 6 M HCl and extracted three more times with 25 ml of dichloromethane. The combined organic phases were treated with anhydrous sodium sulfate as above, then evaporated at 40°C to dryness under reduced pressure.

### 2.6.3. Total hydroxycinnamic acids (THA)

THA (*p*-coumaric and ferulic acids) of MR-CW, Agri-Soil, Fo-Soil, ICS and IS-MR were released by alkali hydrolysis (Table 3). Teflon-lines bombs were loaded with samples and 4 M NaOH (15 ml). After heating 2 h at 170°C, the bombs were cooled at room temperature for 2 h. Then, reaction mixture was acidified to pH to 1-2 with 6 M HCl, prior to the addition of 3,4,5,trimethoxy-*trans*-cinnamic acid as an internal standard. THA were then extracted three times with diethyl oxide (25 ml). The organic fractions were pooled and evaporated to dryness under reduced pressure.

#### 2.6.4. Monomers quantification

The monomers extracted by alkaline oxidations were all determined by HPLC (Waters, 2690). The dried extracts were dissolved in 1 ml methanol:water (1:1, v/v) and filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) prior to injection onto a Spherisorb S5ODS2 (Waters, RP-18, 250x2.6 mm) column. The lignin oxidation products were detected using a photodiode array UV detector (Waters, 996). The CuO, nitrobenzene and THA oxidations yield a suite of phenolic compounds, consisting of *p*-hydroxyphenyl (H), vanillyl (V), syringyl (S) units with aldehydic, acidic and ketonic side-chains, and of cinnamyl (C) units. The V and S units were quantified using the ethylvanillin at 280 nm. THA (C units) either released by CuO, Nitrobenzene or total alkali extraction were quantified using 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamic acid at 302 nm (Chen, 1992). Reference standards were vanillic acid, vanillin, acetovanillone, syringic acid, syringaldehyde, acetosyringone, ferulic acid, *p*-coumaric acid, ethylvanillin and 3,4,5-trimethoxy-*trans*-cinnamic acid.

Lignin component in the sample is represented by the sum of those units (V+S+C), hereafter noted VSC-lignin. The concentration of V-type monomers was calculated as the sum of the concentrations of vanillin, acetovanillone and vanilic acid. The concentration of S-type monomers was calculated as the sum of the concentrations of syringic acid, syringaldehyde and acetosyringone. C-type monomers were calculated as the sum of ferulic and *p*-coumaric acids (Hedges and Ertel, 1982).

#### 2.7. Determination of lignin monomers using thioacidolysis

Thioacidolysis was applied to plants (MR-CW), soils (Agri-Soil, Fo-Soil, and ICS), and mixtures of plants and soils (Agri-Soil\_MR-CW, Fo-Soil\_MR-CW, and IS-MR) as described in table 3. The reaction was performed at 100°C for 4h in tubes with Teflon-lined screw cap, using 20 ml dioxane:ethanethiol (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate under constant stirring (Lapierre et al., 1986). After 10 mn cooling down at room temperature, tetracosane (C<sub>24</sub>) dissolved in a dichloromethane solution was added to the reaction mixture as internal standard. The boron trifluoride etherate was neutralized by 0.4 M NaHCO<sub>3</sub> and the liquid was acidified to pH 1-2 using 6 M HCl. The reaction mixture was then extracted three times with 25 ml of dichloromethane. Anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to the combined organic phases to remove any remaining water. The dichloromethane extract were evaporated at 40°C to a 0.5 ml final volume, and then transferred to 2 ml glass vials. Ten  $\mu\text{l}$  of the sample were

silylated with 20  $\mu\text{l}$  pyridine and 70  $\mu\text{l}$  N, O bis(trimethylsilyl) trifluoro-acetamide in a conical bottomed tight vial fitted with a Teflon-lined screw cap. The silylation is complete after few hours, at room temperature. Monomer products were analyzed as trimethylsilyl derivatives of guaiacyl and syringyl by capillary column gas chromatography using a J&W DB-1 column (30 m long, 0.3 mm internal diameter; 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and a temperature gradient of 160-280°C at 2°C min<sup>-1</sup>. The carrier gas was helium at 60 kPa, and detection was done by flame ionization. Guaiacyl and Syringyl units will be designated in this study as V and S units respectively to allow comparison with alkaline oxidations.

### 2.8. Data treatment and analysis

In the specific case of MR-CW samples, for which lignin quantification was performed (Klason lignin), the total yield of extraction of the phenols was assessed using the following equation:

$$\text{Yield (\%KL)} = (\text{VSC-lignin} * 200 * 100) / \% \text{KL}$$

The VSC-lignin is expressed in mol g<sup>-1</sup> of maize root residues, and “200” corresponded to the average C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> molecular weight, according to Lapierre (1993). Yields are expressed as percent of Klason lignin.

Changes in composition of the oxidation products during degradation are reflected by several ratios of individual phenols. Acid to aldehyde weight ratios of vanillyl and syringyl units (expressed as (Ac/Al)<sub>V</sub> and (Ac/Al)<sub>S</sub>) reflect the degree of oxidation of lignin side chains and, therefore, indicate the degree of microbial alteration of lignin (Bierke et al., 2008). The weight ratio of syringyl to vanillyl units (S/V) is used to discriminate between gymnosperm and angiosperm plant tissue: Gymnosperms produce only vanillyl phenols whereas angiosperms contain phenols of both groups (Hedges and Mann, 1979).

VSC-lignin measured in MR-CW, in Agri-Soil and in Fo-Soil allowed to assess a “theoretical” VSC-lignin expected in Agri-Soil\_MR-CW and Fo-Soil\_MR-CW. Theoretical VSC-lignin was calculated by taking into account the relative proportion of organic C from plant and soil samples in the mixtures. The theoretical VSC-lignin was compared to the measured VSC-lignin, hereafter noted the “experimental” VSC-lignin. Using the same approach, a “theoretical” S to V weight ratio was calculated and compared to the “experimental” S to V weight ratio determined in Agri-Soil\_MR-CW and Fo-Soil\_MR-CW mixtures.

Differences in values (i) of lignin parameters of MR-CW, (ii) of “theoretical” and “experimental” VSC-lignin and S to V ratios of Agri-Soil\_MR-CW and Fo-Soil\_MR-CW and (iii) of the organic C contents of ICS and IS-MR were evaluated by least significant difference (LSD,  $P \leq 0.05$ ) derived from an analysis of variance (Genstat 8.1). Differences in values (i) of chemical properties of MR and MR-CW, and (ii) of phenols composition of ICS and IS-MR for each method were evaluated by a Student-test.

### 3. Results

#### 3.1. Maize roots characteristics

Total C contents of maize roots (MR) accounted for nearly 50% dry matter, while the amounts of total N were less than 2% dry matter for all genotypes (Table 1). Root cell wall contents were high; the NDS soluble fraction represented less than 20% dry matter (Table 1). The total C content of maize root cell walls (MR-CW) was slightly superior to that of MR, while the N content of MR-CW was similar to that of MR (Table 1). The amounts of Klason lignin ranged from 18.4 to 23.8% of cell walls for F292bm3 and F2bm1, respectively (Table 1).

Four chemical degradation methods were performed on Mexxal MR-CW to characterize phenol compounds (Table 4). Results showed that the vanillyl or guaiacyl unit and the syringyl unit contents were significantly higher with nitrobenzene than with CuO and thioacidolysis ( $P \leq 0.05$ ). The cinnamyl (C) unit was quantified only with alkaline oxidations; its level was 2 and 4 times higher with THA than with nitrobenzene and CuO, respectively (Table 4). C unit was mostly composed of *p*-coumaric acid that represented 62-71% of the C units (data not shown). The VSC-lignin determined by thioacidolysis was significantly lower than that determined by the alkaline oxidations ( $P \leq 0.05$ ). The high amount of V units measured with nitrobenzene oxidation leads to S/V ratio significantly smaller than with the other methods ( $P \leq 0.05$ ) (Table 4). Yields differed significantly between methods and were ranked as follows: thioacidolysis < CuO < nitrobenzene ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 4:** Lignin parameters of maize root-cell walls (MR-CW). Data are means (n=2). For each genotype, means not sharing a common letter within a same column differ in terms of chemical characteristics ( $P \leq 0.05$ ).

<i>MR-CW</i>		V	S	C	VSC	S/V	(Ac/Al) <sub>V</sub>	(Ac/Al) <sub>S</sub>	Yields (%KL)
		(mg g <sup>-1</sup> organic C)							
Mexxal	Thio	15.6 a	37.8 a	n.d.	53.4 a	2.4 b	n.d.	n.d.	12.5 a
	CuO	25.5 b	64.3 b	17.2 a	106.9 b	2.5 b	0.08	0.12	29.0 b
	Nitrobenzene	41.2 c	70.1 c	41.4 b	152.7 c	1.7 a	0	0	42.6 c
	THA	n.d.	n.d.	75.5 c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	3.33	3.46	23.15	14.37	0.11			3.84
F2	Thio	21.3 a	43.5 a	n.d.	64.8 a	2.0 a	n.d.	n.d.	14.8 a
	CuO	28.0 b	65.5 b	17.0 a	110.5 b	2.3 b	0.14	0.17	29.1 b
	THA	n.d.	n.d.	65.9 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	2.36	8.00	3.73	12.26	0.09			3.18
F2bm1	Thio	15.4 a	22.3 a	n.d.	37.7 a	1.5 a	n.d.	n.d.	7.7 a
	CuO	27.6 b	43.1 b	13.8 a	84.6 b	1.6 b	0.14	0.20	19.9 b
	THA	n.d.	n.d.	51.4 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	2.83	5.24	2.43	9.00	0.09			1.99
F2bm2	Thio	14.2 a	29.3 a	n.d.	43.5 a	2.1 a	n.d.	n.d.	9.3 a
	CuO	25.8 b	52.4 b	16.8 a	95.1 b	2.0 a	0.15	0.17	23.6 b
	THA	n.d.	n.d.	59.0 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	2.34	6.21	6.08	10.68	0.10			2.60
F2bm3	Thio	24.2 a	17.2 a	n.d.	41.4 a	0.7 a	n.d.	n.d.	9.1 a
	CuO	32.8 b	27.3 b	17.8 a	77.8 b	0.8 b	0.12	0.16	19.6 b
	THA	n.d.	n.d.	53.6 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	3.65	1.78	4.04	7.36	0.05			1.88
F292	Thio	18.6 a	31.3 a	n.d.	49.9 a	1.7 a	n.d.	n.d.	12.8 a
	CuO	28.2 b	50.6 b	20.7 a	99.6 b	1.8 b	0.14	0.15	29.4 b
	THA	n.d.	n.d.	62.0 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	1.55	1.01	2.04	3.27	0.09			0.96
F292bm3	Thio	18.0 a	13.7 a	n.d.	31.7 a	0.8 a	n.d.	n.d.	8.3 a
	CuO	28.0 b	24.6 b	15.0 a	67.6 b	0.9 b	0.14	0.16	20.2 b
	THA	n.d.	n.d.	54.9 b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	LSD	2.16	1.63	5.62	5.38	0.02			1.47

n.d. : not determined

On the six remaining MR-CW genotypes, two alkaline oxidations (CuO and THA) and thioacidolysis were performed. Results showed that the V and S units contents were lower with thioacidolysis than with CuO, independently of the genotype (Table 4). C units were



systematically and significantly higher with THA than with CuO ( $P \leq 0.05$ ); between these two methods, a factor of 3 to 4.4 was measured. However, because the C units were not taken into account with thioacidolysis, VSC-lignin was lower with thioacidolysis than with CuO. The root VSC varied amongst genotypes, notably the lowest values were obtained with F2bm1, 2, 3 lines and F292bm3 (Table 4). The S/V ratio and yields were globally superior for the CuO oxidation than with the thioacidolysis. Whatever the method used, F2bm3 and F292 bm3 had the lowest S/G molar ratios.

Vanillic acid and syringic acids were recovered from MR-CW by CuO oxidation. The CuO  $(Ac/Al)_V$  ranged from 0.08 for Mexxal to 0.15 for F2bm2, while  $(Ac/Al)_S$  varied from 0.12 to 0.20 between Mexxal and F2bm1, respectively (Table 4). Following nitrobenzene oxidation, these ratios were close to zero as  $C_6-C_1$  acids were not recovered amongst oxidation products.

### 3.2. Soils characteristics

The Fo-Soil was strongly acidic as compared with the Agri-Soil which was slightly basic (Table 2). The amounts of total C also strongly varied between the two soils: being 3.4 times higher in Fo-Soil than in Agri-Soil. When corrected for mineral C (Agri-soil), the organic C was 4.17 times higher in Fo-Soil compared to Agri-Soil. Phenols recovered by the four degradation methods were determined using two levels of organic C, except for the THA method that was applied to 10 mg of soil organic C only (Table 5). In Agri-Soil, values of V and S units determined by thioacidolysis and CuO oxidation using 5 mg of organic C (i.e. 500 mg of Agri-Soil) were higher than those obtained with 10 mg of organic C, while the opposite trend was observed for nitrobenzene oxidation (Table 5). In Fo-Soil, the CuO produced similar values when applied to 5 and 10 mg soil organic C, while nitrobenzene S and V units was lower with 5 mg organic C than with 10 mg. The  $(Ac/Al)_V$  and  $(Ac/Al)_S$  ratios of Agri-Soil and Fo-Soil were evaluated with the CuO and the nitrobenzene oxidations. The  $(Ac/Al)_V$  ratios were similar for both soils with CuO or nitrobenzene (Table 5). Syringic acid was only detected in trace amounts after nitrobenzene oxidation of soil samples giving rise to a  $(Ac/Al)_S$  ratio close to zero. Using CuO, the same pattern was obtained with Fo-Soil whereas syringic acid was recovered in large amounts from Agri-soil, the obtained  $(Ac/Al)_S$  was equal to 0.30 (Table 5). For each oxidation reaction, these ratios had similar values for 5 and 10 mg organic matter.

**Table 5:** Lignin parameters of soils as function of the quantities of organic C, i.e. the soil mass used. Data are means  $\pm$  standard deviation (n=2).

	Organic C (mg)	V	S	C	VSC	(Ac/Al) <sub>V</sub>	(Ac/Al) <sub>S</sub>	S/V
		(mg g <sup>-1</sup> organic C)						
<b><i>Agri-Soil</i></b>								
Thioacidolysis	10	1.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	n.d.	3.0 $\pm$ 0.1	n.d.	n.d.	1.1 $\pm$ 0.1
	5	1.8 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	n.d.	3.9 $\pm$ 0.3	n.d.	n.d.	1.2 $\pm$ 0.2
Cupric oxide	10	6.8 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 1.2	t	14.8 $\pm$ 2.3	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1
	5	9.4 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 0.1	t	19.0 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1
Nitrobenzene	10	10.2 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.3	t	16.6 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	0	0.6 $\pm$ 0.1
	5	9.6 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	15.6 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1	0	0.6 $\pm$ 0.1
THA	10	n.d.	n.d.	3.6 $\pm$ 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>Fo-Soil</i></b>								
Thioacidolysis	10	1.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	n.d.	2.8 $\pm$ 0.2	n.d.	n.d.	0.5 $\pm$ 0.1
	5	2.2 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	n.d.	3.3 $\pm$ 0.2	n.d.	n.d.	0.5 $\pm$ 0.1
Cupric oxide	10	7.2 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.2	t	9.2 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	0	0.3 $\pm$ 0.1
	5	7.6 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.1	t	9.5 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.1	0	0.2 $\pm$ 0.1
Nitrobenzene	10	9.8 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1	12.4 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.1	0	0.2 $\pm$ 0.1
	5	7.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	t	9.0 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0	0.2 $\pm$ 0.1
THA	10	n.d.	n.d.	2.7 $\pm$ 0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: not determined, t: trace amount

Hydroxycinnamic units (C) were only quantified amongst products recovered by alkaline oxidations. While CuO reaction did not give rise to C units, high discrepancies existed between THA and nitrobenzene oxidation. The THA gave values of C units 6.8 to 12 times higher than nitrobenzene, for which values were very low and even no detectable in two samples over four. The CuO and nitrobenzene oxidations released more VSC-lignin than thioacidolysis in both soils. For all methods, the S/V ratios of soils did not vary with the different levels of soil organic C (Table 5) thus indicating that the amounts of V and S units varied proportionally to the amounts of soil organic C.

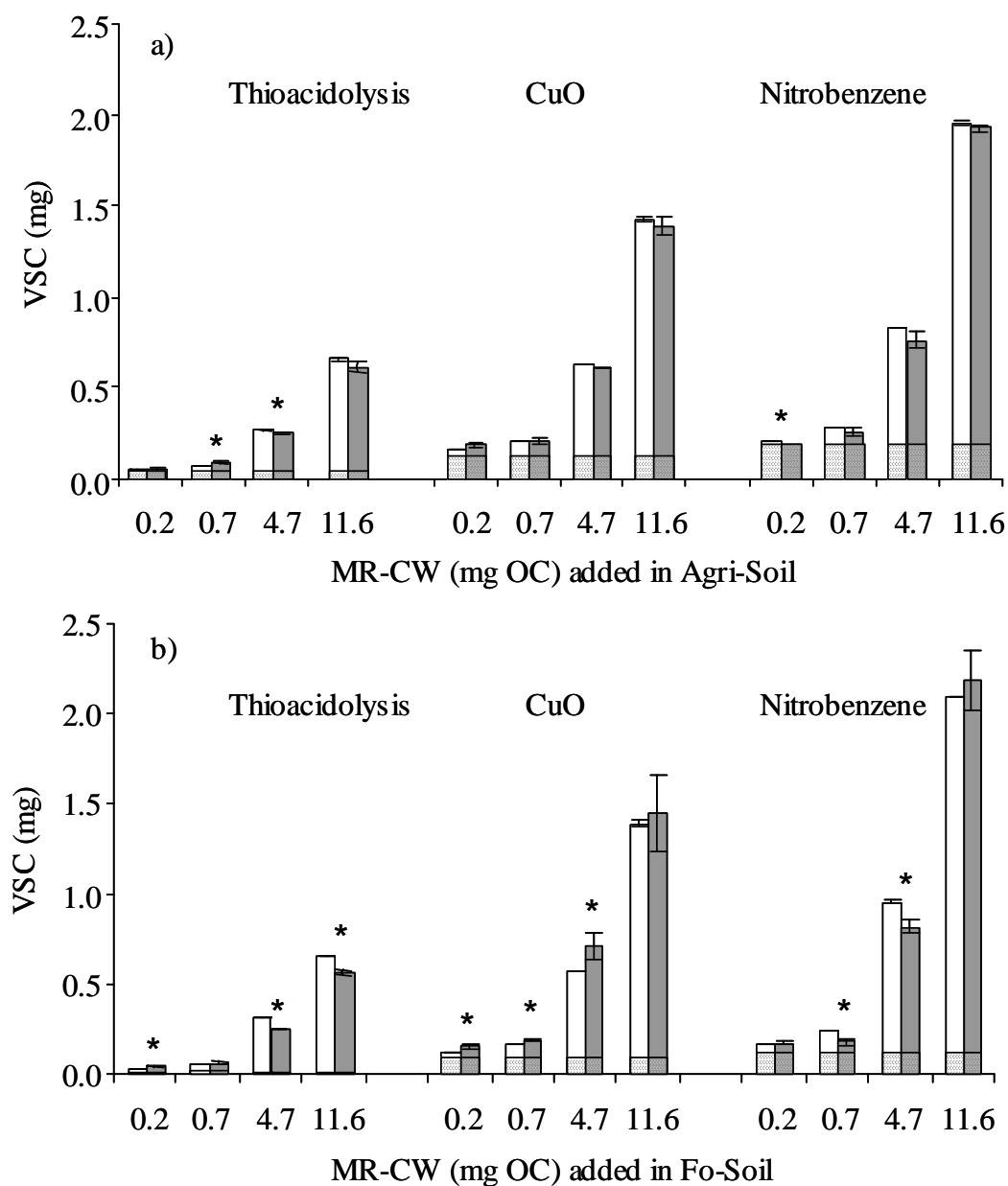
The CuO and nitrobenzene oxidations released more VSC-lignin from Agri-Soil than from Fo-Soil, while thioacidolysis gave similar VSC (Table 5). Compared with thioacidolysis, the higher amounts of VSC-lignin measured by the oxidative methods were related to higher

amounts of V and S units in Agri-Soil while it was mainly due to V units in Fo-Soil. The S/V ratios also varied between soils. They were systematically lowest in Fo-Soil whatever the methods used and that was related to smaller amount of S unit measured. Noticeably, the S/V ratios were similar between CuO and thioacidolysis in Agri-Soil, while they were higher with thioacidolysis in Fo-Soil.

### *3.3. Recovery of MR-CW phenols mixed with soils*

Theoretical VSC-lignin was compared to experimental VSC-lignin for Agri-Soil and Fo-Soil in which 0.2, 0.7, 4.7 and 11.6 mg of Mexxal MR-CW organic C were added (Figure 1). In all cases, theoretical and experimental VSC-lignin increased with the rates of MR-CW added to soils, and rose as follows: nitrobenzene > CuO > thioacidolysis (Figures 1a and 1b). In Agri-Soil (Figure 1a), experimental VSC-lignins were mostly not different from theoretical values. However, in the case of thioacidolysis and nitrobenzene two rates of Agri-Soil\_MR-CW gave significant lower experimental values than theory. In Fo-Soil, experimental VSC-lignins obtained with thioacidolysis were significantly lower than in theory for 4.7 and 11.6 mg of MR-CW added. The same situation appeared with nitrobenzene, for which experimental VSC-lignins were significantly lower than in theory but only for 0.7 and 4.7 mg of MR-CW added to Fo-Soil. Inversely, in the case of CuO three rates of Fo-Soil\_MR-CW gave significant higher experimental values than theory (Figure 1b).

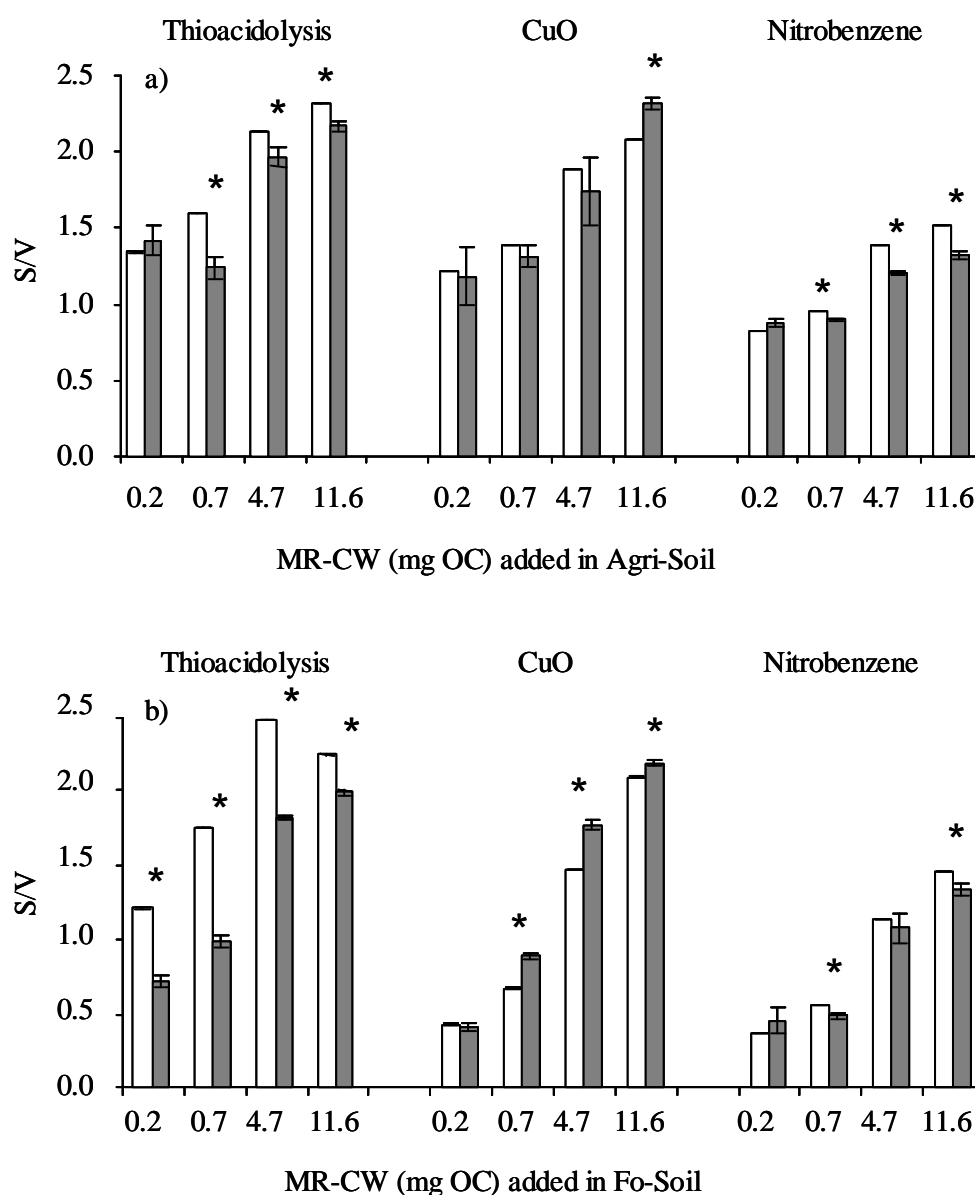
The amount of soils was fixed in the cell-wall-soil mixture therefore content in soil VSC-lignin is known (Table 5). The relationship between the recovery of VSC-lignin from MR-CW and the amount of MR-CW in the mixture was thus assessed. This proportionality between the amount of VSC-lignin added from MR-CW and experimental VSC lignins was respected only for the two higher loads of MR-CW irrespective of the soil type and methods (Figures 1a and 1b).



**Figure 1:** Comparison between the theoretical ( $\square$ ) and the experimental ( $\blacksquare$ ) VSC-lignin determined a) in Agri-Soil\_MR-CW and (b) in Fo-Soil\_MR-CW. Dotted bars represented values of VSC-lignin which originated from soils. Data are means  $\pm$  standard deviation (n=2). A star (\*) indicates values significantly different between theoretical and experimental VSC-lignin contents at  $P \leq 0.05$ .

When the amount of organic C from MR-CW increased, the S/V ratios also increased to approximate S/V ratio directly determined on MR-CW (Figure 2). However, the experimental and theoretical S/V ratios differed according to methods. In Agri-Soil, thioacidolysis and

nitrobenzene applied to the three higher rates of MR-CW exhibited experimental S/V ratios significantly lower than the theoretical ones (Figure 2a). This lack of recovery of S and V units was also apparent for the higher rate of MR-CW detected by CuO in Agri-Soil. Moreover, in Fo-Soil, all rates of MR-CW presented values of experimental S/V ratios significantly lower than theoretical values with thioacidolysis; this was also the case for two rates with nitrobenzene, while an opposite trend was observed for three rates with CuO (Figure 2b).



**Figure 2:** Comparison between the theoretical ( $\square$ ) and the experimental ( $\blacksquare$ ) S/V ratios determined a) in Agri-Soil\_MR-CW and (b) in Fo-Soil\_MR-CW. Data are means  $\pm$  standard deviation (n=2). A star (\*) indicates values significantly different between theoretical and experimental S/V ratios at  $P \leq 0.05$ .

### 3.4. Characteristics of soils incubated with maize roots (IS-MR)

After more than two years of laboratory incubation, total organic C in IS-MR remains higher than that measured in ICS (Table 6). Significant differences occurred between genotypes, however all the data were comprised between 10.4 and 11.0 g OC kg<sup>-1</sup> of dry soil, thus showing the low amplitude of variation. All the values of V and S units of ICS and IS-MR soils released by thioacidolysis were lower than with the CuO oxidation (Table 6), while the amounts of C units were highest with the THA method. This lead to values of VSC-lignin determined by thioacidolysis that were 4.3 to 7.4 times lower than those obtained with the CuO oxidation. S/V ratio was also systematically higher with CuO than with thioacidolysis.

The amounts of V, S and C units in the IS-MR soils were globally higher than that measured in ICS except for F292bm3 genotype (Table 6). This was more obvious for the S than for the V contents that showed weak variations. The S/V ratios varied between treatments and ranged from 0.8 to 1.3 with thioacidolysis and from 1.1 to 1.5 with the CuO oxidation between IS-MR of F2bm3 and F2bm2, respectively (Table 6). In contrast, the (Ac/Al) ratios of the S and V units were similar between ICS and IS-MR (Table 6).

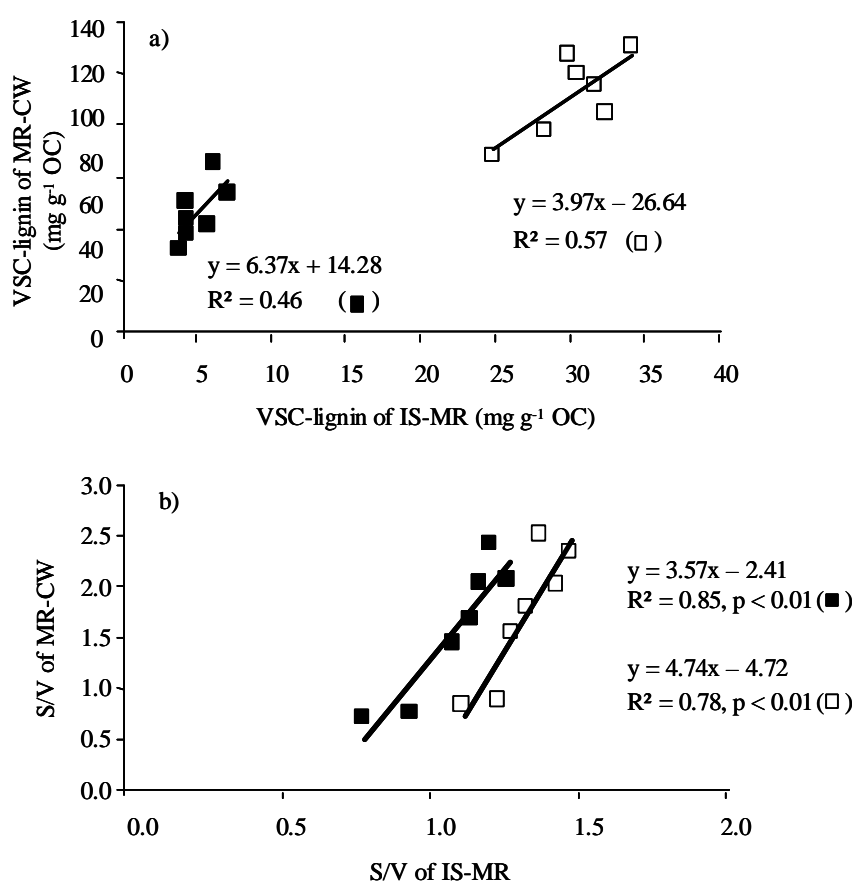
**Table 6:** Organic C and lignin parameters of ICS and IS-MR. Data are means (n=2). Means not sharing a common letter differ in terms of organic C content ( $P \leq 0.05$ ). For each method, (\*) means significant differences of chemical characteristics between ICS and IS-MR ( $P \leq 0.05$ ).

	Organic C (g kg <sup>-1</sup> )		V	S	C	VSC	S/V	(Ac/Al) <sub>V</sub>	(Ac/Al) <sub>S</sub>
			(mg g <sup>-1</sup> OC)						
ICS	9.8 a	Thio	1.8	1.9	n.d.	3.7	1.1	n.d.	n.d.
		CuO	10.1	13.3	0.6	24.0	1.3	0.2	0.3
		THA	-	-	3.6	-	-		
<i>IS-MR</i>									
Mexxal	10.4 b	Thio	3.1 *	3.8 *	n.d.	6.9 *	1.2	n.d.	n.d.
		CuO	11.9 *	16.7 *	0.9	29.5 *	1.4 *	0.2	0.3
		THA	-	-	5.9	-	-		
F2	10.8 d	Thio	2.7 *	3.3 *	n.d.	6.0 *	1.2	n.d.	n.d.
		CuO	13.1 *	19.8 *	0.9	33.7 *	1.5 *	0.2	0.3
		THA	-	-	7.4 *	-	-		
F2bm1	10.8 d	Thio	2.0	2.3 *	n.d.	4.3	1.1	n.d.	n.d.
		CuO	13.4 *	17.6 *	1.0 *	32.0 *	1.3 *	0.2	0.4
		THA	-	-	6.1 *	-	-		
F2bm2	11.0 e	Thio	1.9	2.4 *	n.d.	4.3	1.3 *	n.d.	n.d.
		CuO	12.2 *	17.9 *	1.2 *	31.2 *	1.5	0.2	0.3
		THA	-	-	6.5 *	-	-		
F2bm3	10.9 e	Thio	3.1 *	2.5 *	n.d.	5.6 *	0.8 *	n.d.	n.d.
		CuO	12.6 *	14.4	0.9	27.9	1.1	0.2	0.3
		THA	-	-	6.2 *	-	-		
F292	10.4 b	Thio	1.9	2.2 *	n.d.	4.1	1.2	n.d.	n.d.
		CuO	12.3 *	16.7 *	1.1 *	30.1 *	1.4 *	0.2	0.4
		THA	-	-	5.2 *	-	-		
F292bm3	10.5 c	Thio	1.9	1.9	n.d.	3.8	1.0 *	n.d.	n.d.
		CuO	10.4	13.2	0.8	24.5	1.3	0.2	0.4
		THA	-	-	4.4 *	-	-		
LSD	0.1								

n.d.: not determined.

### 3.5. Phenols monomers relationships between MR-CW and IS-MR

Relationships between the VSC-lignin of MR-CW (before soil incubation) and those measured in the incubated soils (IS-MR) using CuO oxidation and thioacidolysis are presented in figure 3a. Results showed that the amounts of VSC of MR-CW were slightly correlated with those of IS-MR after 766 days decomposition for both methods. The S units of MR-CW released by CuO were correlated with the S units of IS-MR ( $R^2 = 0.73$ ) in contrast to the V units ( $R^2 = 0.03$ ). The same patterns were observed after thioacidolysis for the S units ( $R^2 = 0.62$ ) and the V units ( $R^2 = 0.28$ ). The S/V ratios of MR-CW exhibited a positive relationships with the S/V ratios of IS-MR ( $R^2 = 0.78$  and  $R^2 = 0.85$ , with the CuO oxidation and thioacidolysis, respectively) (Figure 3b), and displayed higher correlation than the S units alone. The C units of MR-CW were not correlated with the C units of IS-MR using either CuO ( $R^2 = 0.08$ ) or THA ( $R^2 = 0.04$ ) (data not shown). Regarding the (Ac/Al) ratios determined by CuO, no correlation was shown between MR-CW and IS-MR ( $R^2 = 0.33$  for  $(Ac/Al)_V$ ;  $R^2 = 0.01$  for  $(Ac/Al)_S$ ).



**Figure 3:** Relationships between a) the VSC-lignin of MR-CW and the VSC-lignin of IS-MR and b) the S/V ratios of MR-CW and the S/V ratios of IS-MR, determined by the CuO oxidation (□) and thioacidolysis (■).



## 4. Discussion

### 4.1. Phenols quality in maize root samples

Chemical degradative methods (CuO, nitrobenzene, THA, thioacidolysis) were applied on maize root cell walls. These organs were selected i) because they are known to greatly contribute, possibly more than aerial plant parts, to building up soil organic matter and ii) for their high proportion of lignified cell wall (Bertrand et al., 2006; Carrera et al., 2008). Quantification of lignin related monomers was performed on maize root cell walls (MR-CW) in order to minimize the possible interference of phenolics compounds which may occur in the cyto-soluble fraction (Lapierre, 1993).

In the present study which focused on lignin biomarkers in soil, C units were considered as lignin-related components in both root cell walls and soils. These hydroxycinnamic acids represented 27% and 16% of the VSC-lignin in Mexxal MR-CW after the nitrobenzene and CuO oxidations respectively, thus accounting for a significant part of the root cell wall VSC-lignin. Thioacidolysis can also disrupt benzoic and *p*-hydroxycinnamic ester linkages. However, since this method was not aimed at the quantitative cleavage of ester bonds, recovery of C unit has been often considered as the unequivocal signature for grass cell walls (Rolando, 1992; Pepe et al., 1995). In this respect, the amounts of C unit were not quantified amongst thioacidolysis products.

Occurrence of hydroxycinnamic acids is a typical feature for grass cell walls. FA has thus been reported to be mostly ester-linked to hemicelluloses but also ether-linked to lignin, whereas PCA would essentially esterify the syringyl moieties of lignin (Jacquet et al., 1995; Ralph et al., 1993). Following nitrobenzene oxidation, *p*-coumaric and ferulic acids survived in measurable amounts allowing this procedure to be suitable for the determination of the cell-wall cinnamic acids (Chen, 1992). However, the amounts of C unit of Mexxal root cell-walls determined by the nitrobenzene oxidation were lower than those obtained after THA. Indeed, 54% of the PCA and 57% of the FA persisted after the nitrobenzene oxidation. This is in good agreement with Iiyama and Lam (1990) who demonstrated that only 32% of the PCA and 22% of the FA in wheat internodes survived to alkaline nitrobenzene oxidation. Even lower recovery yields of C units were obtained by CuO indicating that both nitrobenzene oxidation and CuO oxidation lead to an underestimation of C units in maize root cell-walls. This could partly be explained by the fact that some *p*-coumaric and ferulic acids can also be oxidized into *p*-hydroxybenzaldehyde and vanillin, respectively, after alkaline oxidations (Hedges and

Parker, 1976). As previously reported in grass lignified cell walls, *p*-coumaric acid accounts for the major fraction of the C units determined by THA hydrolysis of maize roots, that could result in a significant overestimation of *p*-hydroxyphenyl lignin unit using CuO and nitrobenzene. In this respect H units were not quantified in this study using alkaline degradations. In addition, the *p*-hydroxyphenyl units represent a low proportion of lignin monomers in grass lignins and occurred mostly in the condensed lignin structures (Lapierre, 1993). Accordingly, weak amounts of H units were released from maize roots (data not shown) by thioacidolysis that specifically targets the non-condensed lignin fraction.

None of the chemical degradation methods enabled to characterize the whole lignin polymer in agreement with the higher chemical recalcitrance of the condensed lignin intermonomer linkages (Sarkanen and Ludwig, 1971 ; Chen, 1992). As compared with CuO and thioacidolysis, the highest yields of phenolics from Mexxal MR-CW are given by the nitrobenzene oxidation. Pepper et al. (1967) have previously shown that cupric oxide is a milder and more selective oxidant than nitrobenzene. Accordingly nitrobenzene oxidation mainly allows the formation of aldehyde forms of the V and S units from Mexxal, while CuO released both acidic and aldehydic forms of the V and S units (data not shown). This could partly explain the differences of yields observed between both oxidative methods. Compared with thioacidolysis, the higher yield of monomers obtained from alkaline nitrobenzene oxidation is in good agreement with the literature data (Lapierre, 1993). Thioacidolysis provides an estimation of the lignin-derived monomers only linked by  $\alpha$ -O-4 and  $\beta$ -O-4 bonds, while the CuO and nitrobenzene oxidations yield monomers could partly originate from condensed linkage such as  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -1,  $\beta$ - $\beta$  interunit bonds in addition to the non condensed linkages (Chang and Allan, 1971, Iiyama and Lam, 1990).

In order to assess the impact of root introduction on lignin biomarkers in soil, we used maize lines displaying variations in the cell-wall phenolic fraction. We took advantage of the occurrence of natural “brown midrib” (bm) mutants of maize for which alteration in the lignin biosynthesis pathway has been reported (Cherney et al., 1991). Root cell-walls from these different maize lines displayed significant variation in the content and composition of lignin-related components. Noticeably, highly condensed lignins with low amount of syringyl were obtained for the bm3 roots in agreement with previous studies related to the above-ground parts of maize (Kuc and Nelson, 1964; Vignols et al., 1995; Barrière et al., 2004). In addition, thioacidolysis enabled the detection of 5 hydroxyguaiacyl units (4% of VSC) in bm3 root lignin (data not shown), which is a typical feature of the bm3 mutation in above-ground maize

(Lapierre, 1988). The C units contents determined by THA also varied according to the maize genotypes.

#### *4.2. Phenols characterization in soil samples*

The CuO, nitrobenzene, THA and thioacidolysis methods were applied to two types of soil that significantly differ in their organic C contents. Compared with thioacidolysis, the highest VSC-lignin contents were obtained by the oxidative methods in agreement with results on root cell-walls and the higher specificity of thioacidolysis for the non-condensed lignin fraction. When the CuO, nitrobenzene and thioacidolysis were performed on various amounts of soil organic C (5 mg or 10 mg), our results showed that these methods were sensitive to the amounts of soil organic C. However, variations of the chemical characteristics of soil derived-phenols resulting from nitrobenzene are inverse than those observed for the CuO oxidation and thioacidolysis. Moreover, when mixture of MR-CW and soils were analyzed by thioacidolysis, CuO and nitrobenzene, the VSC-lignin recovery yield was not proportional to the amount MR-CW introduced for values lower than 4.7 mg of root organic-C. Interferences between soil minerals and chemical reagents may prevent accurate VSC-lignin determination in the case of soil samples with low organic C content. Thus, the lack of proportionality differed between Fo-Soil and Agri-Soil, suggesting that the nature of soil might affect the chemical characterization of lignin in soils. However, this hypothesis should be tested in taking into account a larger range of soils.

Agri-soil and Fo-soil were characterized by different quantity and quality of organic matter. The higher level of organic C in Fo-Soil could be related to the annual fall of leaves. According to the alkaline degradation methods, Fo-Soil contained less VSC-lignin than Agri-Soil which is in contrast with several studies showing higher VSC-lignins in forest soils than in arable soil (Amelung et al., 1998; Guggenberger et al., 1994; Simpson et al., 2008). In addition, the lowest S/V ratio of Fo-Soil could be attributed to the presence of G-condensed lignin type as encountered in gymnosperms (Sarkanen and Ludwig, 1971; Hedges and Mann, 1979; Baucher et al., 1998). These variations can be related to the type of plant-derived phenols: Fo-Soil was sampled in forest containing various plant species including gymnosperms, while Agri-Soil was cultivated only for cereals.

Since the majority of soil phenolic acids originate from vascular plants, especially cereals crop, these components may be a relevant indicator of the plant residue in soils (Sarkanen and Ludwig, 1971). Soil phenolic acids, which are found in lower quantities than in

plants, are commonly quantified by the CuO oxidation (Hedges and Ertel, 1982). However, our results obtained with the THA method demonstrated that the C unit contents in soils were underestimated by the CuO oxidation. The application of the THA method on soils would thus be necessary to better assess the C units in soils, as suggested by Martens (2002) who demonstrated that the THA method was suitable for the determination of phenolic acids in soils.

#### 4.3. Assessment of phenol biomarkers in soil

In soils, the most common phenol biomarkers are derived from the CuO oxidation (Hedges and Ertel, 1982; Kögel, 1986; Kaiser et al., 2008). Changes in the composition of the oxidation products along decomposition of plant residue in soil are reflected by several indicators such as VSC-lignin, the S/V ratios, and the (Ac/Al)<sub>V</sub> and (Ac/Al)<sub>S</sub> ratios. These latter ones would reflect the degree of oxidation of lignin side chains and, therefore, indicate the extent of microbial alteration of lignin (Bierke et al., 2008).

The C units are plant cell wall characteristics that depend on botanical origin and tissue type. Identification of C units in soils could thus be used as an indicator of plant residue in soils (Sarkanen and Ludwig, 1971). More specifically, the proportions of MR-CW bound *p*-coumaric acid were not correlated with the corresponding contents determined in IS-MR using CuO ( $R^2 = 0.22$ ), or THA method ( $R^2 = 0.23$ ). Similarly, no strong correlation could be evidenced for the content of covalently linked ferulic acid ( $R^2 = 0.02$  for CuO and  $R^2 = 0.41$  for THA) (data not shown). The C units as a whole would not be a specific biomarker in soil. Although CuO and THA can disrupt both ether- and ester-linked phenolic acids and (i.e. ester-ether linked phenolic acids), more selective procedure would be helpful to underline relation between cell wall linked phenolic acids and the remaining phenolic components in the soil. Indeed, Martens (2002) showed that ester-linked phenolic acids of the soils from corn and soybean closely reflect the phenolic composition of the respective decomposing plant residues.

The relation between VSC-lignin of MR-CW and the VSC-lignin of IS-MR released by CuO was less pronounced than corresponding S/V ratios, that could be related to the lack of correlation in C units content between MR-CW and IS-MR. In contrast to the V units, the relationship between the S units of MR-CW released by CuO and the S units of IS-MR can be explained by the fact that the syringyl moieties of lignin are more easily biodegradable than the vanillyl moieties (Hatfield et al., 1994; Bertrand et al., 2006). The (Ac/Al)<sub>V,S</sub> ratios of IS-

MR determined by CuO were higher than those of MR-CW, that is in agreement with Hedges et al. (1988) who showed that increased  $(Ac/Al)_{V,S}$  ratios in degraded lignin, compared to fresh lignin, are indicative of the oxidative decomposition of lignin and the rate of loss of CuO oxidation products upon lignin biodegradation. However, the  $(Ac/Al)_{V,S}$  of IS-MR did not significantly differ to those of ICS, and were not correlated with those of MR-CW suggesting they could not serve as biomarkers in the present study. From all potential phenol biomarkers characterized by the CuO oxidation in soil organic matter, the S/V ratio seemed to be the most relevant.

The present paper reports on the capability of the thioacidolysis to be applied, for the first time, to soil samples. Thioacidolysis was already used to characterize the main source of plant-derived organic matter in river suspension samples (Pepe et al., 1995). In this study, relationships between the phenol composition of MR-CW and IS-MR characterized by thioacidolysis were assessed in the same way than with the CuO oxidation. Compared with the CuO oxidation, thioacidolysis gives a higher correlation coefficient between the S/V ratio of MR-CW and the S/V ratio of IS-MR. Furthermore, the slope characterizing this relationship is less pronounced than these for the CuO oxidation, indicating that thioacidolysis is the more sensitive method to detect the low level of the non-condensed structures of lignin in soil organic matter. Although the lignin recovery yield is less important using thioacidolysis than the CuO oxidation for soil samples this chemical reaction may offer the possibility to better identify the non-condensed structures of lignin in soil, which are more susceptible to biodegradation than condensed structures. The identification of lignin biomarkers should be assessed performing thioacidolysis on a larger range of soils.

### **Acknowledgements**

This study was financially supported by the Champagne-Ardenne region and INRA. The authors wish to thank G. Alavoine, D. Cronier, C. Becker, M. Vandionant and L. Carenjot for their technical assistance, and Y. Barrière and B. Zeller for providing the plant and soil material.

---

**References**

- Adler, T., 1977. Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Science and Technology* 11 : 69-218.
- Amelung, W., Zech, W., Zhang, X. D., Sajjapongse, A., Niamskul, C., 1998. Lignin and carbohydrates in soils under secondary forest, alley-cropping, and continuous farming, Thailand. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 161: 297-302.
- Bahri, H., Dignac, M. F., Rumpel, C., Rasse, D. P., Chenu, C., Mariotti, A., 2006. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1977-1988.
- Bahri, H., Rasse, D. P., Rumpel, C., Dignac, M. F., Bardoux, G., Mariotti, A., 2008. Lignin degradation during a laboratory incubation followed by C-13 isotope analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1916-1922.
- Barrière, Y., Ralph, J., Méchin, V., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Argillier, O., Chabbert, B., Lapierre, C., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 847-860.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 125-197.
- Bernard Vailhé, M.A., Besle, J.M., Maillot, M. P., Cornu, A., Halpin, C., Knight, M., 1998. Effect of down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on cell wall composition and on degradability of tobacco stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 505-514.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil*, 281: 291-307.
- Bierke, A., Kaiser, K., Guggenberger, G., 2008. Crop residues management effects on organic matter in paddy soils - The lignin component. *Geoderma*.
- Billa, E., Tollier, M. T., Monties, B., 1996. Characterisation of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72: 250-256.
- Boudet, A. M., Lapierre, C., Grimapettenati, J., 1995. Tansley Review No-80 - Biochemistry and Molecular-Biology of Lignification. *New Phytologist* 129: 203-236.

- Carrera, A.L., Bertiller, M.B., Larreguy, C., 2008. Leaf litterfall, fine-root production, and decomposition in shrublands with different canopy structure induced by grazing in the Patagonian Monte, Argentina. *Plant Soil* 311: 39-50.
- Chang, H. M., Allan, G. G., 1971. Oxidation. In: Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. (Eds.) *Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley, New York, pp. 433-485.
- Chen, C., 1992. Nitrobenzene and Cupric Oxide Oxidations. In: Lin S.Y., Dence C.W. (Eds.) *Methods in Lignin Chemistry*. Springer-Verlag, New York, pp. 301-321.
- Cherney, J.H., Cherney, D.J.R., Akin, D.E., Axtell, J.D., 1991. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advance in Agronomy* 46: 157-198.
- Chesson, A., 1997. Plant degradation by ruminants: parallels with litter decomposition in soils. In: Caddish, G., Giller, K.E. (Eds.) *Driven by Nature, Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 47-66.
- Dence, C.W., 1992. *Methods in lignin*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 33-61.
- Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Rasse, D.P., Bardoux, G., Balesdent, J., Girardin, C., Chenu, C., Mariotti, A., 2005. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma* 128: 3-17.
- Freudenberg, K., Lautsch, W., Engler, K., 1940. Die Bildung von Vanillin aus Fichtenlignin. *Ber Dtsch Chem Ges* 73: 167-171.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. 1970. *Forage Fiber Analysis*. US Government Printing Office, Washington, DC Agriculture Handbook No. 379, USDA-ARS.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1995. Sources and Reactivities of Marine-Derived Organic-Matter in Coastal Sediments as Determined by Alkaline CuO Oxidation. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 59: 2965-2981.
- Guggenberger, G., Christensen, B. T., Zech, W., 1994. Land-Use Effects on the Composition of Organic-Matter in Particle-Size Separates of Soil .1. Lignin and Carbohydrate Signature. *European Journal of Soil Science* 45: 449-458.
- Hatfield, R. D., Jung, H. J. G., Ralph, J., Buxton, D. R., Weimer, P. J., 1994. A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65: 51-58.
- Hedges, J. I., Parker, P. L., 1976. Land-derived organic matter in surface sediments from the Gulf of Mexico. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 40: 1019-1029.
- Hedges, J. I., Mann, D. C., 1979. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 43: 1803-1807.

- Hedges, J. I., Ertel, J. R., 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54: 174-178.
- Hedges, J. I., Blanchette, R. A., Weliky, K., Devol, A. H., 1988. Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 52: 2717-2726.
- Heim, A., Schmidt, M. W. I., 2007. Lignin is preserved in the fine silt fraction of an arable Luvisol. *Organic Geochemistry* 38: 2001-2011.
- Hepditch, M. M., Thring, R. W., 1997. Alkaline cupric oxide and nitrobenzene oxidation of Alcell (R) lignin. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 75: 1108-1114.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29: 733-737.
- Jacquet, G., Pollet, B., Lapiere, C., 1995. New Ether-Linked Ferulic Acid-Coniferyl Alcohol Dimers Identified in Grass Straws. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2746-2751.
- Jung, H. G., Deetz, D.A., 1993. Cell wall lignification and degradability. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.315-346.
- Kalbitz, K., Kaiser, K., Bargholz, J., Dardenne, P., 2006. Lignin degradation controls the production of dissolved organic matter in decomposing foliar litter. *European Journal of Soil Science* 57: 504-516.
- Kögel, I., 1986. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 589-594.
- Kuc, J., Nelson, O. E., 1964. The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize. *Archives of biochemistry and biophysics* 105: 103-113.
- Lapiere, C., Monties, B., Rolando, R., 1986. Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung* 40, 113-119.
- Lapiere, C., Tollier, M.T., Monties, B., 1988. A new type of constitutive unit in lignins from the corn bm3 mutant. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 307: 723-728.
- Lapiere, C., 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.133-166.
- Martens, D. A., 2002. Identification of phenolic acid composition of alkali-extracted plants and soils. *Soil Science Society of America Journal* 66: 1240-1248.



- Monties, B., 1984. Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: Influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie*, 4, 387-392.
- Otto, A., Simpson, M. J. 2006. Evaluation of CuO oxidation parameters for determining the source and stage of lignin degradation in soil. *Biogeochemistry* 80: 121-142.
- Pepe, C., Scribe, P., Dagaut, J., Nallard, M. A., Pollet, B., Lapierre, C., 1995. Lignin Signature in River Suspension by Capillary Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of Thioacidolysis Products. *Analysis* 23: 114-116.
- Pepper, J. M., Casselman, B. W., Karapally, J.C., 1967. Lignin oxidation. Preferential use of cupric oxide. *Canadian Journal of Chemistry* 45: 3009-3012.
- Poirier, N., Derenne, S., Balesdent, J., Mariotti, A., Massiot, D., Largeau, C., 2003. Isolation and analysis of the non-hydrolysable fraction of a forest soil and an arable soil (Lacadee, southwest France). *European Journal of Soil Science* 54: 243-255.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Jung, H.G., 1993. The importance of cell wall cross-linking. *Plant Chemistry*, 38-44.
- Rolando, C. M., B., Lapierre, C., 1992. Thioacidolysis. In: *Methods in lignin chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 334-339.
- Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H., 1971. Definition and nomenclature. In: Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. (Eds.) *Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience, New York, pp. 1-18.
- Simpson, M. J., Otto, A., Feng, X. J., 2008. Comparison of solid state carbon 13 nuclear magnetic resonance and organic matter biomarkers for assessing soil organic matter degradation. *Soil Science Society of America Journal* 72: 268-276.
- Sun, R., Lawther, J. M., Banks, W. B., 1995. The effect of alkaline nitrobenzene oxidation conditions on the yield and components of phenolic monomers in wheat straw lignin and compared to cupric(II) oxidation. *Industrial Crops and Products* 4: 241-254.
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L.-F., Takabe, K., 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.201-270.
- Van Soest, P. J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the A.O.A.C.* 46: 829-835.
- Vignols, F., Rigau, J., Torres, M. A., Capellades, M., Puigdomenech, P., 1995. The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* 7: 407-416.

# **CHAPITRE 6**

## **Discussion générale et perspectives**



## Discussion générale et perspectives

### 1. Discussion générale

Pour conclure ce travail, il est nécessaire de revenir sur quelques points de la démarche d'étude qui peuvent être discutés et dont les limites doivent être abordées. Sans négliger ces limites, une synthèse des acquis de ce travail est présentée. Enfin, les perspectives amenées par ces conclusions seront envisagées.

#### Intérêts et limites de la démarche expérimentale adoptée

La plupart des études visant à relier les caractéristiques chimiques des résidus végétaux à leurs vitesses de minéralisation du C dans les sols s'appuient sur une modulation de la qualité chimique initiale des résidus en comparant les résidus de plusieurs espèces végétales, ou plusieurs organes d'une même plante. Cependant, cette démarche présente un inconvénient majeur puisque la décomposition de ces résidus dépend alors non seulement de leur qualité chimique mais également de leur architecture tissulaire dont l'impact sur la biodégradation est non négligeable (Jung and Allen, 1995). Notre démarche a été différente dans la mesure où nous avons décorrélé ces deux composantes en prenant en compte un seul organe d'une même espèce : les racines de maïs. Afin de s'affranchir des variations de l'architecture tissulaire nous avons retenu un matériel végétal présentant une qualité chimique contrastée, tout autre paramètre égal par ailleurs. Pour moduler la qualité chimique des racines, nous avons tiré profit de la variabilité génétique du maïs en disposant, en plus de variétés hybrides de maïs, de deux lignées parentales F2 et F292 et leurs mutants brown midrib (bm1, 2, 3 et 4 respectifs (cf. annexe 1). Ces mutants bm ont en effet été caractérisés dans les études de digestibilité des fourrages par les ruminants (Barrière et al., 2004). Les racines de ces différents génotypes montrent des variations significatives de composition chimique, certaines de ces caractéristiques ont été déterminantes pour identifier des critères de qualité explicatifs de la décomposition dans le sol. D'autres plantes modèles comme le blé ne permettaient pas de disposer d'un tel matériel.

Par rapport aux hypothèses de travail (cf. Chapitre 1) justifiant le choix des résidus végétaux retenus pour cette étude, le premier résultat significatif de ce travail est d'abord l'obtention des cinétiques de minéralisation du C très contrastées pour les lots de racines de maïs étudiés,

tous incubés en conditions contrôlées au laboratoire et non limitantes en azote. En effet, au vu de la littérature, rien ne permettait d'affirmer que les cinétiques de minéralisation du C seraient si différentes (de 42% à 70% du C apporté après 800 jours d'incubation). Ce résultat a donc conforté notre stratégie expérimentale, en faisant l'hypothèse dès le début de ce travail, de l'importance des caractéristiques pariétales sur les cinétiques de minéralisation du C. La richesse des racines en parois cellulaires (> à 80% de la matière sèche) a permis d'évaluer le rôle de leur qualité chimique sur la décomposition.

Partant de ce premier résultat, nous avons caractérisé de façon approfondie la composition chimique des polysaccharides pariétaux et les composés phénoliques (lignines et acides phénoliques) de ces racines, en s'appuyant sur les compétences du laboratoire spécialisé en analyse pariétale. Ces analyses ont toutes été réalisées sur la fraction NDF après extraction du soluble Van Soest, c'est-à-dire sur des parois cellulaires. Nous avons montré que certaines caractéristiques pariétales (teneur en lignine et en acides phénoliques) influençaient la minéralisation du C à moyen et long terme. Cependant, nous avons également montré qu'elles n'étaient pas déterminantes sur le court terme, contrairement à la fraction soluble qui est significativement corrélée à la minéralisation du C sur les 14 premiers jours d'incubation. Pour d'autres problématiques (par exemple les effets à court terme des cinétiques de décomposition sur la disponibilité des nutriments dans les sols), une analyse de la fraction soluble des résidus végétaux permettrait de mieux caractériser son rôle sur la décomposition à court terme. La prise en compte de la composition de la fraction soluble, comme les sucres cyto-solubles, permettrait aussi de suivre des biomarqueurs de la colonisation microbienne au cours des premières étapes de la décomposition *via* soit les quantités d'acides uroniques soit des rapports plus classiques tels hexoses/pentoses (Murayama, 1984 ; Karroum et al., 2005). Ce type d'information aurait permis de renseigner les phénomènes associés aux expérimentations réalisées en dynamique (cf. chapitre 3) où les variations des monomères de sucres pariétaux n'expliquent pas à eux seuls la minéralisation du C, même à court terme (112 jours). En outre, certains composés comme les acides uroniques, bien que minoritaires dans les parois de racines (moins de 3% de la paroi) peuvent être synthétisés par les microorganismes (Sutherland, 2005). La caractérisation de ces sucres acides dans la fraction soluble aurait éventuellement permis de relier leur quantité à des taux de colonisation des racines par des microorganismes (Chapitre 2).

En conclusion, l'absence d'analyse de la qualité de la fraction soluble des racines, en particulier au niveau des sucres solubles, peut apparaître limitante dans notre étude.

Néanmoins, cette absence d'information peut être relativisée parce que (i) la teneur en soluble est relativement faible par rapport à celle des parties aériennes (environ 20% de la masse sèche), et (ii) parce que les sucres solubles sont probablement minéralisés assez rapidement comme le montre Bertrand et al. (2009), et que les vitesses de minéralisation des parois sont pratiquement indépendantes de celles de la fraction soluble (Magid et al., 2004).

La qualité chimique des racines a été déterminée par la méthode de fractionnement Van Soest et par une combinaison de différentes méthodes d'hydrolyse des parois cellulaires. La méthode Van Soest, couramment utilisée pour caractériser la composition chimique des résidus végétaux, a l'avantage d'être standardisée, quantitative et relativement simple à mettre en œuvre. Cette méthode permet de quantifier différentes fractions d'un résidu végétal par leur degré de récalcitrance à l'attaque chimique. En revanche, l'analyse que nous qualifierons d'approfondie de la qualité chimique des résidus végétaux correspond à une évaluation directe des composants chimiques, raison pour laquelle les résultats obtenus diffèrent de ceux obtenus par une analyse proximale de type Van Soest (en plus de ne porter que sur la fraction pariétale du résidu). C'est précisément le cas avec les racines étudiées dont les compositions varient selon la méthode utilisée, notamment pour les fractions hémicelluloses et lignines. De plus, l'analyse de la composition chimique des parois cellulaires a permis de mettre en évidence le rôle de composants pariétaux spécifiques dans la décomposition notamment l'acide p-coumarique estérifié, ce qui n'est pas possible à travers l'analyse proximale. La composition monomérique des polysaccharides pariétaux et des lignines ainsi que la caractérisation des acides phénoliques a permis d'améliorer notre compréhension des déterminants chimiques de la décomposition dans les sols. Cependant, nous avons montré que la lignine caractérisée par la méthode Van Soest donnait une meilleure approximation de la décomposition par rapport à la lignine Klason. Cette fraction refléterait ainsi la récalcitrance à la décomposition en accord avec les conclusions des travaux menés sur la digestibilité des fourrages.

Sur le court terme, il est possible de récupérer des résidus végétaux dans le sol afin de suivre l'évolution de leur qualité chimique au cours de la décomposition. C'est la démarche que nous avons suivie dans le chapitre 3 pour identifier des déterminants chimiques de la décomposition sur une période de 112 jours d'incubation. Cependant, quand la durée et le taux de décomposition augmentent, les résidus végétaux sont de plus en plus difficiles à extraire de la phase minérale du sol, et leur récupération devient alors impossible sur le long terme. La caractérisation de la qualité chimique des résidus décomposés ne peut alors

s'effectuer que dans le mélange sol-résidus. Dans cette étude, nous avons choisi l'identification de biomarqueurs de lignine dans le sol (cf. chapitre 5) après décomposition des racines sur une période de 800 jours. L'oxydation à l'oxyde de cuivre (CuO) est la méthode couramment utilisée par les scientifiques travaillant sur la matrice sol pour caractériser les composés phénoliques dans le sol (Hedges and Ertel, 1982). La teneur en lignine totale des sols est communément représentée par la somme des teneurs en monomères V, S et C (VSC-lignine) caractérisée par l'oxydation au CuO. Cependant, la teneur en VSC-lignine ne représente en réalité qu'une fraction de la lignine totale (principalement non-condensée) (Chen, 1992). De plus, la plupart des travaux appliquant cette méthode aux sols ne prennent pas ou peu en compte les connaissances acquises dans le domaine de la chimie des parois végétales et qui ont d'ailleurs conduit les biochimistes à développer d'autres méthodes de dosage des monomères de lignines. Ce constat nous a conduits à comparer différentes méthodes de dosage des monomères de lignine dans les sols : l'oxydation au CuO ; l'oxydation au nitrobenzène et la thioacidolyse. Dans un premier temps, nous avons évalué et comparé la sensibilité de ces méthodes à la quantité de carbone organique apportée dans deux types de sol contrastés dans leur teneurs en carbone organique, et dans lesquels des quantités croissantes de matériel végétal ont été ajoutées. Nous avons montré qu'aucune méthode ne permettait de quantifier correctement les monomères de lignines dans les sols dans le cas où les quantités plus faibles de matériel végétal ont été ajoutées, et ce, probablement à cause des fortes interférences entre les minéraux du sol et les réactifs chimiques. Nous nous sommes ensuite questionnés sur la pertinence d'utiliser les acides hydroxycinnamiques (unités C), ne faisant pas partie intégrante de la lignine, comme biomarqueurs de lignine dans les sols. Ces molécules, d'origine végétale et retrouvées en faibles concentrations dans les sols, apparaissent comme de parfaits biomarqueurs de composés phénoliques dans les sols. Cependant, nous avons montré que la quantité des unités C est sous-estimée après oxydation au CuO ou au nitrobenzène par rapport à l'application d'une hydrolyse alcaline totale. Les unités C sont effectivement partiellement dégradées avec les deux premières méthodes oxydatives, rendant leur quantification inexacte. De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence que les unités C étaient un biomarqueur dans notre étude, aucune relation n'ayant pu être établie entre leur teneur dans les racines non décomposées et celle des mélanges de sol-résidus.

L'adaptation de la thioacidolyse pour la première fois sur une matrice sol a permis de caractériser des biomarqueurs spécifiques des structures non-condensées des lignines des racines décomposées. Nous avons montré une forte corrélation entre le rapport S/V initial des

racines et le rapport S/V des mélanges de sol avec les racines décomposées en accord avec les résultats obtenus par oxydation au CuO. Nous avons également montré que la thioacidolyse était plus sensible que la CuO pour suivre l'évolution de la fraction non-condensée des lignines dans le sol. Cependant, dans le cas des racines présentant les minéralisations cumulées du C apporté les plus élevées après 800 jours d'incubation, la mise en évidence de ces biomarqueurs n'a pas été possible. Les structures non-condensées des lignines, plus sensibles à la biodégradation et quantitativement moins importantes que les structures condensées, peuvent être majoritairement minéralisées à long terme, ne permettant plus de suivre ces structures dans le sol avec cette méthode.

### **Apports à la connaissance de la qualité chimique des racines et de son rôle sur leur décomposition dans le sol**

Cette étude a permis d'identifier plusieurs critères de qualité chimique des racines qui influencent leur décomposition dans le sol. Les travaux menés sur le suivi de l'évolution de la qualité chimique des racines de quatre génotypes au cours de la décomposition (cf. chapitre 3), puis validés par l'analyse approfondie de la composition chimique initiale des racines des seize génotypes (cf. chapitre 4), ont confirmé le **rôle de la fraction soluble** sur la minéralisation du C à court terme, et la **relation négative entre la teneur en lignine et la minéralisation du C à moyen et long terme**. La fraction lignifiée des résidus végétaux demeure le principal critère explicatif dans leur biodégradation dans le sol ou le rumen (Müller et al., 1988 ; Barrière et al., 2004). L'analyse de la composition monomérique des lignines des racines n'a pas mis en évidence de déterminant à l'échelle moléculaire de la décomposition, alors qu'une étude récente menée sur la digestibilité des fourrages a suggéré que le rapport S/G des lignines était un des critères de qualité explicatifs de la biodégradation des résidus végétaux (Méchin et al., 2005). Par contre, l'analyse approfondie de la composition chimique des parois cellulaires des racines nous a permis de montrer que la prise en compte de l'**acide p-coumarique estérifié**, améliore la prédiction de la décomposition des racines dans le sol. Ces résultats ont été notamment obtenus en prenant en compte l'ensemble des génotypes avec en particulier la ligné F2 et le mutant correspondant bm1,

Nous avons mis en évidence une relation positive entre la teneur de cet acide et la décomposition. L'acide *p*-coumarique étant préférentiellement estérifié aux lignines, et la lignine apparaissant comme le premier composant des parois limitant la décomposition, cette



relation positive pourrait révéler l'existence d'agencements des polymères pariétaux plus aptes à la décomposition. Le **rôle des interactions entre les polymères pariétaux** a, jusque là, été peu pris en compte dans les études menées sur la décomposition des résidus végétaux dans le sol (Bertrand et al., 2006). L'acide férulique éthérifié est un des acteurs principaux de la réticulation des constituants pariétaux. Une relation négative entre la teneur de cet acide éthérifié et la décomposition n'a toutefois été révélée qu'aux derniers stades d'incubation des racines. Le prolongement des expérimentations au-delà de la période d'étude (800 jours) permettrait d'évaluer la contribution de ces structures dans la minéralisation à plus long terme.

Nous avons montré que la teneur en azote des racines avant décomposition était inversement corrélée à la minéralisation du C à moyen et long terme. Ces résultats nous ont conduit à nous interroger sur la nature et l'origine de l'azote organique dans les racines. Nous avons montré que **la teneur en azote des racines résulte** non seulement des conditions de nutrition azotée et du métabolisme azoté des plantes au cours de leur croissance mais également **de la présence de microorganismes colonisateurs** riches en azote organique. Ces microorganismes représentent une source d'azote importante (estimée jusqu'à 37% de l'azote total dans le cas des racines les plus colonisées) qui modifie considérablement des caractéristiques globales telles le C/N des racines. En outre, les racines colonisées contenant une moindre proportion de polysaccharides pariétaux par rapport aux racines non colonisées, la présence de ces microorganismes et la teneur en azote des résidus colonisés pourraient refléter la dégradation partielle des racines par les microorganismes colonisateurs. A notre connaissance, cette question sur l'origine de l'azote dans les racines n'a jamais été soulevée dans le contexte de la décomposition des matières organiques dans les sols. Le rapport C/N est effectivement un critère qualitatif fréquemment utilisé dans les modèles (Vanlauwe et al., 1996 ; Probert et al., 1998, Nicolardot et al., 2001). Notre étude montre que l'azote microbien diminue significativement le C/N « apparent » des racines, ce qui pourrait expliquer les difficultés rencontrées lors de la simulation des biotransformations du carbone et de l'azote de ces organes (Abiven et al., 2005). L'amélioration de la prévision de la décomposition des racines avec ce type de modèle pourrait dépendre de l'identification de facteurs de correction du C/N des racines en prenant en compte l'impact des microorganismes sur la teneur en azote et en carbone des racines colonisées.

La prévision des taux de minéralisation du C a été basée sur des relations établies entre les caractéristiques chimiques des résidus et les cumuls et vitesses de minéralisation du C en utilisant des corrélations simples et la régression multiple *pas à pas*. Cependant, ces méthodes statistiques ont leurs limites. Lorsque le nombre de variables explicatives est important, ce qui est le cas dans cette étude, nombre de ces variables sont susceptibles d'être fortement corrélées entre elles. Par exemple, c'est le cas - bien connu - de la relation entre l'azote et les polyphénols, ces derniers étant fortement complexés aux protéines (Kraus et al., 2003 ; Mutabaruka et al., 2007). La régression multiple n'est alors pas la plus appropriée pour estimer les coefficients de régression du modèle de prévision à cause de la présence de multi-colinéarité entre les variables explicatives (Ruffo et al., 2003). La régression *pas à pas* (stepwise regression) permet une sélection automatique des variables et est couramment utilisée pour prédire la dégradabilité des résidus en fonction de leur qualité chimique intrinsèques que ce soit dans le sol ou dans le rumen (Trinsoutrot et al., 2000 ; Méchin et al., 2005). Cependant, le problème de multi-colinéarité entre les variables explicatives persiste avec cet outil, ce qui induit une surévaluation de la variance des paramètres estimés et une instabilité statistique du modèle (Ruffo et al., 2003). Pour remédier à ce problème, des outils statistiques ont été développés. La régression sur composante principale, peu utilisée dans notre domaine d'étude, est un outil recommandé lorsque les variables explicatives sont nombreuses et/ou fortement corrélées entre elles (Lebart et al., 2000). Brièvement, le principe revient à remplacer les variables explicatives par leurs composantes principales. Les composantes principales étant non corrélées entre elles, le problème de multi-colinéarité est éliminé. Il est possible ensuite d'exprimer les résultats de la régression en fonction des variables initiales. Cet outil pourrait être utilisé pour valider ou non les modèles de prévision caractérisés dans cette étude. Des analyses préliminaires ont été effectuées mais n'ont pu être menées à terme par manque de temps.

La modélisation de la minéralisation du C des racines a été réalisée dans un objectif de prédiction de la stabilisation du carbone à long terme; elle a également été utilisée pour identifier des critères de qualité chimique des racines. En utilisant le modèle RothC (Coleman and Jenkinson, 1996), nous avons simulé correctement la plupart des cinétiques de minéralisation du C en optimisant le paramètre DPM/RPM décrivant la qualité chimique des résidus végétaux dans ce modèle, sauf dans le cas des racines les plus récalcitrantes à la décomposition pour lesquelles le modèle surestime fortement la minéralisation du C après 300 jours de décomposition (racines de F2bm1, F2bm2, et F2bm3). Dans ces cas précis, nous

supposons que la présence de microorganismes dans les racines (démontrée pour F2bm1 dans le chapitre 2, et supposée pour les autres génotypes) pourrait biaiser la représentation de la qualité chimique des racines colonisées dans le modèle comme nous l'avons discuté précédemment.

Quelle signification biologique peut-on donner au paramètre DPM/RPM à partir de nos résultats ? D'après le modèle, il semble que les racines puissent être systématiquement caractérisées par une fraction plus récalcitrante à la biodégradation (le compartiment « RPM », ayant une constante  $k = 0.57 \text{ an}^{-1}$ ) plus importante que la fraction plus labile (le compartiment « DPM », ayant une constante  $k = 19.57 \text{ an}^{-1}$ ). L'attribution du carbone des racines dans le compartiment RPM représente en moyenne 63% du C total, et peut atteindre 89% du C total dans le cas des racines les plus récalcitrantes à la décomposition (cf. chapitre 4). Etant donné que la fraction soluble représente environ 20% de la masse sèche des racines, cela signifierait dans l'absolu que la totalité du carbone des parois cellulaires ainsi que la moitié du carbone de la fraction soluble constituent le compartiment RPM. Pour les racines les plus récalcitrantes à la décomposition (et mal simulées par Roth C), nous avons fait l'hypothèse que ceci était dû au fait qu'elles étaient colonisées et partiellement dégradées par les microorganismes avant décomposition. Les compartiments DPM et RPM de ces racines modifiées du point de vue chimique, pourraient avoir des constantes de vitesse de décomposition ( $k$ ) plus faibles que celles des compartiments DPM et RPM des racines non colonisées. Pour améliorer les simulations des cinétiques de minéralisation du C des racines, et plus particulièrement celles des racines les plus récalcitrantes à la décomposition, il nous semble nécessaire de réévaluer d'autres paramètres du modèle, tels que les constantes des vitesses de minéralisation du C.

Pour la première fois, nous avons évalué en détail le rôle de la qualité chimique des racines de maïs sur la décomposition dans le sol. Nous devons nous demander si les critères de qualité chimiques proposés pour expliquer la décomposition de ces racines sont transposables à d'autres résidus végétaux. D'une part, il nous semble que les caractéristiques chimiques telles que les teneurs en soluble et lignine (obtenues par des analyses globales), soient des critères pouvant s'appliquer à des racines d'autres espèces, et à d'autres organes, comme cela a déjà été montré dans la littérature (cf. chapitre 1). D'autre part, l'analyse approfondie de la composition chimique des parois cellulaires a mis en évidence le rôle des acides phénoliques, composés caractéristiques des parois de graminées. Par conséquent, ce critère de qualité chimique ne pourra pas être un déterminant de la décomposition des résidus

végétaux qui n'en contiennent pas ou peu. D'autres composants de liaison (par exemple les acides uroniques) pourraient jouer le même rôle (Sarkanen and Ludwig, 1971).

## **2. Perspectives**

### **La fraction soluble des résidus végétaux ?**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'étude du rôle de la fraction soluble dans la décomposition des résidus végétaux mériterait d'être approfondie. Si les différences de taux de minéralisation des racines sont principalement liées aux caractéristiques chimiques des parois cellulaires à long terme (800 jours), à court terme (0-40 jours) la minéralisation était mieux prédite en tenant aussi compte de la fraction soluble du carbone. Le rôle de la qualité chimique des racines sur leur décomposition à court terme dans le sol pourrait donc être mieux évalué en précisant la qualité chimique de la fraction soluble, notamment par la caractérisation des sucres solubles (Bertrand et al., 2009).

Une étude sur les organes aériens, s'appuyant sur le même type de démarche (par exemple utiliser la variabilité génétique des parties aériennes de maïs) serait justifié par l'importance relative de la fraction soluble pour ces organes par rapport aux racines (Carrera et al., 2008). Des travaux menés au laboratoire sur la décomposition dans le sol de litières tropicales, riches en composés solubles récalcitrants à la décomposition (polyphénols, tannins), montrent que la fraction soluble n'est pas toujours associée à une forte biodégradabilité (Bertrand et al., 2008). Au même titre que les parois cellulaires des racines utilisées dans ce travail, la composition chimique de la fraction soluble des résidus végétaux peut être très variable en fonction de l'espèce et avoir un impact significatif sur la décomposition à court terme.

### **... et l'architecture tissulaire des résidus végétaux ?**

Cette étude s'est fortement appuyée sur les travaux relatifs à la digestibilité des fourrages par les ruminants. Ces études montrent que non seulement la qualité chimique, mais également l'architecture tissulaire des résidus végétaux est un des déterminismes de la biodégradation (Jung and Allen, 1995 ; Travis et al., 1996). L'étude réalisée par Travis et al. (1996) montre que l'épaisseur et la densité de l'épiderme, ainsi que l'épaisseur du sclérenchyme sont des caractéristiques anatomiques influençant la dégradation des hémicelluloses du blé et de l'orge par les microorganismes du rumen. Actuellement, seuls quelques travaux préliminaires menés au laboratoire ont mis en évidence le rôle de certains critères caractérisant l'architecture tissulaire sur la décomposition des résidus végétaux dans

le sol (Bertrand et al., 2006). Un prolongement intéressant à nos travaux consisterait à suivre l'évolution de l'architecture tissulaire des racines dont la qualité chimique évolue distinctement au cours de la décomposition. Il s'agirait de prendre en compte les mesures d'épaisseur de parois cellulaires de racines non décomposées (cf. annexe 2) et de suivre l'évolution de la morphologie des cellules au cours de la décomposition, tout en reliant ces informations à l'évolution de la composition des fractions cyto-soluble et pariétale. Nous avons montré que l'architecture tissulaire des racines avant décomposition était similaire entre les lignées mutantes (bm) et non mutantes, contrairement à leur composition chimique. Au cours de la décomposition, les caractéristiques chimiques des différentes racines pourraient influencer l'évolution de l'architecture tissulaire, devenant alors un autre critère déterminant la décomposition des racines dans le sol.

Notre démarche expérimentale nous a amené à nous affranchir des variations de l'architecture tissulaire pour identifier le rôle de la composition chimique des résidus végétaux sur la décomposition. Une démarche inverse visant à utiliser des organes différents ayant des compositions chimiques globales proches nous permettrait d'évaluer l'impact des variations de l'architecture tissulaire sur la hiérarchie des critères de qualité chimique identifiés dans nos travaux. Mais la sélection d'un tel échantillon de matériel végétal n'est pas aisée.

### **D'autres biomarqueurs de qualité chimique dans le sol ?**

Nous avons évalué l'impact de la qualité chimique initiale des racines sur la qualité de la matière organique du sol à travers l'identification de biomarqueurs de lignine. Cependant, d'autres biomarqueurs pourraient être caractérisés. La qualité de la matière organique du sol peut dépendre de nombreux composants constitutifs des résidus végétaux tels que les sucres, les lipides, etc... (Murayama, 1984 ; Martens et al., 2004). Les sucres représentent les composants majoritaires des racines et pourraient significativement influencer la qualité chimique de la matière organique du sol à moyen et long terme. A cet égard, le rôle des interactions entre hémicelluloses et lignine *via* l'estimation des formes éthérifiées de l'acide férulique d'une part et la contribution des arrangements pariétaux impliquant des lignines estérifiées à l'acide *p*-coumarique d'autre part pourraient être précisés par la recherche de biomarqueurs associés dans le cadre d'expérimentations menées à plus long terme.

### **Continuer sur la modélisation...**

Le volet modélisation n'a été que partiellement abordé dans ce travail. Cependant, les résultats préliminaires sur la simulation des cinétiques de minéralisation du C des racines avec

le modèle RothC sont encourageants. Nous proposons une paramétrisation de la qualité chimique des racines dans ce modèle (rapport DPM/RPM) qui nécessite tout d'abord d'être testée indépendamment avec d'autres jeux de données disponibles. Il faut également approfondir ce travail en essayant de comprendre pourquoi la simulation demeure imparfaite dans le cas des racines les plus récalcitrantes à la décomposition. Sur la base de notre jeux de données d'autres formalismes de la qualité chimique que le rapport DPM/RPM pourront être évalués pour améliorer la modélisation de la décomposition des racines dans le sol. Le suivi de l'évolution de la qualité chimique des racines au cours de leur décomposition dans le sol a permis de mettre en évidence la dynamique des sucres neutres sur les 112 premiers jours de décomposition (cf. chapitre 3). Ces données pourraient être utilisées pour simuler l'évolution des sucres par le modèle C2SOM (Compound-Specific Simulation of Organic Matter dynamics) qui a pour principal objectif de décrire la dynamique du C des résidus à l'échelle moléculaire (Derrien, 2005). Ce modèle, dérivé du modèle RothC, est actuellement en cours de validation et pourrait servir à mieux comprendre la dynamique des sucres au cours de la décomposition. La simulation des biotransformations du carbone et de l'azote à travers des modèles ayant un formalisme décrivant la qualité chimique des résidus végétaux par leurs fractions Van Soest (par exemple module CANTIS, Garnier et al., 2003) pourrait être réalisée avec les racines de cette étude.

Enfin, nous devons nous demander comment les interactions entre les polymères pariétaux peuvent être traduites dans la représentation de la qualité chimique des résidus dans un modèle.



## Références bibliographiques





- Abiven, S., Recous, S., Reyes, V., Oliver, R., 2005. Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residues in soil and role of their biochemical quality. *Biology and Fertility of Soils* 42, 119-128.
- Adair, E.C., Parton, W.J., Del Grosso, S.J., Silver, W.L., Harmon, M.E., Hall, S.A., Burke, I.C., Hart, S.C., 2008. Simple three-pool model accurately describes patterns of long-term litter decomposition in diverse climates. *Global Change Biology* 14, 2636-3660.
- Adler, T., 1977. Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Science and Technology* 11, 69-218.
- Akin, D. E., 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal* 8, 17-25.
- Akin, D.E., 1993. Perspectives of cell wall biodegradation – session synopsis. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.73-82.
- Amelung, W., Zech, W., Zhang, X.D., Sajjapongse, A., Niamskul, C., 1998. Lignin and carbohydrates in soils under secondary forest, alley-cropping, and continuous farming, Thailand. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 161, 297-302.
- Angers, D.A., Recous, S., 1997. Decomposition of wheat straw and rye residues as affected by particle size. *Plant and Soil* 189, 197-203.
- Bahri, H., Dignac, M.F., Rumpel, C., Rasse, D.P., Chenu, C., Mariotti, A., 2006. Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1977-1988.
- Bahri, H., Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.F., Bardoux, G., Mariotti, A., 2008. Lignin degradation during a laboratory incubation followed by C-13 isotope analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1916-1922.
- Balesdent, J., 1996. The significance of organic separates to carbon dynamics and its modelling in some cultivated soils. *European Journal of Soil Science* 47, 485-493.
- Barcelona, M.J., 1984. TOC determinations in ground water. *Ground Water* 22, 18-24.
- Barriere, Y., Argillier, O., 1993. Brown-midrib genes of maize - a review. *Agronomie* 13, 865-876.
- Barrière Y., Argillier, O., Chabbert, B., Tollier, M.T., Monties, B. 1994. Breeding silage maize with brown-midrib genes. Feeding value and biochemical characteristics. *Agronomie* 14, 15-25.

- Barriere, Y., Ralph, J., Méchin, V., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Argillier, O., Chabbert, B., Lapierre, C., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. II. Lessons from brown-midrib mutants. *Comptes Rendus Biologies* 327, 847-860.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17, 125-197.
- Beaugrand, J., Crônier, D., Thiebeau, P., Schreiber, L., Debeire, P., Chabbert, B., 2004. Structure, chemical composition, and xylanase degradation of external layers isolated from developing wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7108-7117.
- Berg, B., McClaugherty, C., 2003. *Plant litter: Decomposition, humus formation, carbon sequestration*. Springer, Berlin.
- Bernard Vailhé, M.A., Besle, J.M., Maillot, M.P., Cornu, A., Halpin, C., Knight, M., 1998. Effect of down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on cell wall composition and on degradability of tobacco stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76, 505-514.
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil*, 281, 291-307.
- Bertrand I., Alavoine G., Recous S., Roy J., 2008. Decomposition of tropical tree litters: Impact of litter quality on C mineralization kinetics and soil organic matter characteristics. *EUROSOIL*, 25-29 Aout 2008.
- Bertrand, I., Prévot M., Chabbert, B., 2009. Soil decomposition of wheat internodes of different maturity stages: Relative impact of the soluble and structural fractions. *Bioresource Technology* doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.019.
- Bierke, A., Kaiser, K., Guggenberger, G., 2008. Crop residues management effects on organic matter in paddy soils - The lignin component. *Geoderma*.
- Billa, E., Tollier, M. T., Monties, B., 1996. Characterisation of the monomeric composition of in situ wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72, 250-256.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research* 113, 291-299.
- Boudet, M.A., Lapierre, C., Grima-Pettenati, J., 1995. Tansley Review No. 80 Biochemistry and molecular biology of lignification. *The New Phytologist* 129, 203-236.

- Brett, C.T., Waldron, K.W., 1996. The molecular components of the wall. In: Black, M., Charlwood, B. (Eds.) *Physiology and biochemistry of plant cell walls* Chapman & Hall, London, pp. 4-43.
- Brown, L.R., 2008. Plan B 3.0. In: *Mobilizing to save civilization*. Norton, W.W. & Compagny, New York, London, 212p.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., 2005. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters* 46, 5845-5850.
- Cadisich, G., Giller, K.E., 1997. *Driven by Nature*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 409.
- Camiré, C., Côté, B., Brulotte, S., 1991. Decomposition of roots of black alder and hybrid poplar in short-rotation plantings: Nitrogen and lignin control. *Plant soil* 138, 123-132.
- Campbell, L. M., Paul, E. A., Rennie, D.A., McCallum, K.J., 1967. Applicability of the carbon-dating method of analysis to soil humus studies. *Soil Science* 104, 217-224.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.N., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the cell walls during growth. *Plant Journal* 3, 1-30.
- Carrera, A.L., Bertiller, M.B., Larreguy, C., 2008. Leaf litterfall, fine-root production, and decomposition in shrublands with different canopy structure induced by grazing in the Patagonian Monte, Argentina. *Plant Soil* 311, 39-50.
- Cassman, K. G., 1999. Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5952-5959.
- Cellier, P., Germon, J.C., Henault, C., Genermont, S., 1997. Les émissions d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) et d'oxyde d'azote (NO<sub>x</sub> et N<sub>2</sub>O) par les sols cultivés : mécanismes de production et quantification des flux. In : Lemaire, G., Nicolardot, B. (Eds.) *Maîtrise et gestion de l'azote dans les agrosystèmes*, série les Colloques de l'INRA, INRA Editions, Paris, pp. 25-37.
- Chang, H.M., Allan, G.G., 1971. Oxidation. In: Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. (Eds.) *Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley, New York, pp. 433-485.
- Chaussod, R., Nicolardot, B., Catroux, G., 1986. Mesure en routine de la biomasse des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du Sol* 2, 201-211.
- Chen, C., 1992. Nitrobenzene and Cupric Oxide Oxidations. In: Lin S.Y., Dence C.W. (Eds.) *Methods in Lignin Chemistry*. Springer-Verlag, New York, pp. 301-321.

- Cherney, D.J.R., Patterson, J.A., Johnson, K.D., 1990. Digestibility and feeding value of pearl millet as influenced by the brown-midrib, low-lignin trait. *J. Anim. Sci.* 68, 4345-4351.
- Cherney J.H., Cherney, D.J.R., Akin, D.E., Axtell, J.D., 1991. Potential of brown-midrib, low-lignin mutants for improving forage quality. *Advance in Agronomy* 46, 157-198.
- Chertov, O. G., Komarov, A. S., Crocker, G., Grace, P., Klir, J., Korschens, M., Poulton, P.R., Richter, D., 1997. Simulating trends of soil organic carbon in seven long-term experiments using the SOMM model of the humus types. *Geoderma* 81, 121-135.
- Cheshire, M.V., Mundie, C.M., Shepard, H., 1973. The origin of soil polysaccharide transformation of sugars during the decomposition in soil of plant material labelled with <sup>14</sup>C. *Journal of Soil Science* 24, 54-68.
- Chesson, A., Gordon, A., Lomax, J.A., 1983. Substituent groups linked by alcali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34, 1330-1340.
- Chesson, A., 1988. Lignin-polysaccharide complexes of the plant cell wall and their effect on microbial degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21, 219-228.
- Chesson, A., 1997. Plant degradation by ruminants: parallels with litter decomposition in soils. In: Caddish, G., Giller, K.E. (Eds). *Driven by Nature. Plant litter quality and decomposition*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 47-66.
- Christman, R., Oglesby, R., 1971. Microbiological degradation and the formation of humus. In: Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H. (Eds.) *Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience, New York, pp. 769-795.
- Clarke, J.H., Hill, S.T., 1981. Mycofloras of moist barley during sealed storage in farm and laboratory silos. *Transactions of the British Mycological Society* 77, 557-565.
- Coleman, D.C., MacFayden, A., 1966. The recolonization of gamma-irradiated soils by small arthropods. *Oikos* 17, 62-70.
- Coleman, K., Jenkinson, D.S., 1995. RothC-26.3 – a model for the turnover of carbon in soil: Model description and users guide. Lawes Agricultural Trust, Harpenden.
- Coleman, K., Jenkinson, D.S., 1996. RothC-26.3 – a model for the turnover of carbon in soil. In: Powelson, D.S., Smith, P., Smith, J.U. (Eds.) *Evaluation of soil organic matter models using existing, long term datasets*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 237-246.
- Constantinides, M., Fownes, J.H., 1994. Nitrogen mineralization from leaves and litter of tropical plants - relationship to nitrogen, lignin and soluble polyphenol concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 49-55.

- Cook, R.J., Boosalis, M.G., Douppnik, B., 1978. Influence of crop residues on plant diseases. In: Oschwald, W.R. (Ed.), *Crop residue Management Systems*, American Society Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 147-163.
- Coppens, F., (2005). Water, carbon and nitrogen dynamics in soil. Influence of crop residue location and quality. Thèse de doctorat, pp. 203.
- Coppens, F., Merckx, R., Recous, S., 2006. Impact of crop residue location on carbon and nitrogen distribution in soil and in water-stable aggregates. *European Journal of Soil Science* 57, 570-582.
- De Ascensao, A.R.F.D.C., Dubery, I.A., 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* 63, 679-686.
- Dence, C.W., 1992. *Methods in lignin*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 33-61.
- Dendooven, L., 1990. Nitrogen mineralization and nitrogen cycling. PhD Thesis, K.U. Leuven, Belgium, pp.180.
- Derrien, D., Marol, C., Balesdent, J., 2007. Microbial biosyntheses of individual neutral sugars among sets of substrates and soils. *Geoderma* 139, 190-198.
- Diels, J., Vanlauwe, B., Van der Meersch, M.K., Sanginga, N., Merckx, R., 2004. Long-term soil organic carbon dynamics in a subhumid tropical climate:  $^{13}\text{C}$  data in mixed C3/C4 cropping and modelling with RothC. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1739-1750.
- Dignac, M.-F., Bahri, H., Rumpel, C., Rasse, D.P., Bardoux, G., Balesdent, J., Girardin, C., Chenu, C., Mariotti, A., 2005. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma* 128, 3-17.
- Dresboll, D.B., Magid, J., 2006. Structural changes of plant residues during decomposition in a compost environment. *Bioresource Technology* 97, 973-981.
- Duiker, S.W., Lal, R., 1999. Crop residue and tillage effects on carbon sequestration in a Luvisol in central Ohio. *Soil and Tillage Research* 52, 73-81.
- Esau, K. 1977. The root: primary state of growth. In: Wiley, J. (Ed.) *Anatomy of Seed Plants*, London, UK, pp. 215-242..
- Fang, C., Smith, P., Smith, J.U., 2005. A simple equation for simulating C decomposition in a multi-component pool of soil organic matter. *European Journal of Soil Science* 56, 815-820.

- Fardeau, J.C., Guiraud, G., Thierry, J., Morel, C., Boucher, B., 1988. Taux annuel de minéralisation de la matière organique des sols de grande culture de Beauce. Conséquence pour l'azote. *Comptes Rendus de l'Académie de l'Agriculture Française* 74, 61-70.
- Fog, K., 1988. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews* 63, 433-462.
- Folin, O., Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 73, 627-649.
- Fontaine, A.S., Bout, S., Barriere, Y., Vermerris, W., 2003. Variation in cell wall composition among forage maize (*Zea mays* L.) inbred lines and its impact on digestibility: Analysis of neutral detergent fiber composition by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 8080-8087.
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature*, 450: doi:10.1038.
- Frankenberger, W.T., Abdelmagid, H.M., 1985. Kinetic parameters of nitrogen mineralization rates of leguminous crop incorporated into soil. *Plant Soil* 87, 257-271.
- Franko, U., 1996. Modelling approaches of soil organic matter within CANDY system. In: Powlson, D.S., Smith, P., Smith, J.U. (Eds.) *Evaluation of soil organic matter models using existing, long term datasets*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 247-254.
- Freudenberg, K., Lautsch, W., Engler, K., 1940. Die Bildung von Vanillin aus Fichtenlignin. *Ber Dtsch Chem Ges* 73, 167-171.
- Garnier, P., Neel, C., Aita, C., Recous, S., Lafolie, F., Mary, B., 2003. Modelling carbon and nitrogen dynamics in a bare soil with and without straw incorporation. *European Journal of Soil Science* 54, 555-568.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. 1970. *Forage Fiber Analysis*. US Government Printing Office, Washington, DC Agriculture Handbook No. 379, USDA-ARS.
- Goñi, M.A., Hedges, J.I., 1995. Sources and Reactivities of Marine-Derived Organic-Matter in Coastal Sediments as Determined by Alkaline CuO Oxidation. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 59: 2965-2981.
- Gorissen, A., Cotrufo, M.F., 2000. Decomposition of leaf and root tissue of three perennial grass species grown at two levels of atmospheric CO<sub>2</sub> and N supply. *Plant and Soil* 224, 75-84.

- Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C., Barriere, Y., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies* 327, 455-465.
- Guggenberger, G., Christensen, B. T., Zech, W., 1994. Land-Use Effects on the Composition of Organic-Matter in Particle-Size Separates of Soil .1. Lignin and Carbohydrate Signature. *European Journal of Soil Science* 45, 449-458.
- Gunnarsson, S., Marstorp, H., Dalhin, A.S., Witter, E., 2008. Influence of non-cellulose structural carbohydrate composition on plant material decomposition in soil. *Biology and Fertility of Soils* 45, 27-36.
- Halpin, C., Holt, K., Chojecki, J., Oliver, D., Chabbert, B., Monties, B., Edwards, K., Barakate, A., Foxon, G.A., 1998. Brown-midrib maize (bm1) – a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *The Plant Journal* 14, 545-553.
- Hamza, M. A., Anderson, W. K., 2005. Soil compaction in cropping systems - a review of the nature, causes and possible solutions. *Soil and Tillage Research* 82, 121-145.
- Harris, P.J., Smith, B.G., 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *International Journal of Food Science and Technology* 41, 129-143.
- Hatfield, R.D., 1993. Cell wall polysaccharide interactions and degradability. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.285-313.
- Hatfield, R.D., Jung, H.J.G., Ralph, J., Buxton, D.R., Weimer, P.J., 1994. A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, 51-58.
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1999. Cell wall structural foundations: Molecular basis for improving forage digestibilities. *Crop Science* 39, 27-37.
- He, L-F., Terashima, N., 1989. Formation and structure of lignin in monocotyledons I. Selective labelling of the structural units of lignin in rice plant (*Oryza sativa*) with  $^3\text{H}$  and visualization of their distribution in the tissue by microautoradiography. *Mokuzai Gakkaishi* 35, 116-122.
- Heal, O.W., Anderson, J.M., Swift, M.J., 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview. In: Cadisch, G., Giller, K.E. (Eds.) *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 3-30.
- Hedges, J.I., Parker, P.L., 1976. Land-derived organic matter in surface sediments from the Gulf of Mexico. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 40, 1019-1029.



- Hedges, J.I., Mann, D.C., 1979. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 43, 1803-1807.
- Hedges, J.I., Ertel, J.R., 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Analytical Chemistry* 54, 174-178.
- Hedges, J.I., Blanchette, R.A., Weliky, K., Devol, A.H., 1988. Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. *Geochemica et Cosmochimica Acta* 52, 2717-2726.
- Heim, A., Schmidt, M.W.I., 2007. Lignin is preserved in the fine silt fraction of an arable Luvisol. *Organic Geochemistry* 38, 2001-2011.
- Henriksen, T.M., Breland, T.A., 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1121-1134.
- Henriksen, T.M., Korsæth, A., Breland, T.A., Stenberg, B., Jensen, L.S., Bruun, S., Gudmundsson, J., Palmason, F., Pedersen, A., Salo, T.J., 2007. Stepwise chemical digestion, near-infrared spectroscopy or total N measurement to take account of decomposability of plant C and N in a mechanistic model. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 3115-3126.
- Hepditch, M.M., Thring, R.W., 1997. Alkaline cupric oxide and nitrobenzene oxidation of Alcell (R) lignin. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 75, 1108-1114.
- Herman, W.A., McGill, W.B., Dormaar, J.F., 1977. Effects of initial chemical composition on decomposition of roots of three grass species. *Canadian Journal of Soil Science* 57, 205-215.
- Hernes, P.J., Hedges, J.I., 2000. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerisation extracts. *Analytical Chemistry* 72, 5115-5124.
- Hopkins, D.W., Webster, E.A., Chudek, J.A., Halpin, C., 2001. Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1455-1462.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry* 29, 733-737.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Meikle Ng, K., Rhodes, D.I., Stone, B.A., 1993. Cell wall biosynthesis and its regulation. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.621-683.

- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., 1994. Covalent cross-links in the cell-wall. *Plant Physiology* 104, 315-320.
- Jackson, N.E., Corey, J.C., Frederick, L.R., Picken, J.C., 1967. Gamma irradiation and the microbial populations of soils at two water contents. *Soil Science Society of America Proceedings* 31, 491-494.
- Jacquet, G., Pollet, B., Lapiere, C., 1995. New Ether-Linked Ferulic Acid-Coniferyl Alcohol Dimers Identified in Grass Straws. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2746-2751.
- Jenkinson, D.S., Rayner, J.H., 1977. The turnover of soil organic matter in some of the rothamsted classical experiments. *Soil Science* 123, 298-305.
- Jenkinson, D.S., Hart, P.B.S., Rayner, J.H., Parry, L.C., 1987. Modelling the turnover of organic matter in long-term experiments. *INTECOL Bulletin* 15, 1-8.
- Jensen, H., 1929. On the influence of carbon:nitrogen ratios of organic material on the mineralization of nitrogen. *J. Agr. Sci.* 19, 71-82.
- Jensen, C., Stougaard, B., Olsen, P., 1994. Simulation of water and nitrogen dynamics at three Danish locations by use of the DAISY model. *Acta Agric. Scand.* 44, 75-83.
- Jensen, L. S., Salo, T., Palmason, F., Breland, T.A., Henriksen, T.M., Stenberg, B., Pedersen, A., Lundstrom, C., Esala, M., 2005. Influence of biochemical quality on C and N mineralisation from a broad variety of plant materials in soil. *Plant and Soil* 273, 307-326.
- Jung, H.G., 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal* 81, 33-38.
- Jung, H.G., Deetz, D.A., 1993. Cell wall lignification and degradability. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.315-346.
- Jung, H.G., Allen, M.S., 1995. Characteristics of plant-cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal of Animal Science* 73, 2774-2790.
- Kalbitz, K., Kaiser, K., Bargholz, J., Dardenne, P., 2006. Lignin degradation controls the production of dissolved organic matter in decomposing foliar litter. *European Journal of Soil Science* 57, 504-516.
- Kamphake, L.J., Hannah, S.A., Cohen, J.M., 1967. Automated analysis for nitrate by hydrazine reduction. *Water Research* 1, 205-216.

- Karroum, M., Guillet, B., Laggoun-Defarge, F., Disnar, J.R., Lottier, N., Villemin, G., Toutain, F., 2005. Evolution morphologique des litières de hêtre (*Fagus sylvatica* L.) et transformation des biopolymères lignine et polysaccharides lors de la genèse des mull et moder en forêt de Fougères (Bretagne, France). *Journal of Canadian Soil Science* 85, 405-416.
- Kato, Y., Nevins, D.J., 1985. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl- $\alpha$ -L-arabinosyl) – (1-4)-D-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-walls. *Carbohydrate Research* 137, 139-150.
- Kögel, I., 1986. Estimation and decomposition pattern of the lignin component in forest humus layers. *Soil Biology and Biochemistry* 18, 589-594.
- Kraus, T.E.C., Yu, Z., Preston, C.M., Dahlgren, R.A., Zasoski, R.J., 2003. Linking chemical reactivity and protein precipitation to structural characteristics of foliar tannins. *Journal of Chemical Ecology* 29, 703-730.
- Krom, M.D., 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *The Analyst* 105, 305-316.
- Kuc, J., Nelson, O.E., 1964. The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize. *Archives of biochemistry and biophysics* 105, 103-113.
- Kuc, J., Nelson, O.E., Flanagan, P., 1968. Degradation of abnormal lignins in the brown-midrib mutants and double mutants of maize. *Phytochemistry* 7, 1435-1436.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1485-1498.
- Ladd, J.N., Amato, M., Grace, P.R., Vanveen, J.A., 1995. Simulation of C-14 turnover through the microbial biomass in soils incubated with C-14-labeled plant residues. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 777-783.
- Lal, R., 2006. Soil and environmental implications of using crop residues as biofuel feedstock. *International Sugar Journal* 108, 161-167.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K., Stone, B.A., 1996. Lignin and hydroxycinnamic acids in walls of brown midrib mutants of Sorghum, pearl millet and maize stems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 174-178.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, R., 1986. Thioacidolysis of poplar lignins : Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung* 40, 113-119.
- Lapierre, C., Tollier, M.T., Monties, B., 1988. A new type of constitutive unit in lignins from the corn bm3 mutant. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 307: 723-728.

- Lapierre, C., 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (Eds.) Forage cell wall structure and digestibility, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.133-166.
- Lebart, L., Morineau, A., Piron, M., 2000. Statistique exploratoire multidimensionnelle, 3<sup>ème</sup> édition, Dunod, pp.439.
- Lemma, B., Nilsson, I., Kleja, D. B., Olsson, M., Knicker, H., 2007. Decomposition and substrate quality of leaf litters and fine roots from three exotic plantations and a native forest in the southwestern highlands of Ethiopia. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2317-2328.
- Lensi, R., Lesure, C., Steinberg, C., Savoie, J.-M., Faurie, G., 1991. Dynamics of residual enzyme activities, denitrification potential, and physico-chemical properties in a  $\gamma$ -sterilized soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 367-373.
- Li, C., 1996. The DNDC model. In: Powlson, D.S., Smith, P., Smith, J.U. (Eds.) Evaluation of soil organic matter models using existing, long term datasets. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 263-268.
- Liebich, J., Schloter, M., Schäffer, A., Vereecken, H., Burauel, P., 2007. Degradation and humification of maize straw in soil microcosms inoculated with simple and complex microbial communities. *European Journal of Soil Science* 58, 141-151.
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Chabbert, B., Recous, S., 2008. Decomposition in soil and chemical changes of maize roots with genetic variations affecting cell wall quality. *European Journal of Soil Science*, accepted.
- Machinet, G.E., Bertrand, I., Chabbert, B., Watteau, F., Villemin, G., Recous, S., submitted for publication. Soil biodegradation of maize root residues: interaction between chemicals characteristics and the presence of colonizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Magid, J., Luxhoi, J., Lyshede, O.B., 2004. Decomposition of plant residues at low temperatures separates turnover of nitrogen and energy rich tissue components in time. *Plant and Soil* 258, 351-365.
- Martens, D.A., 2000. Plant residue biochemistry regulates soil carbon cycling and carbon sequestration. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 361-369.
- Martens, D.A., 2002. Identification of phenolic acid composition of alkali-extracted plants and soils. *Soil Science Society of America Journal* 66, 1240-1248.

- Martens, D. A., Reedy, T. E., Lewis, D.T., 2004. Soil organic carbon content and composition of 130-year crop, pasture and forest land-use managements. *Global Change Biology* 10, 65-78.
- Mary, B., Recous, S., Darwis, D., Robin, D., 1996. Interactions between decomposition of plant residues and nitrogen cycling in soil. *Plant and Soil* 181, 71-82.
- Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., Donnelly, D.M.X., 1997. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry* 45, 405-410.
- McGlaugherty, C., Berg, B., 1987. Cellulose, lignin and nitrogen concentrations as rate regulating factors in late stages of forest litter decomposition. *Pedobiologia* 30, 101-112.
- McMahon, S.K., Williams, M.A., Bottomley, P.J., Myrold, D.D., 2005. Dynamics of microbial communities during decomposition of carbon-13 labeled ryegrass fractions in soil. *SOIL science Society of America Journal* 69, 1238-1247.
- Mechin, V., Argillier, O., Rocher, F., Hebert, Y., Mila, I., Pollet, B., Barriere, Y., Lapierre, C., 2005. In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5872-5881.
- Mellilo, J.M., Aber, J.D., Muratore, J.F., 1982. Nitrogen and lignin control of hardwood leaf litter decomposition dynamics. *Ecology* 63, 621-626.
- Miller, M.E., 1983. Relationships between onion leaf age and susceptibility to *Alternaria porri*. *Plant Disease* 67, 284-286.
- Minderman, G., 1968. Addition, decomposition and accumulation of organic matter in forest. *Journal Ecology* 56, 355-362.
- Molina, J.A.E., Clapp, C.E., Shaffer, M.J., Chichester, F.W., Larson, W.E., 1983. NCSOIL, a model of nitrogen and carbon transformations in soil: description, calibration, and behaviour. *Soil Science Society of America Journal* 47, 85-91.
- Monties, B., 1984. Dosage de la lignine insoluble en milieu acide: Influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie* 4, 387-392.
- Moorhead, D.L., Sinsabaugh, R.L., 2006. A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs* 76, 151-174.
- Moyin-Jesu, E. I., 2007. Use of plant residues for improving soil fertility, pod nutrients, root growth and pod weight of okra (*Abelmoschus esculentum* L). *Bioresource Technology* 98, 2057-2064.

- Müller, M.M., Sundman, V., Soininvaara, O., Meriläinen, A., 1988. Effect of chemical composition on the release of nitrogen from agricultural plant materials decomposing in soil under field conditions. *Biology and Fertility of Soils* 6, 78-83.
- Murayama, S., 1984. Changes in the monosaccharide composition during the decomposition of straws under field conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 30, 367-381.
- Mutabaruka, R., Hairiah, K., Cadisch, G., 2007. Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenol-protein complexes in soils from different land-use histories. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1479-1492.
- Neel, C., 1996. Modélisation couplée du transfert et des transformations de l'azote : paramétrisation et évaluation d'un modèle en sol nu. Thèse de doctorat, Université Paris VI, pp. 254.
- Nicolardot, B., Chaussod, R., Germon, J.C., 1989. Influence of available carbon on biological transformations of nitrogen in agricultural soils. In: Hattory, T. et al. (Eds.) Recent advances in microbial ecology – proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on microbial Ecology, Japan Scientific Society Press, Tokyo, pp.164-168.
- Nicolardot, B., Molina, J.A.E., Allard, M.R., 1994. C and N fluxes between pools of soil organic matter – model calibration with incubations data. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 235-243.
- Nicolardot, B., Mary, B., Houot, S., Recous, S., 1997. La dynamique de l'azote dans les sols cultivés. In : Lemaire, G., Nicolardot, B. (Eds.) Maîtrise et gestion de l'azote dans les agrosystèmes. Série les Colloques de l'INRA, INRA Editions, Paris, pp.87-103.
- Nicolardot, B., Recous, S., Mary, B., 2001. Simulation of C and N mineralization during crop residue decomposition: a simple dynamic model based on the C:N ratio of the residues. *Plant and Soil* 228, 83-103.
- Oades, J. M., 1984. Soil organic matter and structural stability: mechanisms and implications for management. *Plant and Soil* 76, 319-337.
- Oglesby, K.A., Fownes, J.H., 1992. Effect of chemical composition on N mineralization from green manures of seven tropical species. *Plant Soil* 143, 127-132.
- Oorts, K., 2006. Effect of tillage systems on soil organic matter stocks and C and N fluxes in cereal cropping systems on a silt loam soil in Northern France. Thèse de doctorat, pp. 178.
- Otto, A., Simpson, M. J. 2006. Evaluation of CuO oxidation parameters for determining the source and stage of lignin degradation in soil. *Biogeochemistry* 80, 121-142.

- Parr, J.F., Papendick, R.I., 1978. Factors affecting the decomposition of crop residues by microorganisms. In: Oschwald, W.R. (Ed.), *Crop residue Management Systems*, American Society Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 101-129.
- Parton, W.J., Schimel, D.S., Cole, C.V., Ojima, D.S., 1987. Analysis of factors controlling soil organic matter levels in great plains grasslands. *Soil Science Society of America* 51, 1173-1179.
- Paustian, K., Agren, G.I., Bosatta, E., 1997. Modelling litter quality effects on decomposition and soil organic matter dynamics. In: Cadisch, G., Giller, K.E. (Eds.) *Driven by Nature – Plant Litter Quality and Decomposition*. CAB International, Wallingford, UK, pp.313-335.
- Payne, W.J., 1970. Energy yields and growth of heterotrophs. *Annual Review of microbiology* 24, 17-52.
- Pepe, C., Scribe, P., Dagaut, J., Nallard, M. A., Pollet, B., Lapierre, C., 1995. Lignin Signature in River Suspension by Capillary Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of Thioacidolysis Products. *Analysis* 23, 114-116.
- Pepper, J. M., Casselman, B. W., Karapally, J.C., 1967. Lignin oxidation. Preferential use of cupric oxide. *Canadian Journal of Chemistry* 45, 3009-3012.
- Poirier, N., Derenne, S., Balesdent, J., Mariotti, A., Massiot, D., Largeau, C., 2003. Isolation and analysis of the non-hydrolysable fraction of a forest soil and an arable soil (Lacadee, southwest France). *European Journal of Soil Science* 54, 243-255.
- Power, J.F., Gilley, J.E., Wilhelm, W.W., Mielke, L.N., Doran, J.W., 1993. Tillage and crop residue management practices for soil erosion control. In: Wichereck, S. (Ed.) *Temperate Plants Environment and Hills*, pp. 525-533.
- Powlson, D.S., Smith, P., Smith, J.W., 1996. *Evaluation of soil organic matter models*. Springer Verlag, Berlin.
- Preston, R.D., 1986. Natural cellulose. In: Young, R.A., Rowell, R.M. (Eds.) *Cellulose: structure, modification and hydrolysis*. Wiley-Interscience, New York, pp. 3-27.
- Probert, M.E., Dimes, J.P., Keating, B.A., Dala, R.C., Strong, W.M., 1988. Apsims's water and nitrogen modules and simulation of the dynamics of water and nitrogen in fallow systems. *Agricultural Systems* 56, 1-28.
- Puget, P., Drinkwater, L.E., 2001. Short-term dynamics of root- and shoot-derived carbon from a leguminous green manure. *Soil Science Society of America Journal* 65, 771-779.
- Quemada, M., Cabrera, M.L., 1995. Carbon and nitrogen mineralized from leaves and stems of 4 cover crops. *Soil Science Society of America Journal* 59, 471-477.

- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., Jung, H.G., 1993. The importance of cell wall cross-linking. *Plant Chemistry*, 38-44.
- Ralph, J., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1995. Lignin-ferulate cross-links in grasses - active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydrate Research* 275, 167-178.
- Ralph, J., Brunow, G., Boerjan, W., 2007. Lignins. *Encyclopedia of Life Sciences*, pp.1-10.
- Rasse, D.P., Rumpel, C., Dignac, M.F., 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilisation. *Plant and Soil* 269, 341-356.
- Recous, S., Robin, D., Darwis, D., Mary, B., 1995. Soil inorganic N availability: effect on maize residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1529-1538.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17, 208-212.
- Rolando, C. M., B., Lapiere, C., 1992. Thioacidolysis. In: *Methods in lignin chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 334-339.
- Ruffo, M.L., Bollero, G.A., 2003. Residue decomposition and prediction of carbon and nitrogen release rates based on biochemical fractions using principal-component regression. *Agronomy Journal* 95, 1034-1040.
- Sall, S., Bertrand, I., Chotte, J.L., Recous, S., 2007. Separate effects of the biochemical quality and N content of crop residues on C and N dynamics in soil. *Biology and Fertility of Soils* 43, 797-804.
- Sariyildiz, T., Anderson, J.M., 2003. Interactions between litter quality, decomposition and soil fertility: a laboratory study. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 391-399.
- Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H., 1971. Definition and nomenclature. In: Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H. (Eds.) *Lignins. Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience, New York, pp.1-18.
- Sauer, D.B., Storey, C.L., Ecker, O., Fulk, D.W., 1982. Fungi in U.S. export wheat and corn. *Phytopathology* 72, 1449-1452.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* 24, 1359-1362.
- Shimada, M., 1980. Stereobiochemical approach to lignin biodegradation. In: *Lignin biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications* (eds T. K. Kirk, T. Higuchi & H.M. Chang), CRC Press, Boca Raton, pp. 195-215.



- Schöning, I., Kogel-Knabner, I., 2006. Chemical composition of young and old carbon pools throughout Cambisol and Luvisol profiles under forests. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2411-2424.
- Simpson, M.J., Otto, A., Feng, X.J., 2008. Comparison of solid state carbon 13 nuclear magnetic resonance and organic matter biomarkers for assessing soil organic matter degradation. *Soil Science Society of America Journal* 72, 268-276.
- Smith, P., Smith, J.U., Powlson, D.S., McGill, W.B., Arah, J.R.M., Chertov, O.G., Coleman, K., Franko, U., Frolking, S., Jenkinson, D.S., Jensen, L.S., Kelly, R.H., Klein-Gunnewiek, H., Komarov, A.S., Li, C., Molina, J.A.E., Mueller, T., Parton, W.J., Thornley, J.H.M., Withmore, A.P., 1997. A comparison of the performance of nine soil organic matter models using datasets from seven long-term experiments. *Geoderma* 81, 153-225.
- Sommer, S.G., Olesen, J.E., Christensen, B.T., 1991. Effects of temperature, wind speed and air humidity on ammonia volatilization from surface applied cattle slurry. *J. Agric. Sci.* 117, 91-100.
- Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1995. The effect of alkaline nitrobenzene oxidation conditions on the yield and components of phenolic monomers in wheat straw lignin and compared to cupric(II) oxidation. *Industrial Crops and Products* 4, 241-254.
- Sutherland, I.W., 2005. Microbial exopolysaccharides. In : Dimitriu, S. (Ed.) *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility*, second ed. Marcel Dekker, New York, pp. 431-457.
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979. Decomposition in terrestrial ecosystems. *Studies in Ecology Vol 5*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK., pp. 372.
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L.-F., Takabe, K., 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D. and Ralph, J. (Eds.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp.201-270.
- Tester, C.F., 1988. Role of soil and residue microorganisms in determining the extent of residue decomposition in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 915-919.
- Thornley, J.H.M., Verberne, E.L.J., 1989. A model of nitrogen flows in grassland. *Plant cell and Environment* 12, 863-886.
- Tian, G., Kang, B. T., Brussard, L., 1992. Biological effects of plant residues with contrasting chemical-compositions under humid tropical conditions - decomposition and nutrient release. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1051-1060.

- Tian, G., Brussaard, L., Kang, B.T., 1995. An index for assessing the quality of plant residues and evaluating their effects on soil and crop in the (sub-)humid tropics. *Applied Soil Ecology* 2, 25-32.
- Travis, A.J., Murison, S.D., Hirst, D.J., Walker, K.C., Chesson, A., 1996. Comparison of the anatomy and degradability of straw from varieties of wheat and barley that differ in susceptibility to lodging. *Journal of Agricultural Science* 127, 1-10.
- Trevors, J.T., 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* 26, 53-59.
- Trinsoutrot, I., Recous, S., Bentz, B., Lineres, M., Cheneby, D., Nicolardot, B., 2000. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetics under nonlimiting nitrogen conditions. *Soil Science Society of America Journal* 64, 918-926.
- Valentine, R.C., 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Advances in Virus Research* 8, 287.
- Van Soest, P.J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the A.O.A.C.* 46, 829-835.
- Vanlauwe, B., Nwoke, O.C., Sanginga, N., Merckx, R., 1996. Impact of residues quality on the C and N mineralization of leaf and root residues of three agroforestry species. *Plant Soil* 183, 221-231.
- Verberne, E.L.J., 1992. Simulation of nitrogen and water balance in a system of grassland and soil. DLO-Instituut voor Bodemvruchtbaarheid, Haren, pp. 56.
- Vignols, F., Rigau, J., Torres, M.A., Capellades, M., Puigdomenech, P., 1995. The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* 7, 407-416.
- Villemin, G., Mansot, J. L., Watteau, F., Ghanbaja, J., Toutain, F., 1995. Etude de la biodégradation et de l'humification de la matière organique végétale du sol par la spectroscopie des pertes d'énergie d'électrons transmis (EELS : Electron Energy Loss Spectroscopy) : répartition du carbone, de l'azote et évaluation du rapport C/N au niveau ultrastructural in situ. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris IIA* 321, 861-868.
- Von Lützw, M., Kogel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions - a review. *European Journal of Soil Science* 57, 426-445.

- Waksman, S., 1924. Influence of microorganisms upon the carbon-nitrogen ratio in the soil. *J. Agr. Sci.* 14, 555-562.
- Wallace, G., Russell, W.R., Lomax, J.A., Jarvis, M.C., Lapierre, C., Chesson, A., 1995. Extraction of phenolic-carbohydrate complexes from gramineous cell-walls. *Carbohydrate Research* 272, 41-53.
- Wardrop, A.B., 1981. 4. Lignification and xylogenesis. In: Barnett, J.R. (Ed.) *Xylem cell development*. Castle House, Tunbridge Wells, England, pp.115-152.
- Watteau, F., Villemin, G., Ghanbaja, J., Genet, P., Pargney J.C., 2002. In situ ageing of fine beech roots (*Fagus sylvatica*) assessed by transmission electron microscopy and electron energy loss spectroscopy: description of microsites and evolution of polyphenolic substances. *Biology of the Cell* 94, 55-63.
- Watteau, F., Villemin, G., Burtin, G., Jocteur-Monrozier L., 2006. Root impact on the stability and constitution of the fine organo-mineral associations in a maize cultivated soil. *European Journal of Soil Science* 57, 247-257.
- White, P. M., Rice, C. W., Baldock, J.A., Tuinstra, M.R., 2007. Soil biological properties following additions of bmr mutant grain sorghum. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1518-1532.
- Wilson, J.R., Mertens, D.R., 1995. Cell-wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Science* 35, 251-259.
- Wilson, J.R., Hatfield, R.D., 1997. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Australian Journal of Agricultural Research* 48, 165-180.
- Wolf, D.C., Dao, T.H., Scott, H.D., Lavy, T.L., 1989. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality* 18, 39-44.
- Yasuda, S., Fukushima, K., Kakehi, A., 2001. Formation and chemical structures of acid-soluble lignin I: sulphuric acid treatment time and acid-soluble lignin content of hardwood. *Journal of Wood Science* 47, 69-72.
- Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schroth, G., 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma* 79, 117-161.

## **Annexes**



### Echantillonnage du matériel végétal

Pour les besoins des expériences, seize géotypes de maïs ont été cultivés à la station expérimentale de l'INRA de Lusignan et récoltés à maturité physiologique fin septembre 2005. Seules les racines des plantes récoltées ont été utilisées. Parmi les seize géotypes représentés dans la figure 11, se distinguent:

- la lignée parentale F2 et ses mutants bm1, bm2, bm3 et bm4 associés,
- la lignée parentale F292 et ses mutants bm1, bm2, bm3 et bm4 associés,
- et six hybrides : F7026bm3\*F2bm3, Mexxal, Anjou 285, Anjou 258, Columbus et Manfusa.

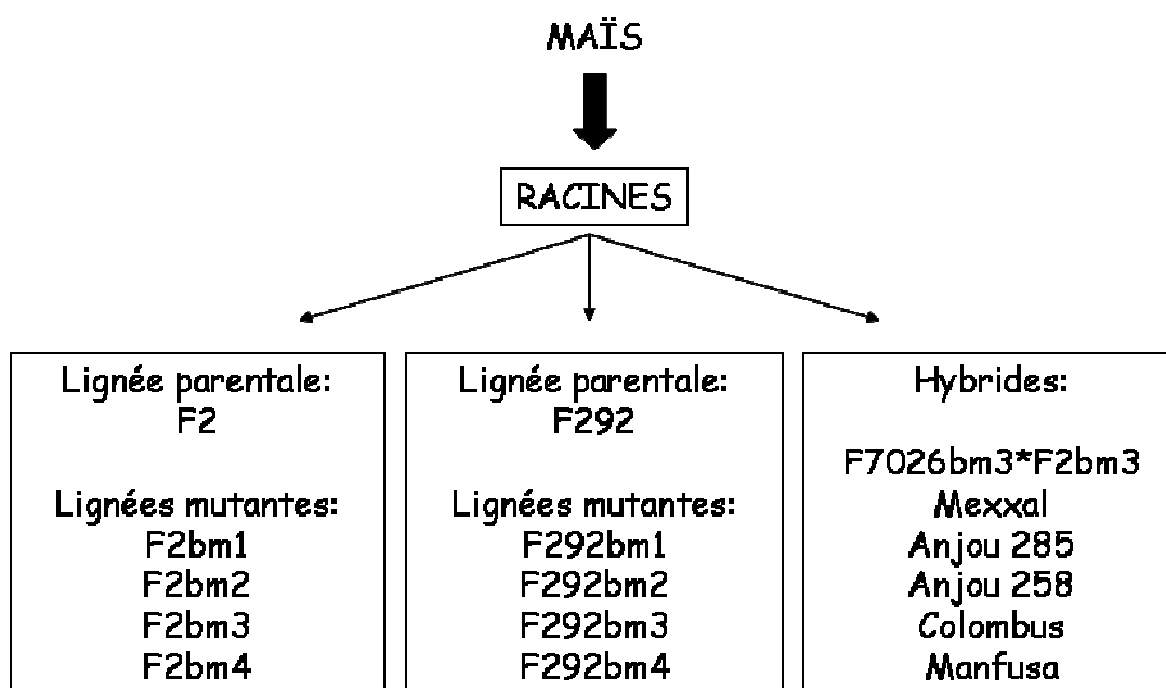


Figure 10 : Schéma représentatif du matériel végétal utilisé pour la réalisation des expériences.

Les géotypes ont été cultivé ensemble au champ, dans un sol limon argilo-sableux (20% d'argile), et dans les mêmes conditions environnementales. Les lignées F2, F292 et leurs mutants bm1, 2, 3, 4 associés ont été cultivées sur l' « essai 21 » (Figure 12) tandis que les hybrides ont été cultivés sur l' « essai 71 » (Figure 13).

Quel que soit l'essai, les graines de chaque géotype ont été semées en lignes sur des parcelles de 7.5 m<sup>2</sup> à raison de 2 lignes de 5 m par parcelle. Sur chaque ligne ont été semées 36 plantes (soit 72 plantes par parcelle et par géotype). Les lignées ont été semées en 3 répétitions (Figure 12) et les hybrides en 5 répétitions (Figure 13).

Parcelle	ligne n°1013	1072	1073
	F2	F292bm4	F2bm1
	ligne n°1014	1071	1074
	F2	F292bm4	F2bm1
	1015	1070	1075
	F292bm1	F2bm2	F2bm2
	1016	1069	1076
	F292bm1	F2bm2	F2bm2
	1017	1068	1077
	F2bm3	F2bm3	F2bm4
	1018	1067	1078
	F2bm3	F2bm3	F2bm4
	1019	1066	1079
	X	F292bm1	F292bm4
	1020	1065	1080
	X	F292bm1	F292bm4
	1021	1064	1081
	X	X	F292bm2
	1022	1063	1082
	X	X	F292bm2
	1023	1062	1083
	X	X	F292bm1
	1024	1061	1084
	X	X	F292bm1
	1025	1060	1085
	F2bm2	F292	X
	1026	1059	1086
	F2bm2	F292	X
	1027	1058	1087
	F292bm2	X	X
	1028	1057	1088
	F292bm2	X	X
	1029	1056	1089
	X	F292bm2	F292bm3
	1030	1055	1090
	X	F292bm2	F292bm3
	1031	1054	1091
	X	X	F292
	1032	1053	1092
	X	X	F292
	1033	1052	1093
	F292bm3	X	F2bm3
	1034	1051	1094
	F292bm3	X	F2bm3
	1035	1050	1095
	F292bm4	F292bm3	X
	1036	1049	1096
	F292bm4	F292bm3	X
	1037	1048	1097
	F292	F2	F2
	1038	1047	1098
	F292	F2	F2
	1039	1046	1099
	F2bm4	F2bm1	X
	1040	1045	1100
	F2bm4	F2bm1	X
	1041	1044	1101
	F2bm1	F2bm4	X
	1042	1043	1102
	F2bm1	F2bm4	X
	<b>répétition 1</b>	<b>répétition 2</b>	<b>répétition 3</b>

Figure 11 : Schéma du dispositif expérimental de plantation des lignées F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3, F2bm4, F292, F292bm1, F292bm2, F292bm3, et F292bm4 sur des parcelles de 7.5 m<sup>2</sup>, à raison de 2 lignes/parcelle/génotype/répétition, en 3 répétitions (essai 21, Lusignan « La Plaine »). X : autres génotypes semés pour d'autres finalités que celles de la thèse.

Les lignées ont été semées les 27 et 28 avril 2005 et récoltées entre le 24 août et le 6 septembre 2005. Les précédentes cultures de l'essai 21 étaient du blé en 2004 et du pois de printemps en 2003. Les parcelles ont été désherbées en post-semis immédiat (Isard à 1.2 l/ha + Lagon à 0.7 l/ha, le 29 avril 2005) et en post-levée, stade du maïs feuille (Fighter à 2.5 l/ha le 26 mai 2005). La pyrale du maïs a été traitée en lutte intégrée par Tricogram (installation le 1 juin 2005). De l'engrais a été apporté au sol sous forme d'épandage avant le semis (N : 120U sous forme de N liquide la veille du semis, le 26 avril 2005 ; P : 100U et K : 165U sous forme de fumures de fond le 7 décembre 2004).

Concernant le travail du sol : déchaumage le 3 septembre 2004 ; labour le 2 février 2005 ; vibroculteur le 21 mars 2005 ; rouleau Packer fin mars 2005 ; herse rotative le 26 avril 2005.

La culture a été irriguée avec 25mm d'eau pour chaque date suivante : 13 et 23 juin, 11, 18, et 26 juillet, 4, 11 et 22 août 2005.

Parcelle	ligne n°3560	3583	3584	3607	3608
	Colombus	F7026bm3*F2bm3	F7026bm3*F2bm3	Anjou 258	F7026bm3*F2bm3
	ligne n°3561	3582	3585	3606	3609
	Colombus	F7026bm3*F2bm3	F7026bm3*F2bm3	Anjou 258	F7026bm3*F2bm3
	3562	3581	3586	3605	3610
	Anjou 258	Colombus	Manfusa	Manfusa	Manfusa
	3563	3580	3587	3604	3611
	Anjou 258	Colombus	Manfusa	Manfusa	Manfusa
	3564	3579	3588	3603	3612
	Anjou 285	Mexxal	Anjou 258	F7026bm3*F2bm3	Colombus
	3565	3578	3589	3602	3613
	Anjou 285	Mexxal	Anjou 258	F7026bm3*F2bm3	Colombus
	3566	3577	3590	3601	3614
	Manfusa	Anjou 258	Mexxal	Anjou 285	Anjou 258
	3567	3576	3591	3600	3615
	Manfusa	Anjou 258	Mexxal	Anjou 285	Anjou 258
	3568	3575	3592	3599	3616
	F7026bm3*F2bm3	Manfusa	Anjou 285	Colombus	Mexxal
	3569	3574	3593	3598	3617
	F7026bm3*F2bm3	Manfusa	Anjou 285	Colombus	Mexxal
	3570	3573	3594	3597	3618
	Mexxal	Anjou 285	Colombus	Mexxal	Anjou 285
	3571	3572	3595	3596	3619
	Mexxal	Anjou 285	Colombus	Mexxal	Anjou 285
	<b>répétition 1</b>	<b>répétition 2</b>	<b>répétition 3</b>	<b>répétition 4</b>	<b>répétition 5</b>

Figure 12 : Schéma du dispositif expérimental de plantation des 6 hybrides sur des parcelles de 7.5 m<sup>2</sup>, à raison de 2 lignes/parcelle/génotype/répétition, en 5 répétitions (essai 71, Lusignan « Venours » (Pétinière)).



Les hybrides ont été semés le 3 mai 2005 et récoltés entre les 26 et 27 septembre 2005. Les précédentes cultures de l'essai 71 étaient du maïs ensilage en 2004 et du tournesol en 2003. Les parcelles ont été désherbées en post-semis immédiat (Isard à 1.2 l/ha + Lagon à 0.7 l/ha, le 6 mai 2005) et en post-levée (Callisto 0.7 l/ha + Milagro 0.5 l/ha, le 24 juin 2005). La pyrale du maïs a été traitée en lutte intégrée par Tricogram (installation le 1 juin 2005).

De l'engrais a été apporté au sol sous forme d'épandage avant le semis (N : 90U sous forme de N liquide la veille du semis, le 2 mai 2005 ; K : 180U sous forme de fumure de fond le 9 décembre 2004 et P : pas d'apport car en quantité suffisante).

Concernant le travail du sol : labour le 3 février 2005 ; vibroculteur le 17 mars 2005 ; herse rotative le 2 mai 2005.

La culture a été irriguée avec 25mm d'eau pour chaque date suivante : 15 et 27 juin, 13, et 21 juillet, 2, 10 et 18 août 2005.

Le nombre total de plantes récoltées est représenté dans le tableau 1 pour les lignées, et dans le tableau 2 pour les hybrides.

<b>F2</b>	5	15	25	<b>45</b>
<b>F2bm1</b>	12	9	24	<b>45</b>
<b>F2bm2</b>	0	0	12	<b>12</b>
<b>F2bm3</b>	2	1	5	<b>8</b>
<b>F2bm4</b>	8	21	5	<b>34</b>
<b>F292</b>	7	5	33	<b>45</b>
<b>F292bm1</b>	0	10	25	<b>35</b>
<b>F292bm2</b>	0	1	8	<b>9</b>
<b>F292bm3</b>	8	15	22	<b>45</b>
<b>F292bm4</b>	4	7	34	<b>45</b>
	<b>répétition 1</b>	<b>répétition 2</b>	<b>répétition 3</b>	<b>Total</b>

Tableau 1 : Nombre de plantes récoltées pour les lignées F2, F292, et leurs mutants bm1, bm2, bm3 et bm4 respectifs.

<b>F7026bm3*F2bm3</b>	50	49	52	51	46	<b>248</b>
<b>Mexxal</b>	63	61	62	57	61	<b>304</b>
<b>Anjou 285</b>	66	63	66	60	66	<b>321</b>
<b>Anjou 258</b>	54	60	60	55	56	<b>285</b>
<b>Colombus</b>	62	64	57	63	54	<b>300</b>
<b>Manfusa</b>	60	60	60	58	60	<b>298</b>
	<b>répétition 1</b>	<b>répétition 2</b>	<b>répétition 3</b>	<b>répétition 4</b>	<b>répétition 5</b>	<b>Total</b>

Tableau 2 : Nombre de plantes récoltées pour les hybrides.

Comparé aux hybrides ayant une forte valeur agronomique (biomasse importante, production d'épis, germination aisée), les lignées F2 et F292 sont moins vigoureuses, d'où un nombre restreint de plantes récoltées. Les mutants bm sont des lignées à faible valeur agronomique. Elles produisent peu de biomasse lorsque les graines arrivent à germer. Le nombre de mutants récoltés est parfois très faible par rapport au nombre de graines semées (ex : pour F2bm3, 8 plantes ont été récoltées sur 216 graines semées).

Après la récolte, les racines ont été lavées au jet d'eau pour se débarrasser de la terre. Les plantes ont été séchées dans une étuve à 25°C pendant 4 jours à l'INRA de Lusignan avant d'être rapportées à Reims.

Ensuite, les racines ont été séparées des parties aériennes et lavées abondamment à l'eau pour enlever le reste de terre adhérent aux racines. Les racines ont subi un deuxième lavage dans une solution d'héxamétaphosphate de sodium 50 g/l pendant une nuit. Cette solution fait sédimenter les particules d'argile restées collées aux racines. Les racines ont été rincées plusieurs fois à l'eau distillée avant d'être mises à sécher en étuve ventilée à 30°C pendant une semaine.

Pour chaque génotype, les racines séminales et adventives de l'ensemble des plantes récoltées ont été mises en commun et conservées sèches à température ambiante.

La morphologie des racines séminales et adventives étant différente, les racines ont été calibrées (2 mm diamètre – 5 mm longueur) pour des soucis d'homogénéité. Le calibre du matériel végétal utilisé pour les expériences représente un calibre moyen des racines de maïs.

## **Comparaison de l'architecture tissulaire des racines de F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3, et F2bm4**

Une des hypothèses de ce travail était que la mutation « brown-midrib » (bm) n'affecte pas l'architecture tissulaire des racines de maïs. C'est hypothèse a été basée sur le fait que la mutation bm n'a pas d'impact significatif sur l'architecture tissulaire des parties aériennes de maïs (Méchin et al., 2005). Pour vérifier notre hypothèse, une étude de l'architecture tissulaire des racines de F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3, et F2bm4 a été menée au moyen d'observations histologiques en microscopie photonique. Ces observations ont permis de comparer l'architecture tissulaire des racines de F2 avec celles des mutants en mesurant l'épaisseur des parois cellulaires des différents tissus racinaires.

### **Préparation des échantillons :**

Pour chaque génotype, des fragments de racines calibrés (1-3mm long ; 1-2mm diamètre) ont été fixés pendant une journée dans une solution de paraformaldéhyde 2% - glutaraldéhyde 0,5% dans un tampon phosphate (0,1M, pH 7,4). Après plusieurs rinçages dans le tampon phosphate et dans de l'eau ultra pure, les échantillons ont été déshydratés dans de l'éthanol puis enrésinés. La résine utilisée était l'EPON, et la polymérisation a été effectuée en deux temps : à 37°C pendant 24h, puis à 60°C pendant 48h.

Des coupes transversales de 1µm d'épaisseur ont été effectuées sur les racines enrésinées à l'aide d'un couteau en diamant et d'un microtome (HM 360, Microm, France) puis déposées sur lame mince.

Avant observation, les coupes ont été colorées au bleu de Toluidine (1% w:v) pendant 2 min. Après déshydratation, les échantillons ont été couverts avec un milieu de montage Eukitt (Electron Microscopy Sciences, USA).

### **Mesures d'épaisseur de parois cellulaires :**

Les observations ont été réalisées avec un microscope optique Axioskop (Zeiss, Allemagne) couplé à une caméra AxioCam.

Des mesures d'épaisseur de parois ont été effectuées au niveau des tissus suivants : parenchyme cortical, endoderme et bande de Caspary (paroi tertiaire de la face interne de l'endoderme), péricycle, fibre, métaxylème, et parenchyme médullaire (Figure 9).

Les épaisseurs de parois cellulaires ont été mesurées avec le logiciel AxioVision 4.1.

Chaque génotype a été observé en trois réplicats. Pour chaque type tissulaire, 5 cellules ont été sélectionnées au hasard et 4 mesures d'épaisseur de paroi par cellule ont été effectuées (soit 60 mesures par tissu) (sauf pour l'endoderme et la bande de Caspary où 1 seule mesure d'épaisseur de paroi sur 5 cellules en trois réplicats (soit 15 mesures par type cellulaire) ont été effectuées).

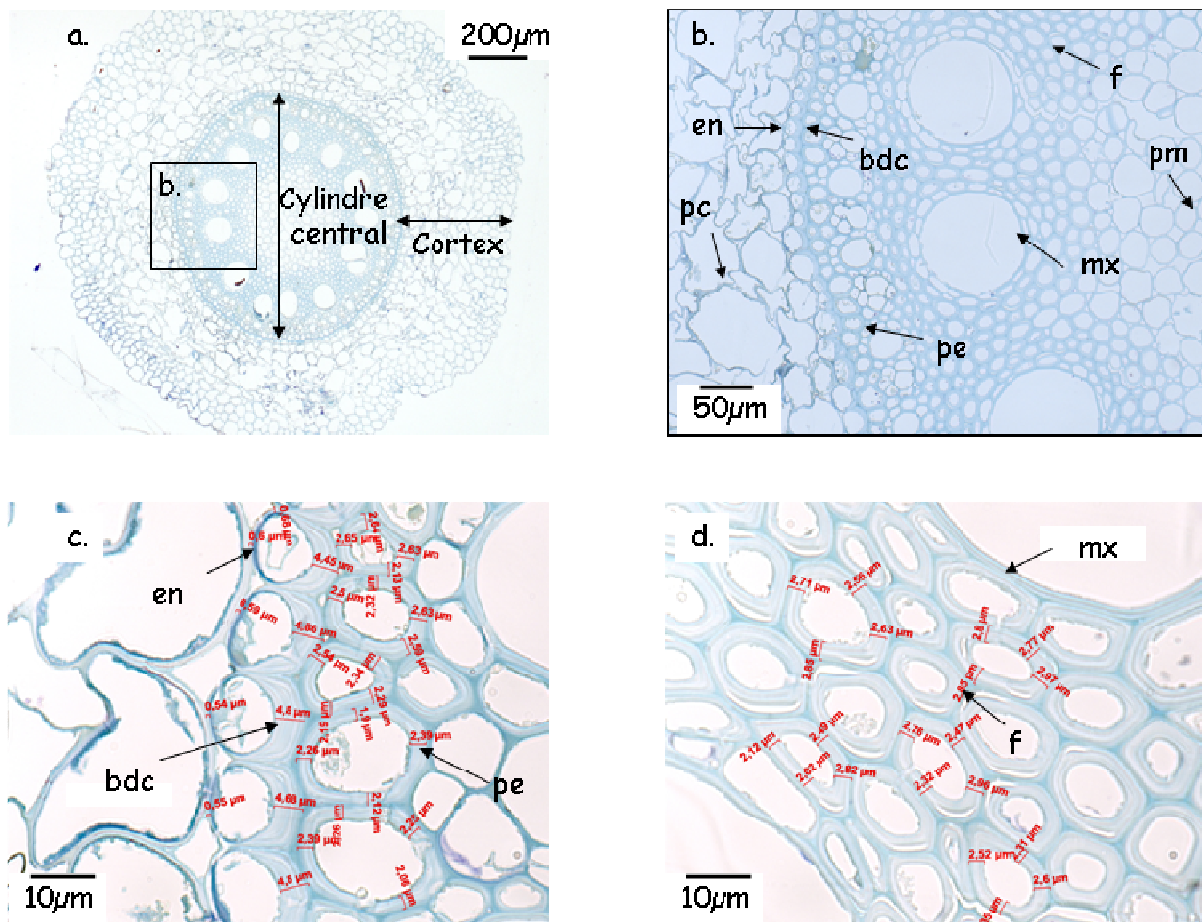


Figure 13 : a. Coupe transversale d'une racine de maïs (exemple de F2bm1), distinction du cortex et du cylindre central ; b. grossissement au niveau de l'endoderme, tissu délimitant le cylindre central du cortex ; c. et d. mesures d'épaisseur de parois cellulaires (en  $\mu\text{m}$ ) pour différents types cellulaires. bdc : bande de Caspary (paroi tertiaire de l'endoderme), en : paroi externe de l'endoderme, f : fibre, mx : métaxylème, pc : parenchyme cortical, pe : péricycle, pm : parenchyme médullaire.

## Résultats :

Les épaisseurs de parois cellulaires des tissus de la lignée parentale F2 et des lignées mutantes F2bm1, F2bm2, F2bm3 et F2bm4 apparaissent sur la figure 10.

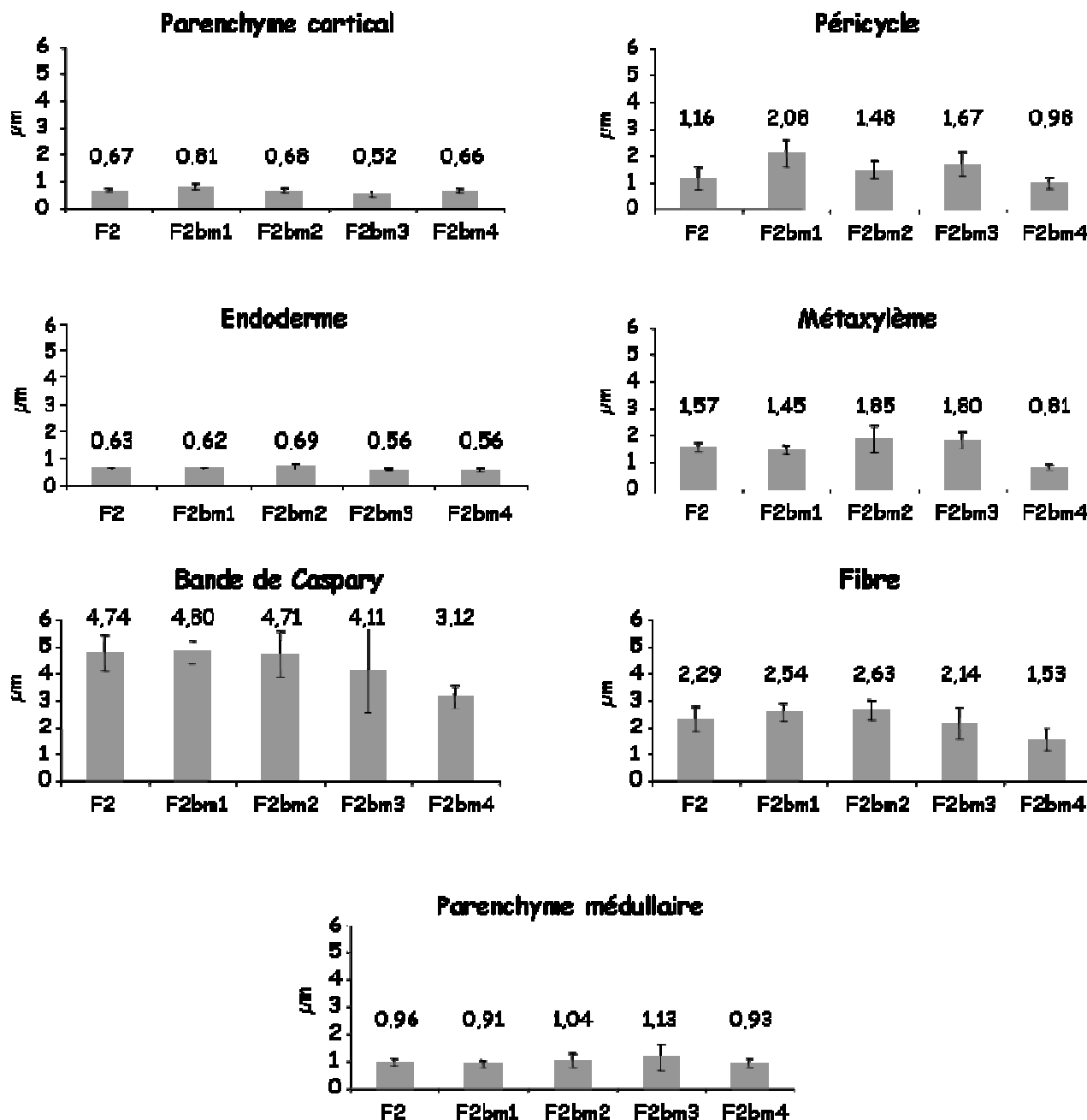


Figure 14 : Epaisseur de parois cellulaires (en  $\mu\text{m}$ ) des tissus des racines de F2, F2bm1, F2bm2, F2bm3 et F2bm4. Les valeurs correspondent à des moyennes effectuées sur 60 mesures pour le parenchyme cortical, le péricycle, la fibre et le parenchyme médullaire, le métaxylème, et sur 15 mesures pour l'endoderme et la bande de Caspary.

Globalement, les épaisseurs de parois cellulaires du parenchyme cortical, de l'endoderme, et du parenchyme médullaire sont similaires entre la lignée F2 et l'ensemble des mutants (Figure 10). Les parois des fibres, du péricycle et du métaxylème sont similaires entre F2 et Fbm1, F2bm2 et F2bm3 et ont tendance à être plus fines chez F2bm4 par rapport à la lignée F2 (Figure 10). L'épaisseur des bandes de Caspary varie fortement au sein d'une même racine et a tendance à être moins importante chez F2bm4 comparé à F2.

L'impact de la mutation bm sur l'architecture tissulaire des racines a été évalué pour la lignée F2. Globalement, les mutations bm1, bm2, bm3 et bm4 ne semblent pas affecter l'architecture tissulaire des racines. Des mesures complémentaires sur d'autres réplicats permettraient de tester la significativité de ces résultats. L'impact de la mutation bm sur l'architecture tissulaire des racines de la lignée F292 pourrait également être évalué.



## Résumé

Depuis quelques années, les racines suscitent un nouvel intérêt dans les problématiques environnementales liées à la dynamique du carbone dans les agro-écosystèmes, en raison notamment de leur contribution, à la mort ou à la récolte de la plante, au stockage du C des sols. Pour mieux comprendre le rôle de la qualité chimique des racines sur le processus de décomposition, nous avons tiré profit de la variabilité génétique de la composante pariétale des cellules de maïs, permettant de travailler sur une gamme de composition chimique généralement impossible à obtenir sur un même organe d'une même espèce végétale. Notre étude a porté sur seize racines de variétés hybrides de maïs ainsi que celles de maïs mutants brown-midrib, dont les parties aériennes ont été caractérisées dans le cadre d'études sur la digestibilité des fourrages. Les variations de la composition chimique des racines trouvées ont porté principalement sur la teneur et la composition des polymères pariétaux (polysaccharides et lignines). Elles se sont traduites par des cinétiques bien différenciées de minéralisation du C au cours de leur décomposition dans le sol. L'analyse approfondie de la qualité chimique des 16 racines et le suivi approfondi de son évolution au cours de la décomposition pour 4 génotypes contrastés ont montré le rôle du C soluble sur le court terme, de la fraction lignine sur le long terme, et ont souligné le rôle de l'organisation des parois cellulaires sur la décomposition. En particulier, la prise en compte de l'acide p-coumarique estérifié améliore la prédiction des taux de minéralisation du C à long terme. La question de la nature et de l'origine de l'azote organique des racines a été étudiée en combinant caractérisation chimique et microscopie. Nous avons observé la présence de microorganismes colonisateurs présents avant décomposition des racines dans les sols, ayant modifié la composition chimique des racines (diminution des polysaccharides pariétaux, augmentation de la teneur en azote) et diminué la biodégradabilité intrinsèque des racines colonisées. L'adaptation de la thioacidolyse sur une matrice sol a permis de mettre en évidence des biomarqueurs de la structure non condensée des lignines des racines après 800 jours de décomposition dans le sol et permet d'envisager l'étude de la relation entre qualité des matières organiques entrant et qualité de la matière organique stabilisée.

Les cinétiques de minéralisation du C des racines ont été simulées avec le modèle RothC afin de tester et améliorer le formalisme représentant la qualité des résidus végétaux (compartiment facilement décomposable DPM et un compartiment plus récalcitrant RPM). Nous avons démontré qu'une valeur moyenne et standard du rapport DPM/RPM n'était pas adaptée, même pour un type unique de résidus (les racines de maïs), et avons proposé une paramétrisation de ce rapport à partir des caractéristiques chimiques identifiées dans notre étude.

Mots clés : carbone, azote, minéralisation, qualité chimique, racines, maïs, mutations brown-midrib, modélisation.

## Abstract

Since several years, plant roots aroused a new interest due to the environmental concern of their C input and storage in soils after decomposition subsequent to plant death or harvest. To better understand the role of the chemical quality of roots on their decomposition in soils and associated C dynamics, sixteen maize roots of hybrids and of brown-midrib mutants were used. These genotypes were earlier characterized by variations in the cell wall quality of above ground organs with respect to forage digestibility. The variations of root chemical quality were observed mainly on the cell wall polymers content and composition (polysaccharides and lignin). They translated into large differences in the kinetics of C mineralization during decomposition. The characterization of initial cell wall quality of the 16 roots together with the detailed study of the changes in cell wall quality during decomposition for 4 contrasted genotypes evidenced the role of soluble C on the short term, lignin fraction of the longer term, and the role of the organization of the cell walls in decomposition. Esterified p-coumaric acid improved the prediction of the rates of mineralized C on the long term. The nature and the origin of root-organic N were investigated by a combination of chemical and microscopic approaches that revealed the presence of root colonizing microorganisms prior to decomposition in soil. They modified the chemical characteristics of colonized roots, i.e. decreasing the cell wall carbohydrates and increasing the organic N content, therefore decreasing the subsequent decomposition of colonized roots in soil. The adaptation of the thioacidolysis on a soil matrix, allowed to enlighten biomarkers of the non-condensed structures of the root-lignin after 800 days of decomposition in soil.

The RothC model was used to simulate the kinetics of root-C mineralization in order to test and improve the parameter describing the root quality (split into a decomposable pool DPM, and a recalcitrant pool RPM). We demonstrated that it was not possible to use a standard mean value of the DPM/RPM ratio for all roots, and we proposed a parameterization of DPM/RPM according based on our chemical measurements.

*Keywords:* carbon, nitrogen, mineralization, chemical quality, roots, maize, brown-midrib mutations, modeling.