

**Réponse du système racinaire de *Dactylis glomerata* et *Medicago sativa* à une contrainte hydrique en culture pure et en association**

**Présenté par Benoît Destrée**

Promoteurs : Prof. Xavier Draye (UCL/ELI/ELIA)  
Prof. Mathieu Javaux (UCL/ELI/ELIE)

Lecteurs : Prof. Bruno Delvaux (UCL//ELI/ELIE)  
Prof. Richard Lambert (UCL/ELI/ELIA)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention  
du diplôme de **Bioingénieur : sciences agronomiques**





---

## Remerciements

---

En premier lieu, je souhaite remercier mes promoteurs, Messieurs les Professeurs Xavier Draye et Mathieu Javaux pour tous les conseils qu'ils m'ont procurés, ainsi que leur relecture qui m'a grandement aidé.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Delvaux pour sa disponibilité et ses explications lors des analyses en champ, mais également pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je remercie par ailleurs Monsieur le Professeur Lambert pour le temps consacré à ce mémoire en tant que membre du jury.

J'adresse également mes remerciements à Madame Dominique Mingeot et à toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire du CRA-W, Département Sciences du Vivant, Unité de génie biologique et principalement à Laurence et Agnès pour leur aide durant les analyses ADN des racines et pour la mise au point de la méthode et des marqueurs, ainsi qu'à Monsieur le Professeur Bertin pour l'aide au niveau administratif.

Je remercie particulièrement Benjamin Van der Verren, Maxime Doffagne et Nicolas van Cutsem pour leur aide au quotidien, au niveau de l'utilisation du matériel, pour les comptages et les nombreux carottages. Grâce à eux, le travail en champ était plus rapide, plus efficace et plus agréable.

Je suis reconnaissant envers tous ceux qui sont venus m'aider durant les comptages ou les carottages : Marie-Valérie, Elisa, Justine, Alice, Tanguy, Julien, Gaël, Pauline, ... et tous ceux qui ont participé aux mesures d'une façon ou d'une autre. Je remercie également Diane pour les covotages jusqu'à Gembloux et la bonne humeur durant les lavages de racines et les analyses au laboratoire.

Finalement, je remercie mes parents et ma famille pour leur relecture et leurs conseils ainsi que leur soutien sans faille.

---

## Table des matières

---

Liste des abréviations .....	7
Liste des figures .....	8
Liste des tableaux .....	10
1. Introduction.....	11
2. Etat de l'art.....	12
2.1. Projections climatiques .....	12
2.1.1. Projections de pluviométrie en Belgique .....	12
2.2. La prairie.....	13
2.2.1. Définition et types de prairies.....	13
2.2.2. Composition des prairies.....	13
2.2.3. Position des prairies dans l'agriculture belge .....	14
2.3. Associations de cultures .....	15
2.3.1. Définition.....	15
2.3.2. Evaluation des performances.....	15
2.3.3. Associations en prairies.....	15
2.4. Plantes étudiées .....	16
2.4.1. Le dactyle.....	16
2.4.2. La luzerne .....	17
2.5. La biomasse racinaire .....	17
2.5.1. Influence du sol sur le développement racinaire.....	17
2.5.2. Techniques d'étude des systèmes racinaires .....	19
2.5.2.1. Etudes descriptives.....	19
2.5.2.2. Etudes quantitatives.....	19
2.6. Les sols.....	20
2.7. Le déficit hydrique : réponses possibles .....	21
2.8. Méthodes d'identification de racines .....	22
2.8.1. Aperçu des méthodes.....	22
2.8.2. Méthodes basées sur l'ADN .....	23
3. Hypothèses et objectifs.....	25
4. Matériel et méthodes.....	26

4.1. Le site expérimental .....	26
4.1.1. Localisation.....	26
4.1.2. Pédologie de la parcelle .....	27
4.1.3. Disposition et gestion des parcelles .....	27
4.1.4. Le dispositif expérimental .....	27
4.2. Mise en place des fosses .....	29
4.2.1. Mesure de la densité racinaire en nombre .....	29
4.3. Prélèvement d'échantillons.....	30
4.3.1. Echantillons « horizontaux » .....	30
4.3.2. Echantillons « verticaux ».....	31
4.3.3. Lavage et stockage des échantillons .....	33
4.4. Mesure de la densité racinaire en poids .....	33
4.5. Profil pédologique .....	34
4.6. Analyses génétiques.....	34
4.6.1. Idée générale.....	34
4.6.2. Broyage des échantillons.....	35
4.6.3. Extractions d'ADN.....	35
4.6.4. Densités optiques .....	36
4.6.5. Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	37
4.6.6. Electrophorèse sur gel d'acrylamide .....	38
4.6.7. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	38
4.7. Tests effectués.....	38
4.8. Analyses statistiques .....	41
5. Résultats et discussion .....	42
5.1. Données météorologiques et pédologiques .....	42
5.1.1. Données météorologiques .....	42
5.1.2. Données pédologiques .....	43
5.2. Teneur en eau volumique .....	45
5.3. Rendement.....	48
5.3.1. Effet traitement.....	49
5.3.2. Effet association .....	50
5.3.3. Effet date .....	50
5.3.4. Améliorations possibles .....	50
5.4. Comptages racinaires .....	51
5.4.1. Effet des traitements sur la distribution racinaire .....	55
5.4.2. Effet de l'association sur la distribution racinaire.....	57

5.4.3. Effet de la profondeur sur la distribution racinaire.....	58
5.4.4. Discussion .....	61
5.5. Densité racinaire .....	64
5.5.1. Moyennes et écarts-types.....	65
5.5.2. Effet du traitement.....	66
5.5.3. Effet de l'association .....	67
5.5.4. Effet de la profondeur .....	68
5.5.5. Effets des différents facteurs et leurs interactions .....	72
5.5.6. Discussion .....	73
5.6. Analyses ADN.....	74
5.6.1. Mise au point.....	74
5.6.2. Résultats .....	76
5.6.3. Discussion et réflexion critique .....	76
6. Conclusion et perspectives.....	78
7. Bibliographie.....	80
8. Annexes .....	83
8.1. Ensemble des parcelles du projet Fordrought .....	83
8.2. Mélanges PCR pour les marqueurs trnT-trnL, C-D et K1-K2 pour un volume final de 20µl.....	84
8.3. Détails du cycle d'amplification utilisé pour les PCR avec les marqueurs trnT-trnL, C-D et K1-K2 .....	85

---

## Liste des abréviations

---

➤ GIEC	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
➤ CNRTL	Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales
➤ SAU	Surface Agricole Utile
➤ LER	Land Equivalent Ratio
➤ INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
➤ UV	Ultra Violet
➤ ADN	acide désoxyribonucléique
➤ qPCR	Polymerase Chain Reaction quantitative
➤ ISSR	InterSimple Sequence Repeat
➤ FFLP	Fluorescent Fragment Length Polymorphism
➤ CRA-W	Centre de Recherche Agronomique Wallon
➤ Éch	échantillon
➤ DO	Densité Optique
➤ ANOVA	Analyse de la variance
➤ $\mu$	moyenne
➤ $\sigma$	Ecart-type
➤ MS/ha	Matière sèche par hectare
➤ T°	Température (°C)

---

## Liste des figures

---

Figure 1 : Importance des prairies dans la SAU communale en Wallonie (statistiques agricoles de Wallonie, 2015).....	14
Figure 2 : Génome chloroplastique reprenant les marqueurs utilisés pour les analyses.....	23
Figure 3 : Carte de localisation des parcelles expérimentales.....	26
Figure 4 : Système d'armature permettant d'imposer le stress hydrique.....	27
Figure 5 : Carte de visualisation des parcelles d'intérêt avec leurs dimensions.....	28
Figure 6 : Mise en place des fosses avec la pelle mécanique.....	29
Figure 7 : Dispositif utilisé pour les comptages racinaires.....	29
Figure 8 : Emplacement des prélèvements horizontaux.....	30
Figure 9 : Détail de la méthode utilisée pour réaliser les prélèvements horizontaux.....	31
Figure 10 : Détail du protocole utilisé pour l'échantillonnage vertical.....	32
Figure 11 : Lavage d'un échantillon de sol sur tamis.....	33
Figure 12 : Racines obtenues après lavage.....	33
Figure 13: gel d'agarose du 09-03 avec le marqueur trnL-Intron pour des échantillons de luzerne pure, de dactyle pur et de mélange à différentes dilutions.....	41
Figure 14 : Evolution de la température journalière moyenne et de la pluviométrie en fonction du temps durant les mois de juin à octobre 2017.....	43
Figure 15: Profil de sol de la parcelle de mélange témoin et observations réalisées sur le terrain avec le Prof. Delvaux.....	44
Figure16: Profil de sol de la parcelle de mélange stressé et observations réalisées sur le terrain avec le Prof. Delvaux.....	45
Figure 17: Evolution de la teneur en eau volumique à différentes profondeurs dans une parcelle stressée.....	45
Figure 18: Evolution de la teneur en eau volumique à différentes profondeurs dans une parcelle témoin.....	46
Figure 19: Evolution du rendement des parcelles témoins.....	48
Figure 20: Evolution du rendement des parcelles stressées.....	48
Figure 21: Représentation de la distribution racinaire sur le profil de la parcelle de luzerne stressée.....	51
Figure 22: Représentation de la distribution racinaire sur le profil de la parcelle de luzerne témoin.....	51

Figure 23: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de dactyle témoin.....	52
Figure 24: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de dactyle stressé.....	52
Figure 25: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de mélange témoin.....	53
Figure 26: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de mélange stressé.....	53
Figure 27: Evolution du nombre de racines en fonction de la profondeur par horizon de 15cm et agrandissement à partir de 75cm de profondeur.....	54
Figure 28: Nombre de racines par horizon pour les parcelles stressées et comparaison statistique par espèce.....	58
Figure 29: Nombre de racines par horizon pour les parcelles témoin et comparaison statistique par espèce.....	59
Figure 30: Différence entre nombre de racines par espèce et par horizons.....	61
Figure 31: Evolution de la densité racinaire en fonction de la profondeur pour les échantillons verticaux.....	64
Figure 32: Evolution de la densité racinaire en fonction de la profondeur pour les échantillons horizontaux.....	65
Figure 33: Evolution des densités racinaires par horizon pour les prélèvements verticaux des parcelles stressées.....	69
Figure 34: Evolution des densités racinaires par horizon pour les prélèvements verticaux des parcelles témoins.....	69
Figure 35: Evolution des densités racinaires des deux traitements par espèce et par horizon pour les prélèvements horizontaux des parcelles stressées.....	70
Figure 36: Evolution des densités racinaires des deux traitements par espèce et par horizon pour les prélèvements horizontaux des parcelles témoins.....	70
Figure 37: Différence entre densités racinaires par espèce et par horizon pour les prélèvements verticaux.....	71
Figure 38: Différence entre densités racinaires par espèce et par horizon pour les prélèvements horizontaux.....	71
Figure 39: gel d'électrophorèse des résultats d'amplifications PCR des fragments d'ADN issus des espèces pures et des mélanges artificiels pour le marqueur moléculaire trnL-Intron. Les cercles rouges indiquent les endroits où le dactyle aurait dû être détecté.....	75
Figure 40: gel d'acrylamide des résultats d'amplifications PCR des fragments d'ADN issus des échantillons des parcelles de mélange témoin (gauche) et stressé (droite) et des mélanges artificiels pour le marqueur moléculaire trnL-Intron.....	76

---

## Liste des tableaux

---

Tableau 1: Mélanges PCR pour les marqueurs trnL-Intron et trnL-trnF pour un volume final de 20µl.....	37
Tableau 2: Détails du cycle d'amplification utilisé pour les PCR avec les marqueurs trnL-Intron et trnL-trnF.....	38
Tableau 3: Détail des variations tentées durant la mise au point de la méthode, pour détecter le dactyle dans les échantillons de mélange.....	39
Tableau 4: Moyennes et écarts-types des comptages racinaires pour les différents traitements et espèces.....	55
Tableau 5: Moyennes et écarts-types des comptages racinaires en fonction du facteur "traitement" pour les différentes espèces étudiées.....	56
Tableau 6: Moyennes et écarts-types des comptages racinaires en fonction du facteur "espèce" pour les différentes espèces étudiées.....	57
Tableau 7: Résultats de l'ANOVA 2 sur les parcelles stressées.....	59
Tableau 8: Résultats de l'ANOVA 2 sur les parcelles témoins.....	60
Tableau 9: Résultats de l'ANOVA 3 à propos de l'influence des trois facteurs et leurs interactions sur le nombre de racines dans le profil de sol.....	61
Tableau 10: Moyennes et écarts-types des densités racinaires des différents traitements et espèces pour les prélèvements verticaux et horizontaux.....	66
Tableau 11: Résultats de l'ANOVA 2 concernant l'effet du traitement sur la densité racinaire. Les valeurs en rouge sont significatives (inférieures à 0.05).....	67
Tableau 12: Résultats de l'ANOVA 2 concernant l'effet de l'association sur la densité racinaire selon les différents traitements et modes de prélèvement. Les valeurs en rouge sont significatives (inférieures à 0.05).....	68
Tableau 11: Résultats de l'analyse statistique à propos des différents facteurs et leur significativité pour les prélèvements verticaux.....	72
Tableau 12: Résultats de l'analyse statistique à propos des différents facteurs et leur significativité pour les prélèvements horizontaux.....	72

---

## *1. Introduction*

---

Dans un monde en proie à de nombreux changements, il est indispensable de pouvoir offrir une production agricole répondant aux besoins des populations mais s'adaptant à des contraintes et exigences sans cesse croissantes. « Produire mieux en utilisant moins de ressources » est sans doute un des crédos du 21<sup>e</sup> siècle. En effet, les changements climatiques et la baisse à venir de la disponibilité des intrants agricoles forcent les agriculteurs à modifier leurs méthodes de production.

L'un des paramètres fondamentaux pour l'agriculture est la disponibilité en eau et sa répartition durant l'année. Pour faire face à un potentiel déséquilibre futur dans cette répartition, il est nécessaire d'évaluer les performances des espèces cultivées. Ce mémoire sur le comportement des systèmes racinaires de deux plantes fourragères en conditions de déficit hydrique s'inscrit dans cette perspective d'adaptation du monde agricole à ses nouvelles contraintes.

La première partie de ce travail vise à établir l'état de l'art sur le sujet, en explicitant les contraintes climatiques qui pourraient survenir d'ici quelques années, et en soulignant l'importance des systèmes fourragers en Belgique. Les plantes étudiées seront également décrites, ainsi que le concept d'association de cultures et ses caractéristiques. La relation sol-plante sera abordée, ainsi que les effets d'un déficit hydrique sur ce système. Enfin, les méthodes et techniques d'étude des systèmes racinaires seront détaillées.

Dans une seconde partie, la méthodologie utilisée pour réaliser les analyses sera décrite. Pour commencer, le contexte du mémoire, l'emplacement et la disposition des parcelles expérimentales seront mis en lumière. Des études en champ ont été réalisées, pour étudier le système racinaire sous différentes facettes, et des techniques ont été mises au point pour échantillonner de manière optimale. Une seconde partie des analyses concerne des manipulations en laboratoire, qui ont, elles aussi, nécessité une mise au point poussée, avant de fournir quelques résultats, même si certaines surprises sont survenues.

La dernière tranche de ce mémoire vise à présenter les résultats obtenus dans les différentes manipulations, et à les analyser statistiquement. Les réflexions tirées de ces résultats seront également présentées ici, ainsi que des considérations relatives à la méthodologie utilisée.

---

## *2. Etat de l'art*

---

Ce chapitre a pour but d'offrir une synthèse des connaissances actuelles relatives aux différents thèmes abordés dans ce mémoire. Il commence par poser le cadre général du mémoire et explique sa pertinence d'un point de vue agronomique et économique en Belgique. Ce chapitre se poursuit en abordant l'intérêt des associations de cultures, ainsi que les raisons motivant la mise en place de ce type de système. Par après, une attention particulière sera accordée aux plantes étudiées, à leurs systèmes racinaires, ainsi qu'à la façon dont elles gèrent leurs ressources en eau. Finalement, les hypothèses et objectifs de ce travail sont décrits.

### *2.1. PROJECTIONS CLIMATIQUES*

---

#### *2.1.1. PROJECTIONS DE PLUVIOMÉTRIE EN BELGIQUE*

---

Lorsqu'on parle de changements climatiques, les chiffres avancés pour prédire le climat se limitent bien souvent aux températures. Toutefois, la pluviométrie et sa répartition dans l'année sont des facteurs déterminants pour la production agricole et sont également sujets à des changements importants dans le courant du 21<sup>e</sup> siècle.

Selon le rapport du projet ClimateCost, basé sur les données du GIEC, la pluviométrie augmenterait légèrement de façon globale d'ici la fin du 21<sup>e</sup> siècle. Ce qu'il est intéressant d'observer est qu'on remarque des tendances inverses selon les saisons, du moins en Europe. [1] Pour l'Europe de l'Ouest, le rapport indique que les précipitations seraient plus abondantes durant l'hiver [2] et plus rares l'été. Les chiffres avancés en ce qui concerne les variations en précipitations diffèrent. L'agence européenne pour l'environnement indique que l'augmentation annuelle des précipitations en Belgique serait comprise entre 5 et 10%. Selon un communiqué de presse de la Commission européenne, et d'après des données de 2012 de l'Agence européenne de l'Environnement, on peut s'attendre à une baisse de 15 à 20% des précipitations estivales en Belgique vers la fin du 21<sup>e</sup> siècle (entre 2071 et 2100). [3]

Il semble donc logique de s'attendre à ce que les productions agricoles, en général, et les prairies en particulier soient affectées par ces changements climatiques.

## 2.2. LA PRAIRIE

---

### 2.2.1. DÉFINITION ET TYPES DE PRAIRIES

---

Une prairie est un terrain sur lequel se trouve « une culture d'herbe d'une durée variable et destinée presque exclusivement à l'alimentation des animaux herbivores » [4]. D'autres définitions (telle celle proposée par le CNRTL) [5] spécifient que le couvert cultivé doit être dominé par les graminées et légumineuses pour être qualifié de prairies.

La biomasse produite par la prairie peut servir à l'alimentation des animaux de deux façons : soit la prairie va être pâturée, soit l'herbe sera fauchée et utilisée plus tard.

Il existe trois types de prairies, classés selon la durée de leur implantation et leur utilisation [6]:

- La prairie permanente est une prairie qui reste en place pour plusieurs années. Elle se caractérise souvent par une importante biodiversité (de nombreuses espèces sont présentes) et est souvent pâturée.
- La prairie temporaire fait partie intégrante de la rotation de cultures pratiquée par l'agriculteur. Elle n'est donc implantée que pour une durée déterminée, au terme de laquelle elle sera retournée pour la mise en place de la culture suivante. En général, on y observe moins d'espèces différentes que dans une prairie permanente. L'objectif principal de ce type de prairie est de produire une quantité de fourrage importante en peu de temps. Le choix des espèces utilisées est dès lors crucial pour l'agriculteur. En règle générale, cette prairie est fauchée et non pâturée.
- La prairie mixte est fauchée et pâturée, soit durant des années différentes, soit dans la même année. Elle peut être implantée de façon temporaire ou permanente.

### 2.2.2. COMPOSITION DES PRAIRIES

---

Les prairies se composent de différentes espèces, présentes en proportions variables, et dominées par les graminées et les légumineuses.

La composition optimale d'une prairie temporaire dépendra des objectifs de l'agriculteur (par exemple l'espèce d'animaux pour lesquels sont destinés les fourrages). Cependant, il est recommandé de tendre vers des prairies reprenant la composition suivante [7] :

- Minimum 75% de graminées
- Minimum 10 à 20% de légumineuses
- Maximum 15% d'autres dicotylées

Les espèces à proscrire dans les prairies sont, par exemple, les chardons, les mousses et les pissenlits. Les deux espèces étudiées dans ce travail, le dactyle et la luzerne, sont considérées comme de « bonnes » espèces dans les prairies [8, 9].

### 2.2.3. POSITION DES PRAIRIES DANS L'AGRICULTURE BELGE

La Belgique a une tradition agricole extrêmement ancienne, dans laquelle les prairies ont toujours tenu un rôle important. Bien qu'il existe de nombreux systèmes et régions agricoles dans le pays, on retrouve la présence de prairies dans chaque système, où elles occupent une importance variable.

En 2015, les prairies permanentes occupaient 30.6% de la surface agricole utile du pays. [10] A cela, il faut ajouter les prairies temporaires, dont la surface peut varier fortement d'année en année.

La Figure 1 illustre l'importance des prairies en Wallonie, en pourcentage de la SAU communale [10].

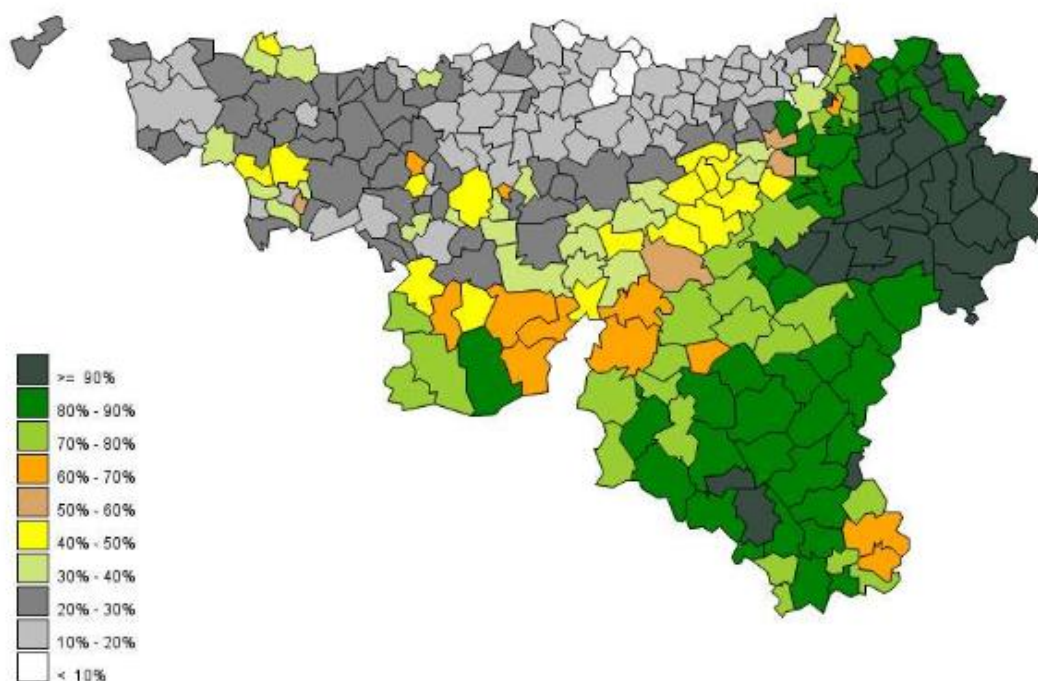


Figure 1: importance des prairies dans la SAU communale (statistiques agricoles de Wallonie, 2015)

Traditionnellement, les prairies sont utilisées par les éleveurs afin de laisser pâturer leurs bêtes, mais également pour récolter des fourrages qui permettront de nourrir le troupeau durant les mois d'hiver. Elles sont donc fauchées plusieurs fois par an, et les fourrages récoltés permettent aux agriculteurs d'être autonomes au maximum, en ce qui concerne la nourriture de leur troupeau. Pour cette raison, les prairies doivent produire des fourrages répondant aux besoins nutritifs des animaux, et doivent générer suffisamment pour éviter l'import de nourriture de l'extérieur. L'agriculteur a donc des attentes en termes de rendement et de qualité.

## 2.3. ASSOCIATIONS DE CULTURES

---

### 2.3.1. DÉFINITION

---

Une association de cultures est définie par la culture simultanée de deux ou plusieurs espèces sur une même parcelle [11]. La définition indique que les cultures doivent se trouver ensemble « pendant une période significative de leur cycle de croissance », sans spécifier ce qu'est une période significative.

Les espèces en association peuvent développer deux grands types d'interactions. Soit l'association va s'avérer bénéfique et les plantes vont en tirer avantage, soit une forme de compétition va naître entre les espèces, que cela soit pour les nutriments, pour la lumière ou pour l'eau. Dans ce second cas, il se pourrait que la productivité de la parcelle diminue.

Le but des associations de cultures est d'améliorer les performances de la prairie. Un des points sur lesquels il est facile d'intervenir est le choix des espèces. En effet, certaines espèces vont se cantonner à une niche de l'environnement dans laquelle elles se trouvent (de par leurs caractéristiques architecturales, et par la complémentarité de la disponibilité des ressources et de leurs besoins). Si les espèces mises en association explorent des niches différentes, il est possible d'observer des améliorations dans la productivité de la parcelle [12].

### 2.3.2. EVALUATION DES PERFORMANCES

---

Il existe plusieurs moyens d'évaluer la productivité d'une parcelle agricole et de la comparer à d'autres. Certains moyens semblent évidents, comme, par exemple, de mesurer et comparer le rendement (en poids sec, ou poids frais), mais d'autres voies existent également.

On peut effectuer différentes analyses sur la production des parcelles, et comparer les taux protéiques ou d'autres indicateurs de qualité de la récolte, par exemple.

Un indicateur fort utilisé dans l'étude des associations est le LER (Land Equivalent Ratio) : il compare le rendement des espèces en association avec le rendement que ces mêmes espèces auraient, si elles étaient cultivées seules sur la même superficie. Cet indicateur est donc la surface nécessaire en culture sans association pour obtenir le même rendement que la culture en association.

Si le LER est supérieur à 1, la production en association est plus importante que les productions en « simple » [12].

### 2.3.3. ASSOCIATIONS EN PRAIRIES

---

Rares sont les prairies où une seule espèce est présente, les prairies multi espèces ayant de nombreux avantages. Ces avantages peuvent varier avec les espèces associées, mais également avec de nombreux autres facteurs, climatiques ou pédologiques par exemple.

En premier lieu, une prairie comprenant une association légumineuse – graminée offre la possibilité de pouvoir réduire la fertilisation azotée, tout en gardant la productivité et la qualité de la prairie. Souvent, la qualité du fourrage en est même augmentée, grâce à la plus grande quantité de protéines apportées par la ou les légumineuse(s).

Un autre avantage d'une prairie multi espèces est la plus grande facilité de lutte contre les adventices, l'espace étant mieux occupé par les espèces désirées.

La résilience et la régularité de la production de la prairie vont également se voir améliorées. Cela semble logique car, en augmentant le nombre d'espèces présentes, on minimise le risque lié aux conditions climatiques. En effet, si une espèce se trouve dans une situation où sa production est limitée par un stress quelconque, cela peut être compensé par la présence d'autres espèces qui, elles, apprécient peut-être cette situation. Les associations entre graminées présentent également des avantages en termes de productivité.

Dans le cas des associations luzerne-graminée, il semble que la productivité de la prairie soit particulièrement améliorée pour les premières et dernières coupes de l'année, ce qui résulte en un allongement de la période de productivité. Ceci est dû à la présence de graminées précoces et peu sensibles au froid, et dépend donc de l'espèce semée [13].

## 2.4. PLANTES ÉTUDIÉES

---

### 2.4.1. LE DACTYLE

---

Les graminées, en général, permettent de fournir un fourrage de bonne qualité mais présentent la difficulté de voir cette qualité rapidement altérée si la fauche ne se produit pas au bon moment dans le cycle de la plante [8].

Le dactyle (*dactylis glomerata*) est l'une des deux espèces étudiées dans ce travail. Il s'agit d'une graminée vivace appartenant à la famille des Poaceae. Il est de petite taille (typiquement entre 20 et 50cm, mais peut atteindre 1m) et est fréquemment utilisé comme plante fourragère. Il peut être associé à d'autres plantes, dont la luzerne, avec laquelle il est régulièrement cultivé. En culture fourragère, il peut être pâturé ou ensilé [14].

Le dactyle possède un système racinaire abondant, qui se renouvelle en grande partie chaque année et présente de nombreuses ramifications [8]. Vers la fin de l'été, de nouvelles racines de tallages sont produites. Les racines du dactyle sont fasciculées mais souvent cantonnées aux horizons superficiels du sol.

---

## 2.4.2. LA LUZERNE

---

Les légumineuses présentent l'avantage de pouvoir fixer l'azote atmosphérique, et sont riches en protéines, ce qui les rend intéressantes pour l'alimentation du bétail.

La luzerne (*medicago sativa*) est une plante extrêmement commune dans nos régions, où elle est cultivée comme plante fourragère, et se trouve également à l'état sauvage. Elle fait partie de la famille des Fabaceae et atteint entre 50 et 80cm de hauteur.

Fréquemment semée en association avec une (ou plusieurs) graminée(s), elle offre la possibilité de réaliser jusqu'à 6 coupes par an. La luzerne présente la particularité de posséder un système racinaire pouvant être extrêmement profond [9].

Ce système racinaire se compose d'un pivot autour duquel s'articulent des racines secondaires et présente donc l'avantage de pouvoir puiser des ressources (telle l'eau) à des profondeurs importantes, là où d'autres plantes ne pourraient pas accéder. Les chiffres varient selon les sources, mais il semble admis que la luzerne peut avoir des racines descendant à 180cm de profondeur au minimum [15].

---

## 2.5. LA BIOMASSE RACINAIRE

---

Véritable « pompe » à ressources pour la plante, le système racinaire est un indicateur fiable de la situation que subit la plante. Il est le reflet de la santé de la plante mais également des stress qu'elle rencontre.

Du fait de sa position souterraine, le système racinaire a toujours été plus compliqué à étudier que les parties aériennes. Tant l'observation que la quantification de la biomasse racinaire sont ardues en raison de l'enchevêtrement des racines et de leur taille parfois microscopique. A cela s'ajoute, lors d'essais avec des associations d'espèces, la difficulté à déterminer la provenance des racines.

Il est toutefois possible d'effectuer des estimations de la biomasse racinaire grâce à différentes techniques.

---

### 2.5.1. INFLUENCE DU SOL SUR LE DÉVELOPPEMENT RACINAIRE

---

La biomasse racinaire et le développement de celle-ci sont fortement liés aux propriétés physico-chimiques du sol, dans des situations où d'autres facteurs (tels la présence de maladies, de parasites ou des pollutions par exemple) ne l'emportent pas.

Etant donné que le sol est un milieu extrêmement hétérogène, les racines peuvent rencontrer des conditions fort différentes durant leur croissance, et ce à petite échelle [16, 17]. Un premier élément déterminant l'architecture et le développement du système racinaire est la structure du sol. La structure du sol est définie comme l'ensemble des caractères liés à la disposition spatiale des constituants du sol ainsi qu'à la nature et l'intensité des liaisons qui existent entre eux [18].

Les racines croissent plus facilement à travers les éléments de structure, tels les pores et les fentes du sol qui présentent moins de contraintes mécaniques pour leur croissance. Ainsi, un sol avec une bonne structure et la présence d'agrégats de différentes tailles sera plus facile à explorer pour des racines, d'où l'importance de la présence de matière organique [20] et d'activité biologique. A l'opposé, un sol qui présente une compaction importante risque de limiter la zone explorée par les racines et donc les apports d'eau et de nutriments vers la plante.

Certaines plantes ont un système racinaire de type pivotant qui leur permet de continuer leur croissance dans ce type de zone de compaction. Néanmoins, dans de nombreux cas, une compaction va représenter un obstacle difficile à franchir [17].

Un deuxième élément important dans l'exploration du sol est la répartition des nutriments dans le sol. Les nutriments sont rendus disponibles grâce à l'altération des minéraux (qui deviennent alors disponibles via le complexe d'échange du sol) et par la décomposition de la matière organique du sol réalisée par voie biologique. Les nutriments ne se trouvent donc pas répartis de façon homogène dans le sol et les plantes doivent s'adapter à cette distribution, pour obtenir les ressources dont elles ont besoin. Lorsque des racines rencontrent une zone riche en nutriments, on constate une prolifération des racines dans cette zone [20]. La plante est donc capable d'investir des ressources dans l'exploration racinaire aux endroits où le « retour sur investissement » est meilleur. Il semble que cette capacité de plasticité dans l'architecture du système racinaire soit le mécanisme principal utilisé par les plantes pour faire face à l'hétérogénéité des nutriments dans le sol [20]. Dans certains cas, il apparaît que la prolifération pure et simple de racines n'est pas directement bénéfique pour la plante, et qu'elle n'en tire un avantage que lorsque des zones plus riches en nutriments sont présentes dans le sol et que des racines s'y trouvent en grand nombre [20, 21]. Cette réponse adaptative permet également à la plante d'être compétitive dans la capture de ressources localisées par rapport aux autres plantes de l'association.

Finalement, l'eau présente dans le sol peut aussi influencer fortement la croissance racinaire, pas seulement car il s'agit d'une ressource nécessaire en soi pour le développement de la plante, mais également car sa distribution influence la croissance de la racine. L'étude des réponses morphologiques à l'hétérogénéité de la distribution de l'eau du sol est un sujet d'actualité, avec des processus tels que l'hydrotropisme, l'hydropatterning et le xerobranching [22, 23, 24].

## 2.5.2. TECHNIQUES D'ÉTUDE DES SYSTÈMES RACINAIRES

L'étude des systèmes racinaires rencontre certaines difficultés pratiques. Un des défis pour réaliser une étude exacte sera de prendre en compte la variabilité naturelle potentiellement présente dans le sol [16]. Des biais peuvent également être introduits par une prise d'échantillons imparfaite, par exemple. De plus, il est compliqué de différencier les racines vivantes et mortes lors de la prise d'échantillons.

Il existe donc plusieurs méthodes pour étudier les systèmes racinaires, celles-ci dépendant des objectifs de l'étude, du type de plantes (arbres, graminées, couvert végétal,...), et du milieu dans lequel les plantes sont observées (en serre, en champ,...).

Les études du système racinaire peuvent être classifiées en deux grands types : les études descriptives et les études quantitatives. Ces études seront détaillées dans le cas d'essais réalisés en champ. En effet, certains problèmes particuliers s'y posent, telle la question du nettoyage des racines, que l'on ne retrouve pas si la plante est cultivée dans une solution aqueuse [25].

### 2.5.2.1. ETUDES DESCRIPTIVES

Une première méthode, qui peut être utilisée pour décrire le système racinaire, est l'étude du profil cultural. Cette méthode vise simplement à effectuer une coupe dans le profil cultural pour en observer les différents horizons. On peut en déduire des interactions avec les racines et évaluer de façon très sommaire comment les plantes vont profiter des ressources disponibles dans le sol. Cette méthode présente le désavantage de devoir mettre en place la coupe, ce qui endommage le site d'observations. De plus, cette méthode reste qualitative et tend à donner plus d'informations sur le sol lui-même que sur les systèmes racinaires [16].

Il est possible d'utiliser une méthode différente pour observer le développement racinaire sur le profil cultural, en établissant un profil racinaire. A nouveau, une coupe dans le profil cultural est nécessaire. Cette méthode utilise un panneau, de dimensions variables, muni d'un dispositif de pointes réparties de façon uniforme sur la surface du panneau. Ces pointes sont fichées dans le sol sur le profil, puis, le panneau est retiré. En retirant la terre collée sur les pointes, il est possible d'observer les racines et leur position exacte dans le profil [16]. Cette méthode est un premier pas vers une approche quantitative.

### 2.5.2.2. ETUDES QUANTITATIVES

Ces techniques d'étude visent à obtenir une valeur exacte, par exemple, le poids de racines provenant d'un échantillon de sol.

Pour obtenir ces échantillons, il est possible d'utiliser des blocs de sol de tailles (et donc de poids) variables et prélevés à différentes profondeurs. En éliminant la terre par lavage postérieur, il est possible d'obtenir les racines contenues dans l'échantillon de sol et donc de déterminer leur poids.

Pour recueillir ces échantillons de sol, il est également possible de réaliser un carottage dans le sol, les carottes de sol extraites contenant les racines. Ces carottes peuvent être extraites par carottage vertical, à partir de la surface du sol, ou de façon horizontale. Dans le second cas, une fosse doit être creusée et la sonde peut être enfoncée horizontalement dans la paroi de la fosse [16].

Les paramètres qui seront mesurés lors d'une étude quantitative, dépendent de l'objectif de l'étude. Ainsi, la mesure du poids sec des racines fournit des informations quant à la quantité de ressources qui sont allouées par la plante au système racinaire [21]. D'autre part, si l'on désire étudier le taux d'absorption d'eau et de minéraux, il est intéressant de mesurer la longueur des racines [21].

La détermination du nombre d'échantillons à recueillir dans une étude quantitative représente une difficulté. Le nombre optimal dépend, en effet, du type d'hétérogénéité présentée par le sol, et en particulier de son échelle [21].

La technique de nettoyage dépend de l'objectif de l'étude et du diamètre des racines : en effet, des racines présentant un diamètre plus important seront plus résistantes et pourront être soumises à un nettoyage plus vigoureux. Dans le cas de racines de petits diamètres, plus fragiles, il est conseillé de les immerger durant plusieurs heures afin de les séparer du sol. Un traitement ultrason (toujours sous l'eau) peut également être utilisé pour éliminer des particules de sol [25].

Dans tous les cas, il est conseillé de réfrigérer les racines prélevées, immédiatement après prélèvement, afin d'éviter toute dégradation anatomique [25].

## 2.6. LES SOLS

---

Les sections précédentes ont mis en avant l'importance de la structure du sol, et en particulier de la compaction.

Celle-ci est régulièrement imposée aux sols agricoles durant les interventions culturales. Elle dépend de plusieurs facteurs, identiques pour tous types de sols : la pression exercée et son temps d'application, l'état dans lequel se trouvait le sol avant l'évènement de compaction et son humidité [26].

Dans le cadre de notre travail, c'est bien évidemment ce dernier paramètre qui est remarquable. En effet, la compaction est un obstacle direct au bon développement du système racinaire, comme expliqué dans le point 2.5.1. Des études ont mis en relation le phénomène de compaction et l'humidité du sol. D'après ces expériences, il est possible de distinguer trois domaines de pourcentage d'humidité, pour lesquels les sols vont présenter des comportements différents.

Lorsque le sol est le plus sec, sa résistance est très importante : une contrainte élevée n'augmente généralement pas le niveau de compacité, et les agrégats ne semblent que peu affectés [27]. Lorsque l'humidité augmente, la résistance du sol à la compaction diminue. Il y a rupture et réarrangement des agrégats, alors que, dans le premier domaine, seuls des réarrangements étaient constatés.

Finalement, lorsque le sol est fort humide, l'humidité est fortement corrélée à la compacité : de légères modifications sur le taux d'humidité peuvent avoir un impact important sur la compaction. Des déformations et ruptures des agrégats sont constatées [27]. Dans ce troisième domaine, il semble également que le temps d'application de la contrainte devient un paramètre plus marquant.

De plus, certaines expériences ont indiqué que, lorsque la compaction augmentait, une diminution de la teneur en eau dans la gamme des hauts potentiels s'ensuivait [28], vraisemblablement suite à la disparition de pores au-delà d'un certain volume.

## *2.7. LE DÉFICIT HYDRIQUE : RÉPONSES POSSIBLES*

---

Un déficit hydrique dans le sol résulte, pour la plante, en une difficulté accrue pour l'obtention de ressources en eau. L'eau présente dans le sol est en effet retenue plus « intensément », car le potentiel du sol diminue avec les ressources en eau. Pour pouvoir absorber de l'eau, qui circule d'un potentiel élevé vers un potentiel plus bas, la plante doit trouver des moyens pour diminuer le potentiel hydrique de ses racines [29].

Cependant, ce potentiel va varier dans le sol et dans les racines, en fonction par exemple du degré d'hydratation des pores dans le sol. En conséquence, les plantes ne sont pas toutes égales face à un déficit hydrique : la profondeur et la densité de leur système racinaire sont deux paramètres qui peuvent s'avérer déterminants dans l'adaptation à la contrainte [29].

Lors d'un événement de déficit hydrique, les réponses listées ci-dessous peuvent survenir avec une intensité plus ou moins élevée, selon l'espèce, l'intensité et le type du déficit.

La première réponse concerne les parties aériennes. Le déficit hydrique, qui s'accompagne d'une réduction du potentiel hydrique foliaire, se traduit quasi instantanément en une réduction importante de l'expansion foliaire. A côté de cette réponse physique, la plante peut également altérer l'orientation ou l'angle de ses feuilles, ce qui lui permet de réduire sa demande respiratoire.

Au niveau racinaire, le rythme de croissance des racines peut être augmenté par la plante, ce qui augmente la zone explorée et donc, les chances d'obtenir de l'eau.

Le problème par rapport à cette réponse est sa lenteur : en effet, dans le cas d'un déficit survenant rapidement, la croissance racinaire risque bien d'être trop lente [29].

D'autres réponses, plus rapides, peuvent être mises en place, tant au niveau des parties aériennes que racinaires.

En premier lieu, l'ouverture des stomates peut être régulée par l'humidité du sol. Les racines qui se situent dans un milieu trop sec, produisent de l'acide abscissique, qui circule jusqu'aux feuilles et contribue à y induire la fermeture des stomates [29, 30]. Les aquaporines, de leur côté, semblent jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité de la membrane des cellules racinaires. Elles aident ainsi à gérer les flux d'eau, et leur expression peut être modifiée en conditions de déficit hydrique [29, 31].

Enfin, la plante peut, dans une certaine mesure, faire baisser son potentiel osmotique en transportant des solutés (sels, sucres,...) d'un compartiment cellulaire vers un autre [29].

La réponse du système racinaire va également dépendre de l'hétérogénéité du déficit hydrique [23]. Si le déficit est ressenti sur l'ensemble du système racinaire, il semble que la plante tende à augmenter sa biomasse racinaire, afin d'élargir la zone explorée par les racines [23]. Au contraire, si le déficit n'est localisé que sur une partie du système racinaire, la plante va concentrer la croissance racinaire dans la zone où l'eau est la plus disponible [23].

## 2.8. MÉTHODES D'IDENTIFICATION DE RACINES

---

### 2.8.1. APERÇU DES MÉTHODES

---

Pour être capable de déterminer la provenance de racines et leur répartition dans le sol, il est nécessaire de disposer d'une technique efficace. Il existe de nombreuses méthodes, utilisées en fonction des objectifs des études, et présentant chacune des avantages et des inconvénients.

Une première méthode se base sur l'étude des caractéristiques anatomiques et morphologiques des racines de différentes espèces, pour les distinguer les unes des autres. Des tables de détermination sont utilisées et comportent des critères tels que les caractéristiques du xylème ou la disposition du parenchyme. Ce genre de technique est couramment utilisé pour des racines d'espèces forestières, car leurs racines présentent des différences suffisamment importantes pour être distinguées. En revanche, les espèces herbacées sont plus compliquées à identifier par cette méthode. De plus les racines peuvent présenter des caractéristiques différentes en fonction de leur position dans le système racinaire de la plante ou des conditions environnementales, ce qui complique leur détermination [32, 33]. Des études ont montré que certains critères, telle la couleur, peuvent être efficaces pour déterminer des racines dans le cas de mélanges végétaux naturels ou non [32, 34].

Une autre méthode est la coloration de racines en appliquant un colorant dans les parties aériennes de la plante. Pour que ce colorant soit transporté jusqu'au système racinaire, il faut que la plante se trouve dans un sol très desséché. Certains chercheurs ont réussi à utiliser ce système pour distinguer des racines provenant de plantes herbacées [35]. Cependant, ce système se limite à des plantes en conditions très sèches et avec un système racinaire relativement restreint, pour que l'intensité de la coloration soit suffisante [32,36].

Une solution alternative est l'utilisation de techniques de spectroscopie à différentes longueurs d'ondes. Le principe est d'envoyer des ondes d'une certaine longueur sur l'échantillon à analyser et d'observer le motif spectral de l'échantillon. Ce motif permet d'avoir des informations sur la composition chimique de l'échantillon et ainsi de l'identifier. Différentes longueurs d'ondes peuvent être utilisées pour ces analyses : elles auront une pénétration différente dans l'échantillon et pourront donner des informations différentes. Certaines études utilisent des techniques basées sur la fluorescence en soumettant la plante à des UV [32].

Il est également possible d'identifier la provenance de racines en utilisant des marqueurs biochimiques tels des alcanes ou des alcools. Certains de ces composés vont être produits en proportions diverses, ou seront complètement différents selon les espèces de plantes. Ces différences se retrouvent au niveau des racines et permettent de distinguer les espèces. Ce genre de méthode présente le désavantage de requérir une calibration complexe, avec les proportions des divers marqueurs variant de façon continue. De plus, la quantité de ces marqueurs peut fluctuer selon les conditions environnementales [32].

## 2.8.2. MÉTHODES BASÉES SUR L'ADN

Ces méthodes se basent sur des séquences d'ADN spécifiques aux espèces pour les distinguer. Elles présentent, entre autres, l'avantage de ne pas être en lien de quelque façon que ce soit avec les conditions environnementales. Toutes ces méthodes nécessitent l'extraction et l'amplification de l'ADN des espèces étudiées [32].

La qPCR ou PCR quantitative, outre l'identification des espèces présentes dans l'échantillon, révèle la quantité de l'ADN qui s'y trouve. Pour cela, il est nécessaire de disposer de séquences d'ADN spécifiques à chaque espèce étudiée, appelées amorces, telles celles développées par certains chercheurs [38]. Ces amorces avaient été développées à partir d'analyses ISSR ou InterSimple Sequence Repeat. Les estimations de poids frais obtenues par qPCR étaient alors proches des poids frais effectifs [37]. Cependant, il semble que la quantité d'ADN extractible des racines puisse varier selon certains facteurs tels l'espèce. Dès lors, les résultats des qPCR peuvent être biaisés et refléter une surabondance de certaines espèces dans des mélanges [32, 38]. De plus l'extraction de l'ADN ne se fait pas avec la même efficacité pour toutes les espèces, ce qui peut, à nouveau, générer un biais. Finalement, les racines sont souvent lavées avant l'extraction de l'ADN, et certaines racines peuvent être endommagées ou perdues durant cette étape, ce qui va également perturber l'exactitude des résultats.

La méthode utilisée pour cette recherche est de type FFLP (pour Fluorescent Fragment Length Polymorphism). Des marqueurs sont utilisés dans des PCR pour amplifier

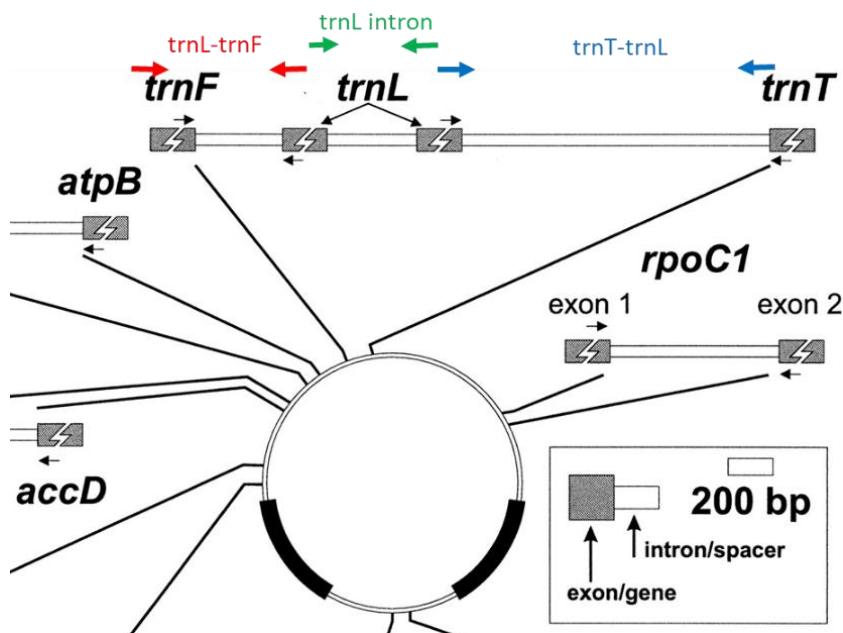


Figure 2: génome chloroplastique reprenant les marqueurs utilisés pour les analyses

certaines parties non-codantes de l'ADN des chloroplastes. Comme décrit dans certaines recherches [39], trois marqueurs sont utilisés, à savoir le trnL-Intron, le trnL-trnF et le trnT-trnL, dont la disposition dans le génome chloroplastique est détaillée dans la Figure 2. Les racines des différentes espèces sont distinguées grâce à leurs différences de tailles pour les

séquences d'ADN amplifiées. Un marqueur moléculaire fluorescent est utilisé pour visualiser les séquences d'ADN au cours d'une électrophorèse [39].

Ces marqueurs sont universels et sont capables d'amplifier des séquences présentes chez nombre d'espèces différentes. Des chercheurs ont en effet réussi à identifier 80% des 95 espèces présentes dans une prairie, principalement en utilisant les marqueurs trnL-Intron et trnL-trnF. Ces trois mêmes marqueurs sont utilisés dans ce travail, tout comme la méthode d'électrophorèse [39].

Cependant, dans leurs expériences, ces mêmes chercheurs, ont fait face à des difficultés à identifier certaines espèces. Dans les mélanges d'espèces, il arrivait que des faux négatifs soient observés, c'est-à-dire l'absence de détection d'une espèce que l'on sait présente. Il semble que ces faux négatifs concernent principalement les monocotylées [39].

---

### *3. Hypothèses et objectifs*

---

Ce travail s'insère dans le cadre du projet Fordrougt, mais ne reprend qu'une petite partie du dispositif expérimental de celui-ci. L'objectif global du projet Fordrougt est d'observer et de comparer les comportements de différentes espèces cultivées, en association ou non, dans des systèmes de prairies, afin d'évaluer le potentiel de production et de réponse de celles-ci face à une sécheresse. La finalité de cette étude est de pouvoir conseiller adéquatement les agriculteurs concernant la gestion de leurs prairies dans le contexte des changements climatiques.

Pour ce mémoire, seules deux espèces ont été étudiées, la luzerne et le dactyle, cultivées en association et en « simple ».

Au cours des expériences menées, ce travail vise à répondre à plusieurs interrogations :

- En premier lieu, on tente d'observer les différences dans l'enracinement de ces deux espèces. Instinctivement, on s'attend à observer des systèmes bien distincts, le dactyle étant une graminée et la luzerne une légumineuse. Dès lors, on veut savoir si l'espace est utilisé de façon optimale par les racines, ce qui suggère une adaptation des espèces à l'association, ou si chaque espèce va garder sa spécificité propre.
- Dans un deuxième temps, on rajoute la condition du stress hydrique, afin de voir comment chaque espèce y réagit, comment les systèmes racinaires s'y adaptent et si on observe des différences de réactions entre les espèces ou dans l'association.
- Finalement, l'aspect rendement est étudié, afin de quantifier l'impact de l'association par rapport aux espèces simples. On peut en déduire le type de comportement des plantes, c'est-à-dire, s'il y aura cohabitation entre les espèces ou, au contraire, compétition.

La principale hypothèse soutenue durant ce travail est que les associations d'espèces sont favorables et qu'elles pourraient aider à augmenter le rendement de la prairie, ou, du moins, le maintenir en conditions de déficit hydrique. Cette hypothèse se base sur la complémentarité supposée des systèmes racinaires des espèces étudiées. Vu ce que l'on sait des architectures racinaires du dactyle et de la luzerne, on s'attend à ce qu'elles n'entrent que peu ou pas du tout en compétition avec un effet favorable sur les performances de la prairie. Cependant, cette amélioration n'est pas automatique, car il se pourrait que les plantes se partagent l'espace disponible, sans que la prairie dans son ensemble bénéficie d'une meilleure productivité.

---

## 4. Matériel et méthodes

---

Dans ce chapitre, trois thèmes vont être abordés. Tout d'abord, le site expérimental et le contexte de l'étude vont être présentés. Ensuite, les prélèvements des échantillons et les mesures effectuées seront abordées et expliquées et, finalement, le travail effectué en laboratoire ainsi que l'analyse statistique des résultats seront détaillés.

### 4.1. LE SITE EXPÉRIMENTAL

---

L'ensemble des mesures réalisées dans le cadre de ce mémoire ont eu lieu sur une parcelle et sur des échantillons provenant de cette même parcelle, faisant partie du projet Fordrought géré par l'UCL. Cette parcelle fait partie du domaine de la ferme de Marbaix, ferme expérimentale de l'UCL. Le projet Fordrought, lancé en 2012, a pour but d'étudier les caractéristiques et autres interactions de différentes plantes fourragères.

#### 4.1.1. LOCALISATION

---

La parcelle se situe à proximité de Louvain-la-Neuve, dans la commune de Chaumont-Gistoux, province du Brabant Wallon, en Belgique. Ses coordonnées sont les suivantes : 50° 66' 98'' N et 4° 63' 63'' E. Sa localisation est représentée dans la Figure 3 ci-dessous.

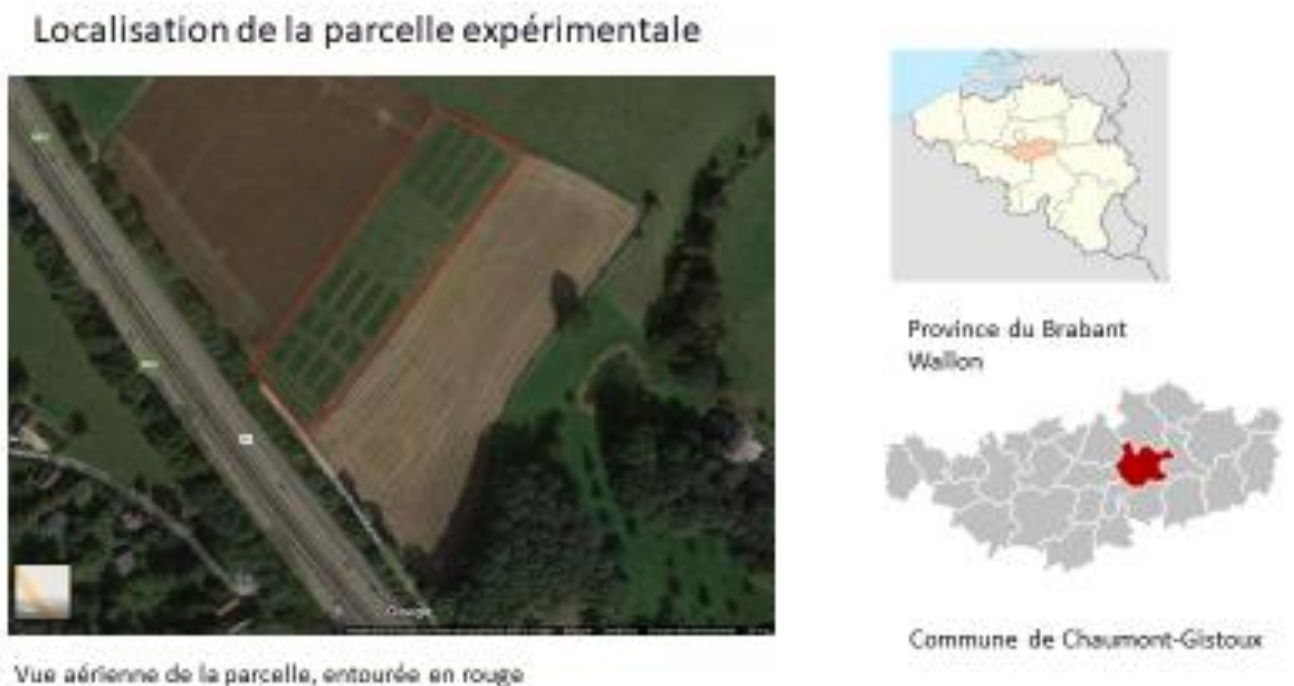


Figure 3: Localisation des parcelles expérimentales

#### 4.1.2. PÉDOLOGIE DE LA PARCELLE

La parcelle se trouve dans la région agricole dite sablo-limoneuse, caractérisée entre autres par des pH du sol variant entre 6 et 7, ce qui est excellent pour l'agriculture. Comme le nom de la région l'indique, les sols y sont riches en sable et en limon, et sont donc souvent assez drainants. La pédologie de la parcelle sera détaillée dans les résultats.

#### 4.1.3. DISPOSITION ET GESTION DES PARCELLES

Les parcelles sont utilisées pour le projet Fordrought depuis mai 2013 et ont suivi l'implantation d'un essai de maïs-sorgho. Depuis cette date, elles ont subi différents travaux du sol tels des labours et des passages de herse rotatives. Les derniers travaux datent d'avril 2016 et étaient constitués d'un labour suivi d'un passage au rouleau cannelé, et puis de trois passages de herse rotative. L'essai actuel a été semé le 21 avril 2016 après un dernier plombage. Les plantes étaient donc dans leur deuxième saison lorsque les mesures de ce mémoire ont été effectuées. Les bandes tampons entre les différents blocs sont composées d'un mélange des espèces présentes dans l'essai. Ceci est dû à la technique de semis : le semoir utilisé est plus large que les parcelles, et l'on sème sur 11m de long alors que la parcelle n'en fait que 7. Après la levée des plantes, les parcelles sont délimitées en utilisant un herbicide non sélectif (le Basta), pulvérisé grâce à un pulvérisateur muni d'une cloche anti-dérive de 30cm. Chaque parcelle est donc entourée d'une zone nue de 30cm de large.

#### 4.1.4. LE DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Le dispositif expérimental complet se compose de 64 parcelles séparées en 2 blocs, l'un ayant subi un déficit hydrique imposé et l'autre servant de témoin pour les expériences. Dans chaque bloc de 32 parcelles, 8 espèces ou combinaisons d'espèces sont implantées. Elles sont répétées quatre fois.

Le plan de ce dispositif est disponible en annexe nr 1.

Les parcelles font toutes 7 mètres de long sur 1.5 mètre de large et sont accolées par groupes de quatre. Les groupes sont séparés entre eux de 1.8m.

Dans le cadre de ce mémoire, l'intérêt s'est porté sur les 6 parcelles suivantes :

- Une parcelle de luzerne pure, stressée
- Une parcelle de dactyle pur, stressé
- Une parcelle avec l'association dactyle – luzerne, stressée
- Une parcelle de luzerne pure, témoin
- Une parcelle de dactyle pur, témoin
- Une parcelle avec l'association dactyle – luzerne, témoin

L'appellation « stressée » désigne les parcelles qui ont subi le stress hydrique imposé. Ce stress hydrique a été obtenu en installant une couverture bâchée au-dessus des parcelles. Ces couvertures sont représentées sur la Figure 4. Les parcelles avec les associations étaient nommées « mélanges ».



Figure 4: Système d'armature permettant d'imposer le stress hydrique

La Figure 5 ci-dessous reprend la disposition et les dimensions des parcelles d'intérêt, pour plus de clarté. On voit que les parcelles sont regroupées selon le traitement. Les parcelles stressées se trouvaient au sommet d'une légère pente alors que les parcelles témoins se trouvaient dans cette pente. Le stress hydrique a été imposé durant une durée d'un mois et demi durant l'été 2017, entre le 14 juillet et le 01 septembre.

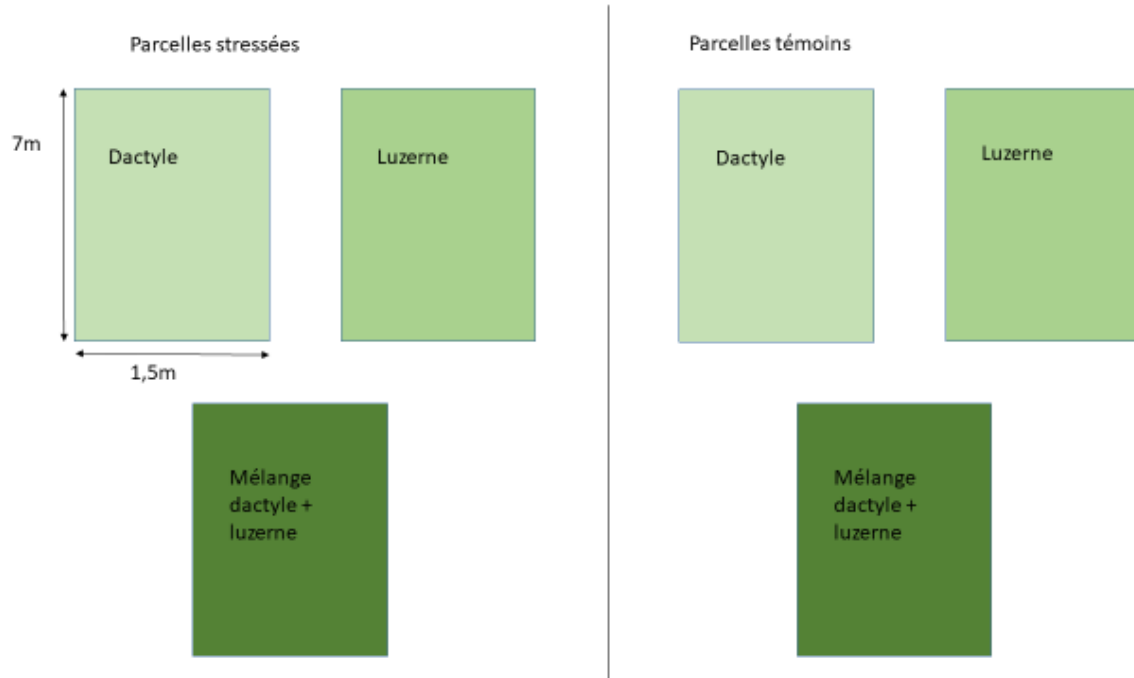


Figure 5: Parcelles d'intérêt avec dimensions

## 4.2. MISE EN PLACE DES FOSSES

Avant de pouvoir réaliser les observations et les mesures envisagées, il était nécessaire de creuser des fosses en bordure des parcelles afin d'atteindre les profondeurs d'intérêt. A l'extrémité de chacune des 6 parcelles d'intérêt, une fosse a donc été creusée à l'aide d'une pelle mécanique en date du 03 septembre 2017. Les fosses étaient toutes de mêmes dimensions, soit approximativement 1.8m de profondeur sur 1.8m de large et 2m de long. Ces fosses ont permis d'obtenir des profils de sol pour chaque parcelle, sur lesquels les observations pouvaient être effectuées. La Figure 6 montre l'excavation des fosses avec la pelle mécanique.



Figure 6: Mise en place des fosses avec la pelle mécanique

La pelle mécanique ne permettant pas d'obtenir un profil assez vertical et lisse pour réaliser des mesures correctes, une étape supplémentaire a été ajoutée. Le profil a en effet été retravaillé avec des bêches et des petites spatules afin de le rendre plus vertical, de gommer les imperfections laissées par le godet de la pelleteuse et de dégager les racines de façon optimale.

### 4.2.1. MESURE DE LA DENSITÉ RACINAIRE EN NOMBRE

Le but de cette mesure était de d'obtenir une information précise sur la présence et la quantité de racines à différentes profondeurs dans les profils de sol. Pour obtenir cette information, il était nécessaire de compter les racines à l'aide d'un dispositif permettant une mesure précise.

Les racines visibles sur le profil de la fosse ont été localisées dans un espace en 2 dimensions (la largeur de la parcelle et la profondeur du profil excavé). Pour pouvoir déterminer exactement la position des racines dans l'espace, il a été fait usage d'une grille carrée d'1m de côté, fixée au profil. Dans cette grille, un tissage faisait apparaître des carrés de 2.5cm de côté. Les racines présentes dans chaque petit carré ont été dénombrées, et, leur distribution spatiale déterminée. Le dispositif utilisé pour localiser et dénombrer les racines est représenté sur la Figure 7. Pour augmenter la surface ainsi observée, la grille a été déplacée sur le profil. De cette manière, pour chaque parcelle, 3600 comptages ont été effectués sur une



Figure 7: dispositif utilisé pour les comptages racinaires

surface de 1.5m de large et jusqu'à une profondeur de 1.5m. Sur le total des 6 fosses, on obtient donc 21 600 comptages.

### 4.3. PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS

Des carottes de sol ont été prélevées de manière à compléter les distributions observées sur les profils. Ces prélèvements ont été réalisés de deux manières différentes, décrites ci-dessous. Les racines ont ensuite été extraites.

#### 4.3.1. ÉCHANTILLONS « HORIZONTALS »

Les échantillons horizontaux ont été prélevés perpendiculairement aux profils où la densité racinaire avait été mesurée (Figure 8). Ils ont été prélevés à différentes profondeurs, avec trois répétitions par profondeur et ce, pour les 6 parcelles étudiées.

Les échantillons ont été pris aux profondeurs suivantes : 15, 30, 45, 60, 90 et 120cm. Au total, 18 échantillons ont été prélevés pour chaque parcelle. Les 3 échantillons pris à une même profondeur étaient distants entre eux de 45cm.



Figure 8: Emplacement des prélèvements horizontaux

Pour les trois premiers échantillons (pris dans le profil de la parcelle « luzerne stressée » dans l'horizon « 15cm »), des tubes d'aluminium de 5cm de diamètre ont été placés contre la paroi et enfoncés dans le sol grâce à des coups de maillets. Cette méthode était très lente, laborieuse et peu précise. Pour ne pas endommager les tubes d'aluminium par les coups, des cales en bois étaient fixées dessus, mais celles-ci s'usaient extrêmement rapidement et, après quelques coups, il fallait en changer ou risquer de voir le tube s'enfoncer de travers.

Par la suite, une autre méthode a donc été développée. Des tubes en acier inox, du même diamètre que les précédents, ont été utilisés, mais ceux-ci avaient été tourés de façon à ce qu'il soit possible d'y insérer une épaisse cale en acier inox. De cette façon, le risque d'endommager le tube était bien moindre et l'on pouvait les percuter avec une force beaucoup plus importante. Pour chaque prélèvement, un « pré-trou » était creusé en utilisant une perceuse munie d'une scie-cloche (avec un diamètre intérieur de 5cm). Dès que le pré-trou était assez long pour que le tube y tienne de lui-même, on l'y introduisait et l'on frappait alors avec une masse pour l'enfoncer.

Le tube était muni d'encoches dans lesquelles on pouvait passer une barre à mine afin de l'extraire du sol et en retirer l'échantillon.

Comme chaque prélèvement réalisé ainsi concernait un volume de sol variant légèrement, la profondeur horizontale était chaque fois notée, afin de pouvoir déterminer le volume de sol prélevé.

La Figure 9 illustre la méthode utilisée pour prélever les échantillons horizontaux.



Figure 9: Détail de la méthode utilisée pour réaliser les prélèvements horizontaux. Sur l'image A, le trou est préforé, ensuite, en B, le tube est introduit, et enfin, en C, le tube est enfoncé à coups de masse.

#### 4.3.2. ECHANTILLONS « VERTICAUX »

Les échantillons verticaux ont été pris dans les mêmes parcelles à l'aide d'une carotteuse thermique. Dans chaque parcelle, quatre carottes chacune de 5cm de diamètre et d'une profondeur d'1m ont été prélevées. Les carottes étaient prélevées de façon à être aux 4 coins d'un carré de 50cm de côté. Le côté le plus proche du profil excavé se trouvait à 50cm de celui-ci. Deux prélèvements ont donc été réalisés à 50cm du bord excavé et deux autres à 1m de ce bord.

La carotteuse thermique s'utilisait selon un protocole bien défini décrit ci-dessous et illustré à l'aide de la Figure 10. Il fallait être deux pour la manier aisément.

- Nettoyer et graisser le tube en PVC servant à contenir l'échantillon de terre
- Insérer le tube dans la carotte en acier
- Visser la tête de la carotte avec le joint
- Enfoncer manuellement la carotte en terre, là où l'on veut échantillonner
- Placer le groupe moteur sur la carotte et bien fermer les clapets latéraux
- Lancer le moteur et guider la carotteuse durant son enfoncement grâce à une rotation lente (A)

Il faut éviter d'enfoncer la carotte trop profondément, sinon il sera compliqué de la retirer

- Placer une chaîne autour du morceau de la carotte dépassant du sol
- Fixer l'autre extrémité de la chaîne sur la tige faisant office de bras de levier

- Disposer le triangle en acier à côté de la carotte et y déposer le bras de levier
- La carotte est extraite en utilisant le bras de levier (B)
- Fixer deux pinces sur la tête de la carotte pour pouvoir la dévisser (C)
- Extraire le tube en PVC à l'aide d'une pince à bout courbé

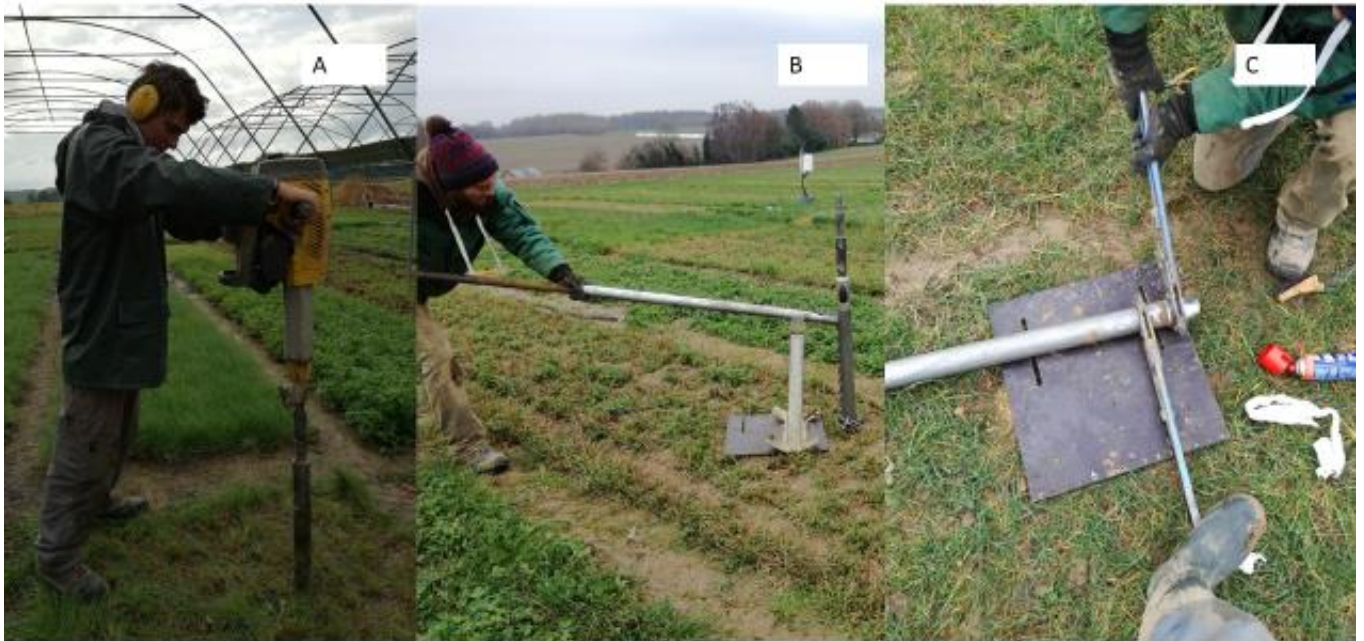


Figure 10: Détail du protocole utilisé pour l'échantillonnage vertical

Les échantillons de terre ont été conservés dans le tube en PVC (dont les extrémités étaient scellées) jusqu'au moment du lavage. Pour les extraire, deux méthodes étaient possibles. Lorsque le sol n'était pas trop compacté dans le tube, une poussée avec un piston à une extrémité suffisait à faire sortir l'échantillon. Dans les autres cas, le tube a été scié sur toute sa longueur à l'aide d'une disceuse pour permettre l'extraction de la carotte.

Chaque carotte de terre a été divisée en 5 échantillons correspondant aux profondeurs : 0-15cm, 15-30cm, 30-45cm, 45-60cm et 60-90cm.

### 4.3.3. LAVAGE ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS

Au fur et à mesure de leur prélèvement, les échantillons de sol ont été lavés de façon à en extraire les racines.

Le laps de temps entre le prélèvement des échantillons et le stockage des racines devait être le plus court possible car, dès que les racines étaient coupées du reste de la plante, elles pouvaient se dégrader, ce qui complique les mesures par la suite.

Pour « laver » correctement les racines des échantillons, un tamis a été construit, avec des mailles suffisamment fines pour que les racines ne puissent pas passer au travers, mais assez grandes pour permettre aux particules de sol d'être éliminées (Figure 11).



Figure 11: Lavage d'un échantillon de sol sur tamis

Lorsque l'échantillon était posé sur le tamis, il suffisait d'utiliser un jet d'eau pour le désagréger et éliminer la majeure partie de particules de sol.

Ensuite, les racines étaient récupérées grâce à une pince à épiler (Figure 12), séchées, placées dans des petites enveloppes d'aluminium, étiquetées et stockées dans un congélateur à la température de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Entre leur prélèvement dans les parcelles et leur lavage, les échantillons étaient conservés dans une chambre froide à la température de  $4^{\circ}\text{C}$ , pour ralentir la dégradation des racines.



Figure 12: racines obtenues après lavage

### 4.4. MESURE DE LA DENSITÉ RACINAIRE EN POIDS

Les échantillons racinaires conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ont été pesés à l'aide d'une balance de précision. Ensuite, connaissant la profondeur jusqu'à laquelle les échantillons avaient été creusés, il était aisé de calculer le volume de sol prélevé (sachant que le tube est un cylindre de 5cm de diamètre).

On obtient alors la densité racinaire en  $\text{mg}/\text{cm}^3$  de sol en divisant le poids pesé par le volume de sol calculé.

Afin de ne pas décongeler puis recongeler les échantillons, la pesée avait lieu juste avant le broyage (voir paragraphes suivants) des échantillons.

#### 4.5. PROFIL PÉDOLOGIQUE

---

Après la fin de la prise d'échantillons, un profil pédologique des parcelles a été établi avec l'aide du Prof. Delvaux. L'objectif était d'observer si on constatait des différences pédologiques entre les parcelles, qui auraient pu jouer un rôle dans l'explication des différences entre les densités racinaires des parcelles.

L'analyse du profil s'est faite durant le mois de février, à un moment où les sols étaient saturés en eau.

#### 4.6. ANALYSES GÉNÉTIQUES

---

Les échantillons de racines ont été utilisés pour discriminer les racines des deux espèces dans les parcelles en association à l'aide d'analyses génétiques.

La mise au point de cette méthode n'a malheureusement pas produit les résultats escomptés, malgré un large panel de conditions testées.

Les analyses ont été menées au laboratoire de biologie moléculaire du CRA-W, Département Sciences du Vivant, Unité de Génie biologique, en partenariat avec Madame Dominique Mingeot et les personnes travaillant au laboratoire.

##### 4.6.1. IDÉE GÉNÉRALE

---

Le protocole permettant de déterminer l'appartenance des racines était le suivant. En premier lieu, les échantillons (horizontaux et verticaux) provenant des parcelles avec les mélanges d'espèces ont été broyés. Ensuite, l'ADN a été extrait des broyats et amplifié à l'aide de PCRs. Finalement, les fragments d'ADN amplifiés ont été observés sur un gel d'électrophorèse et attribués aux deux espèces sur base de leur longueur. En appliquant ce protocole à tous les échantillons des parcelles des mélanges, il devait être possible d'obtenir une carte de la présence ou l'absence des espèces dans le sol.

Afin de mettre au point le processus expérimental, il a été nécessaire d'avoir une série d'échantillons « tests » dont l'ADN a pu être extrait, amplifié et observé.

Comme les analyses génétiques ne concernent que les échantillons provenant des parcelles en association, ces échantillons tests ont été pris parmi les autres échantillons disponibles.

Pour mettre au point la méthode et déterminer avec certitude la longueur des fragments pour chaque espèce, nous avons analysé des échantillons contenant uniquement du dactyle, d'autres avec seulement de la luzerne et enfin des échantillons avec les deux espèces (appelés mélanges ou MEL). Il a également été important d'avoir des échantillons provenant des horizons supérieurs du sol et d'autres d'horizons plus profonds, afin d'estimer la limite de détection du protocole.

Douze échantillons ont été choisis pour réaliser des tests de mise au point. Les échantillons MEL ont été constitués en combinant un échantillon de dactyle pur et un autre de luzerne pure, tous deux prélevés à la même profondeur, de manière à s'assurer de la présence des deux espèces dans l'échantillon.

Les échantillons utilisés pour les tests sont repris ci-dessous :

- 1) Dactyle stressé pris à 0-15cm
- 2) Luzerne stressée prise à 0-15cm
- 3) Mélange stressé pris à 0-15cm
- 4) Dactyle stressé pris à 90cm
- 5) Luzerne stressée prise à 90cm
- 6) Mélange stressé pris à 90cm
- 7) Dactyle témoin pris à 0-15cm
- 8) Luzerne témoin prise à 0-15cm
- 9) Mélange témoin pris à 0-15cm
- 10) Dactyle témoin pris à 90cm
- 11) Luzerne témoin prise à 90cm
- 12) Mélange témoin pris à 90cm

---

#### 4.6.2. BROYAGE DES ÉCHANTILLONS

---

Tous les échantillons ont été conservés à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de leur broyage, la pesée (pour déterminer la densité massique racinaire) s'effectuant juste avant le broyage.

Pour maintenir les échantillons au froid, les mortiers et pilons utilisés pour le broyage ont été préalablement refroidis à l'aide d'azote liquide. Les tubes recevant les broyats ont également été refroidis de manière similaire et, dès que le broyage a été fini et que les broyats ont été transvasés dans les tubes, ceux-ci ont été replacés au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Bien évidemment, les mortiers et pilons ont été stérilisés après utilisation.

---

#### 4.6.3. EXTRACTIONS D'ADN

---

Le protocole utilisé pour toutes les extractions d'ADN a été adapté à partir du protocole de Doyle & Doyle, focus 12 nr 1, 13-15 (1998).

Différentes solutions ont été utilisées pour les extractions, elles sont listées ci-dessous :

- Le tampon d'extraction (à conserver à  $4^{\circ}\text{C}$  après dissolution à  $60^{\circ}\text{C}$ )
  - 10ml Tris HCl 1M (pH 8)
  - 10ml EDTA 200mM (pH 8.5)
  - 28ml NaCl 5M
  - 200 $\mu\text{l}$   $\beta$ -mercaptoéthanol
  - 2g CTAB
  - 1g PVP (40)
  - 5ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  10mM
  - 100ml  $\text{H}_2\text{O}$  stérile
- Chloroforme (96ml) / Alcool isoamylique (4 ml)
- Isopropanol (à conserver à  $4^{\circ}\text{C}$ )
- Ammonium d'acétate 10M
- Ethanol absolu
- NaCl 5M

- Ethanol 70%
- Rnase 10mg/ml
- TE :
  - 1ml Tris 1M
  - 0.5ml EDTA 200mM
  - 98.5 ml H<sub>2</sub>O stérile

Le protocole en lui-même est le suivant :

- 1) Préchauffer le tampon d'extraction à 60°C (25ml pour 36échant. +50µl β-mercaptoéthanol)
- 2) Prélever 100mg de tissus broyés dans l'échantillon stocké à -80°C \*
- 3) Ajouter 600µl de tampon d'extraction préchauffé
- 4) Incuber 40-45 min à 60°C en agitant régulièrement
- 5) Ajouter 600µl de Chloroforme/alcool isoamylique
- 6) Mélanger doucement par inversion des cupules
- 7) Centrifuger 15min à 10 000rpm à température ambiante
- 8) Transférer la phase aqueuse\* (supérieure) dans un nouvel eppendorf de 2ml
- 9) Précipiter avec 200µl NaCl et mélanger
- 10) Reprécipiter en remplissant l'eppendorf d'éthanol (100%) et mélanger
- 11) Centrifuger 10min à 10 000rpm à 4°C
- 12) S'il reste du sel, recommencer à l'étape 10) avec 100µl de tampon et 200ml d'éthanol 100%
- 13) Laver le culot avec 100µl d'éthanol 70%
- 14) Centrifuger 5min à 4°C
- 15) Faire sécher
- 16) Resuspendre dans 50µl de TE et laisser dissoudre
- 17) Ajouter 2µl de Rnase, laisser 30min à 37°C
- 18) Stocker les échantillons à -20°C

Les extractions ont été réalisées en différentes séries de quelques échantillons (de 9 à 12 échantillons).

---

#### 4.6.4. DENSITÉS OPTIQUES

---

Après une série d'extractions, la quantité et la qualité d'ADN présente dans chaque échantillon a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un appareil Nanodrop qui fournit la concentration d'ADN par échantillon en ng/µl et une indication de la qualité de cet ADN. L'appareil mesure pour ce faire le rapport entre la densité optique (DO) des échantillons à 260 et 280nm. Un ADN de bonne qualité possède un rapport entre 1.8 et 2.0. En effet, à 260nm, ce sont principalement les acides nucléiques qui vont absorber la lumière alors qu'à 280nm, les protéines vont prendre le dessus. Le rapport entre les DO est donc une indication de la quantité d'acides nucléiques par rapport à celle de protéines. Si ce rapport est trop faible, cela signifie que l'extraction d'ADN ne s'est pas déroulée correctement et/ou qu'il y a eu contamination.

Après cette mesure, les échantillons ont été dilués pour atteindre une concentration de 20ng/µl.

#### 4.6.5. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Durant les analyses, de nombreuses amorces ont été utilisées. A l'origine, seules deux paires d'amorces devaient être employées, ciblant les loci trnL-intron et trnL-trnF, et pour lesquelles les mélanges PCR se trouvent sur le tableau 1. Par la suite, d'autres paires d'amorces ont été utilisées, ciblant les loci K1K2 et trnT-trnL. Les mélanges pour ces marqueurs sont semblables à ceux du tableau 1 et sont présentés dans l'annexe 2.

Tableau 1: Mélanges PCR pour les marqueurs trnL-Intron et trnL-trnF pour un volume final de 20µl

trnL-Intron	trnL-trnF
➤ 1 µl ADN	➤ 1 µl ADN
➤ 4 µl Tampon PCR 5x	➤ 4 µl Tampon PCR 5x
➤ 2 µl dNTPs (2mM)	➤ 2 µl dNTPs (2mM)
➤ 2 µl BSA 10mg/l	➤ 2 µl BSA 10mg/l
➤ 1.2 µl MgCl <sub>2</sub> (25mM)	➤ 1.2 µl MgCl <sub>2</sub> (25mM)
➤ 0.3 µl amorce trnL-intron (10µM)	➤ 0.3 µl amorce trnL-trnF (10µM)
➤ 0.3 µl amorce trnL-intron* (marquée) (10µM)	➤ 0.3 µl amorce trnL-trnF* (marquée) (10µM)
➤ 9.1 µl H <sub>2</sub> O	➤ 9.1 µl H <sub>2</sub> O
➤ 0.1 µl Taq 5U	➤ 0.1 µl Taq 5U
➔ <b>Total = 20µl</b>	➔ <b>Total = 20µl</b>

Le tampon, le MgCl<sub>2</sub> et la Taq proviennent de la société Proméga et le dNTPs vient de chez Thermo Fisher.

Pour réaliser les PCR, l'ADN est inséré en premier dans les cupules, avant même d'avoir composé le mélange des autres réactifs. Ce mélange est réalisé en quantité suffisante pour l'entièreté de la série, et ensuite transféré dans chaque cupule séparément.

Les appareils utilisés pour les cycles d'amplification sont des thermocycleurs provenant de la marque Bio-Rad. Le cycle d'amplification, identique pour les deux marqueurs, est indiqué dans le Tableau 2 :

Tableau 2: Détails du cycle d'amplification utilisé pour les PCR avec les marqueurs trnL-Intron et trnL-trnF

Température (°C)	Temps	
➤ 94°	➤ 5'	2x
➤ 94°	➤ 1'	
➤ 60°	➤ 1	33x T° -0.4°/cycle
➤ 72°	➤ 1'20''	
➤ 94°	➤ 1'	
➤ 59.6°	➤ 1'	
➤ 72°	➤ 1'20''	
➤ 72°	➤ 10'	
➤ 12°	➤ Jusqu'au retrait	

Après avoir été retirés du thermocycleur, les échantillons amplifiés sont placés au congélateur à -20°C.

Pour chaque PCR, des témoins négatifs (cupules ne contenant pas d'ADN) étaient utilisés pour vérifier qu'il n'y avait pas eu de contamination lors des manipulations.

---

#### 4.6.6. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'ACRYLAMIDE

---

Afin d'observer les résultats de la PCR, la première technique utilisée était l'électrophorèse sur gel d'acrylamide. Le principe en est très simple : les échantillons sont placés d'un côté du gel, auquel un courant électrique est appliqué. Les échantillons vont alors migrer en fonction de leur taille et, grâce à un laser, l'appareil LICOR les détecte. L'appareil utilisé était un LICOR DNA 4300 (Westburg).

Les échantillons de la PCR devaient être dilués pour être placés dans le LICOR, et différentes dilutions ont été testées. Les tests effectués sont détaillés dans la partie 1.7.8.

---

#### 4.6.7. ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

---

Après avoir constaté que les résultats n'étaient pas concluants avec les gels d'acrylamide, une autre technique de visualisation a été testée avec des gels d'agarose. Le principe reste le même que pour les gels d'acrylamide : les échantillons vont migrer en fonction de leur taille sur un gel soumis à un courant électrique. La différence réside dans l'observation du résultat : après un certain temps de migration (ici plus ou moins 1h30), le gel est éclairé aux UV et il est alors possible de voir la position des échantillons. Dans le premier puits, sur le gel, est placé un marqueur de poids moléculaire. Lors de la migration, il va créer une « échelle » composée de poids moléculaires connus, avec lesquels il est possible de comparer les échantillons de poids inconnus.

---

### 4.7. TESTS EFFECTUÉS

---

Le protocole expliqué dans le point 1.7 est celui qui était prévu initialement. Cependant, durant la mise au point, il est apparu rapidement que l'amplification par PCR ne fonctionnait pas de façon souhaitée. De nombreux tests ont alors été menés pour tenter d'améliorer les résultats obtenus.

La table 3 est un résumé des différents tests effectués. Les tests portaient sur les différents facteurs sur lesquels il était possible d'intervenir pour détecter le dactyle. Il n'a pas été nécessaire d'effectuer des essais pour détecter la luzerne car elle était détectée dans toutes les conditions testées. Un premier paramètre, évident, est le choix du locus marqueur et des amorces correspondantes. Différents marqueurs ont été testés, avec des résultats plus ou moins prometteurs et dans un large panel de conditions, mais aucun n'a délivré de résultat vraiment satisfaisant. Les quantités d'amorces ont également varié, sans bénéfice. Dans le tableau 3, les marqueurs sont abrégés :

- trnL-Intron = Intron
- trnL-trnF = L-F
- trnT-trnL = T-L

Les conditions de la PCR ont également été modifiées, en commençant par la température d'hybridation ou le nombre de cycles, mais ceci n'a pas eu d'effet positif. D'autres modifications ont porté sur le type de gel, la dilution effectuée sur le gel etc. Afin d'optimiser l'amplification, des échantillons ont même été soumis à des doubles PCR, c'est-à-dire qu'à l'issue d'une première PCR, 1µl était prélevé et réinjecté dans une nouvelle PCR.

(1) A partir du 09-03, toutes les PCR contenaient un set d'échantillons « témoins » (T), où les ADN et leurs concentrations étaient connus. Ce set était composé de 8 échantillons :

- T-1 : luzerne pure
- T-2 : dactyle pur
- T-3 : luzerne 10µl – dactyle 10µl
- T-4 : luzerne 5µl – dactyle 15µl
- T-5 : luzerne 15µl – dactyle 5µl
- T-6 : luzerne 2µl – dactyle 18µl
- T-7 : luzerne 18µl – dactyle 2µl
- T-8 : témoin négatif : pas d'ADN

Tableau 3: Détail des variations tentées durant la mise au point de la méthode, pour détecter le dactyle dans les échantillons de mélange

Date	Marqueur	Conditions PCR	Gel	Dilution gel	Autre
02-03	Intron	standard	Acrylamide	100x	/
05-03	L-F	standard	Acrylamide	100x	/
06-03	Intron	standard	Acrylamide	20x	/
07-03	Intron	standard	Acrylamide	100x	Marqueurs doublés
07-03	L-F	standard	Acrylamide	100x	Marqueurs doublés
08-03	L-L	standard	Acrylamide	100x	Echantillons sûrs
08-03	Gwm	standard	Acrylamide	100x	Echantillons sûrs
08-03	Gwm-Intron	standard	Acrylamide	100x	Echantillons sûrs
09-03	T-L	standard	Agarose	20x	/
09-03	Intron	standard	Agarose	20x	Différentes dilutions ADN (1)
12-03	T-L	standard	Agarose	20x	Différentes dilutions ADN
13-03	Intron, T-L et L-F	standard	Agarose	20x	/
13-03	T-L	-0.4°C/cycle	Agarose	20x	/
13-03	T-L	-0.4°C/cycle et 5 cycles en +	Agarose	20x	/
15-03	T-L	standard	Agarose	20x	Double PCR
19-03	trnT-trnL	standard	Acrylamide	20x	/
27-03	Intron	standard	Agarose	20x	Echantillons champ

28-03	T-L	standard	Agarose	20x	Echantillons champ
29-03	T-L	standard	Agarose	20x	Nouveaux kits de réactifs
03-04	Intron, T-L, L-F	standard	Agarose	20x	PCR en temps réel
03-04	Intron, T-L, L-F	standard	Agarose	20x	PCR avec Taq Phusion de biolabs
05-04	C-D, K1-K2	standard	Agarose	20x	/
05-04	K1-K2	température d'hybridation augmentée à 55°C	Agarose	20x	/
06-04	T-L	standard	Agarose	20x	/
06-04	K1-K2	standard	Agarose	20x	/
10-04	C-D, K1-K2	standard	Agarose	20x	Amorces rediluées
12-04	C-D	standard	Agarose	20x	Double PCR
13-04	C-D	standard	Agarose	20x	Simple et double PCR
13-04	K1-K2	3 PCR's identiques avec des T° d'hybridation de 53°, 55° et 58°C	Agarose	20x	/

Le problème rencontré durant tous ces tests était quasiment toujours le même, à savoir que le dactyle n'était pas observable lorsqu'il se trouvait en mélange avec la luzerne.

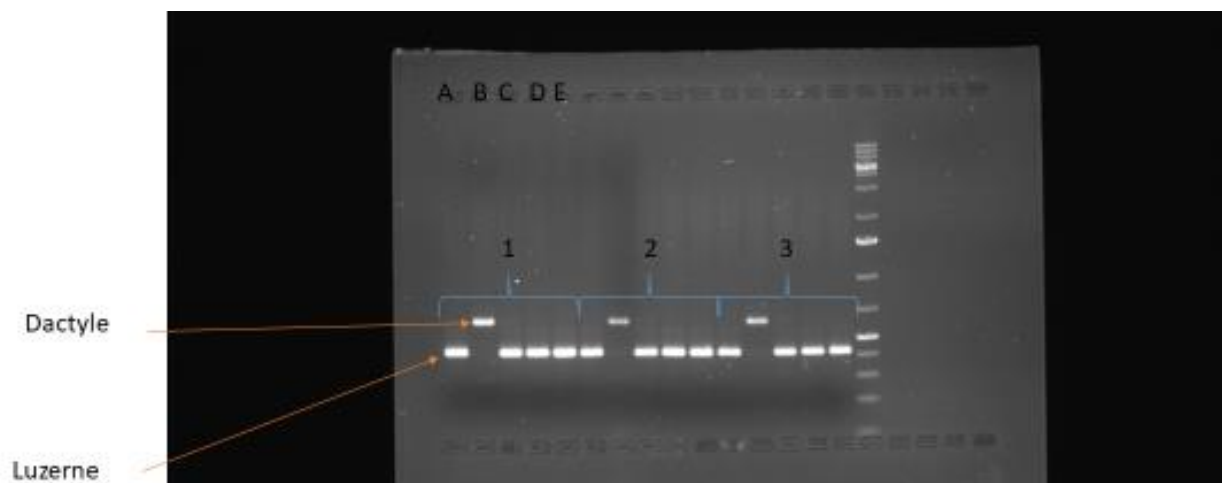


Figure 13: gel d'agarose du 09-03 avec le marqueur *trnL*-Intron pour des échantillons de luzerne pure, de dactyle pur et de mélange à différentes dilutions

Sur ce gel, on peut constater le problème : la colonne A contient de la luzerne pure, la colonne B du dactyle pur, et les colonnes C, D et E un mélange de luzerne et dactyle de respectivement

50%, 25% et 10% de dactyle. La série 1 contient, pour chaque colonne, 20ng d'ADN, la série 2 en contient 2ng et la série 3 en contient 0.2ng.

Grâce aux séries, on peut constater que le problème ne provient pas de la limite de détection, car, même lorsqu'il n'y a que 0.2ng d'ADN, la réponse est claire et précise. On peut également constater que le dactyle est bien détecté systématiquement lorsqu'il est seul présent dans la colonne.

#### *4.8. ANALYSES STATISTIQUES*

---

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R et de l'interface Rcommander. Ces analyses portent sur les résultats des comptages racinaires et des mesures de densité racinaires provenant des prélèvements horizontaux et verticaux. Les mesures sont les variables à expliquer en utilisant des facteurs qui vont avoir une influence sur les mesures. Ces facteurs sont communs aux comptages et aux densités racinaires et sont au nombre de trois : le traitement, l'espèce et la profondeur. Le facteur « espèce » comporte 3 niveaux distincts qui correspondent aux espèces ou leurs associations présentes dans les parcelles étudiées, soit « dactyle », « luzerne » ou « mélange ». Le facteur traitement comporte 2 niveaux correspondant aux traitements « stressés » ou « témoins ».

Le but de ces analyses statistiques est de déterminer si certains facteurs ont une influence sur les variables mesurées et, si oui, lesquels. Pour étudier chaque facteur de façon individuelle, des tests ANOVA 1 de comparaison de moyennes sont effectués pour ces facteurs. Des tests de Tukey ont également été réalisés pour obtenir des comparaisons multiples de moyennes.

De plus, il est possible que les interactions entre facteurs puissent avoir un impact sur les résultats. Pour estimer cet impact, des ANOVA 2 et 3 sont effectués sur des combinaisons de facteurs. A nouveau, ce sont les moyennes des résultats qui sont comparées selon les facteurs pris en compte.

Pour l'ensemble de ces tests, au vu de l'importante variabilité induite par l'échantillonnage, il a été convenu de considérer un seuil de signification de 0.05.

## 5. Résultats et discussion

Ce chapitre présente les données récoltées sur le terrain et en laboratoire par les différents protocoles et expériences décrits dans le chapitre précédent ainsi que les résultats des tests statistiques effectués afin d'évaluer les différences entre traitements. La partie discussion de ce chapitre a pour objectif de donner un sens aux résultats obtenus. Elle tend en particulier à relier entre elles les variables significatives.

### 5.1. DONNÉES MÉTÉOROLOGIQUES ET PÉDOLOGIQUES

#### 5.1.1. DONNÉES MÉTÉOROLOGIQUES

Ayant réalisé ce travail en champ, il est important de présenter les données concernant l'environnement, soit les données météorologiques et pédologiques. Les données météorologiques ont été relevées sur les parcelles d'essai. Il y a deux stations météo installées sur l'essai : l'une à proximité des parcelles témoins et l'autre, près des parcelles stressées. Les données d'intérêt dans ce cas sont les températures sur les parcelles et la pluviométrie.

Les données représentées dans la Figure 14 ci-dessous concernent les mois de juin à octobre 2017.

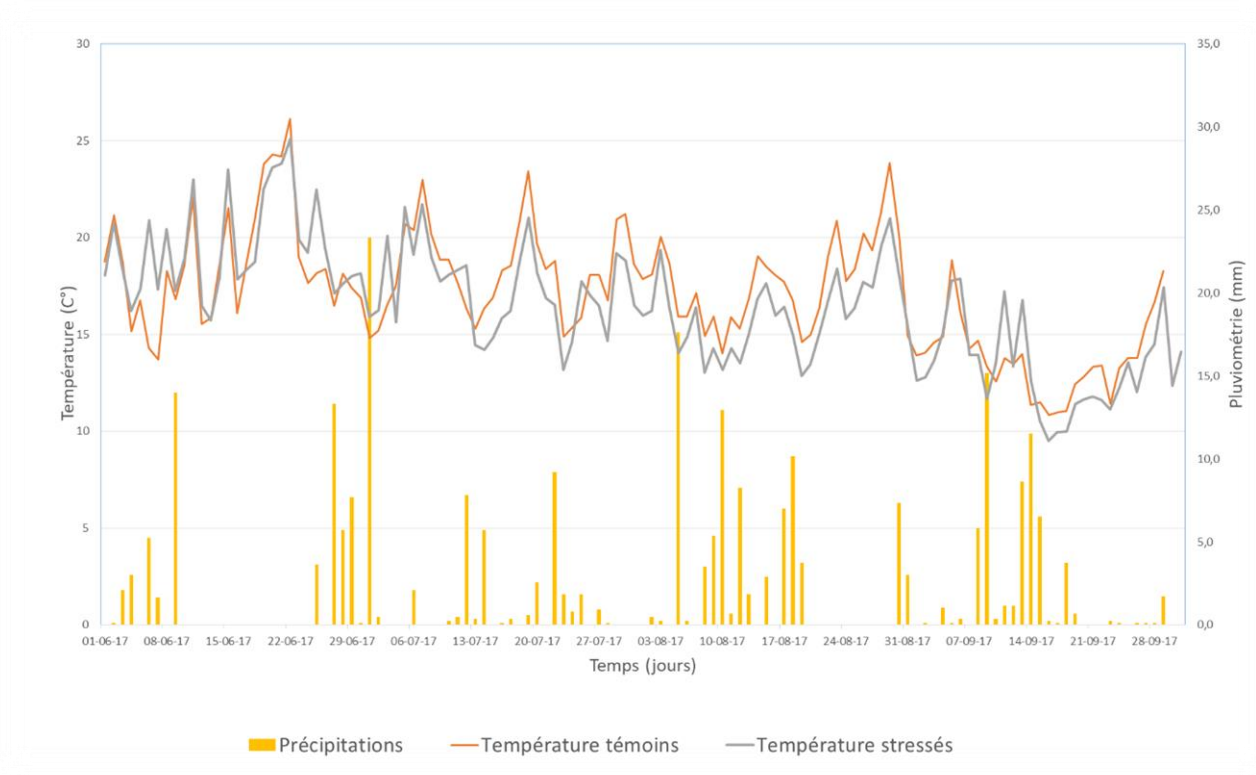


Figure 34: Evolution de la température journalière moyenne et de la pluviométrie en fonction du temps durant les mois de juin à octobre 2017.

En mettant ces données de température et de pluviométrie en perspective avec celles des années précédentes, on peut affirmer que ces valeurs ne représentent pas une anomalie par rapport aux autres années. Elles se trouvent dans la moyenne de ce qui est observé d'habitude.

### 5.1.2. DONNÉES PÉDOLOGIQUES

Les données pédologiques proviennent des observations menées sur le terrain avec l'aide du Prof. Delvaux.

Lors de ces observations, les profils pédologiques de trois des six parcelles a été décrit en utilisant les fosses. Les trois autres parcelles, présentant des caractéristiques similaires, n'ont pas été étudiées en détail. Les trois parcelles étudiées sont la parcelle de « Mélange témoin », celle de « Mélange stressé » et celle de « Dactyle stressé ».

Les parcelles étaient situées sur deux zones : la zone soumise au déficit hydrique se trouvait en haut d'une légère pente, et la zone des parcelles témoins se trouvait le long de cette pente.

- Parcelle de « Mélange témoin » : Sol de type Abb

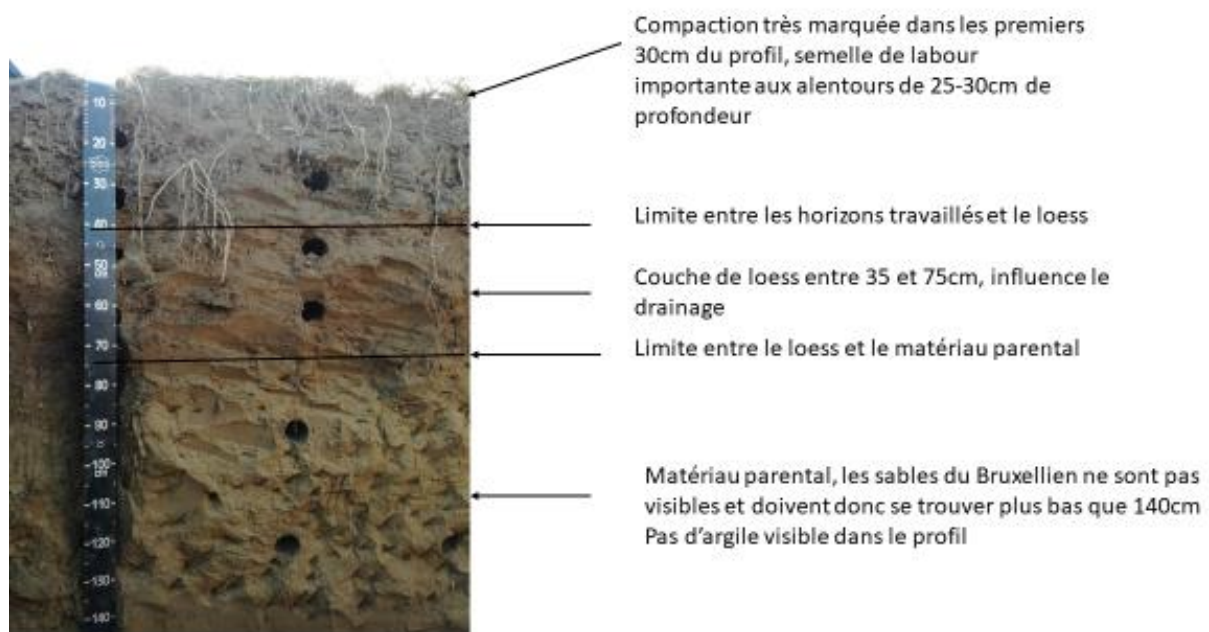


Figure 15: Profil de sol de la parcelle de mélange témoin et observations réalisées sur le terrain avec le Prof. Delvaux

- Parcelle de « Mélange stressé » : Sol de type Aba

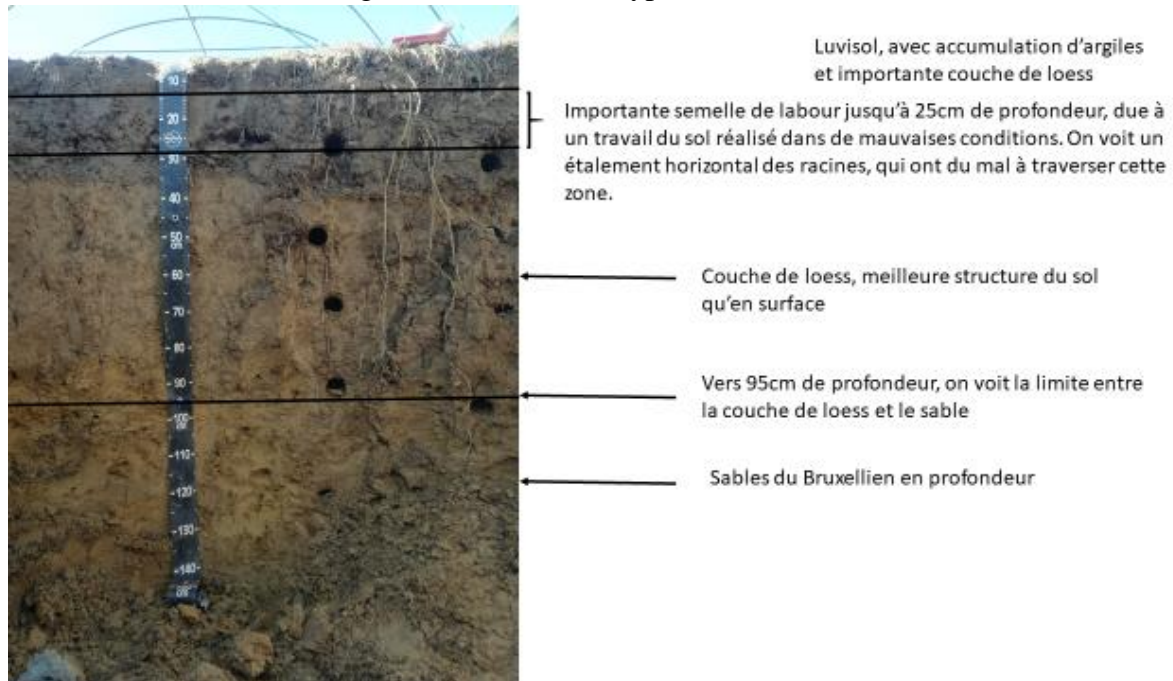


Figure 16: Profil de sol de la parcelle de mélange stressé et observations réalisées sur le terrain avec le Prof. Delvaux

- Parcelle de « Dactyle stressé » : sol similaire à celui de la parcelle de mélange stressé ; également de type Aba. On trouve des traces d'hydromorphie assez haut dans le profil, indiquant que de l'eau stagne, probablement à cause de la semelle de labour qui est à nouveau bien présente et très épaisse.

De ces observations, il ressort que les sols des parcelles stressées et des parcelles témoins sont similaires entre eux. La constatation la plus importante est la présence systématique d'une semelle de labour fort épaisse. Le tassement du sol est marqué, ce qui a pour conséquence de réduire les espaces poreux et donc, de diminuer l'infiltration et la circulation de l'eau dans le sol.

Ceci pourrait générer une nouvelle augmentation du stress hydrique ressenti par les plantes. En effet, non seulement l'eau n'arrive pas à s'infiltrer rapidement dans le sol et ne contribue pas à recharger les horizons plus profonds, mais, de surcroît, les racines des plantes peinent à franchir cet horizon tassé pour accéder à l'eau qui pourrait se trouver en profondeur.

A plusieurs reprises, il a été observé que les racines s'étaient étalées horizontalement au niveau de cette semelle de labour et utilisaient des macropores déjà existants (telles des galeries de vers de terre) pour la franchir. Une fois l'obstacle franchi, les racines occupaient à nouveau l'espace de façon plus homogène.

Selon le Prof. Delvaux, il est essentiel d'améliorer la structure du sol, afin de permettre aux plantes d'avoir accès à l'eau de façon optimale. Ceci peut être accompli en effectuant une décompaction du sol dans des conditions sèches. Cependant, vu l'importance de la couche compacte, il est probable que plusieurs passages d'outils soient nécessaires avant d'obtenir un sol avec une bonne structure.

## 5.2. TENEUR EN EAU VOLUMIQUE

Durant l'été 2017, des sondes de type TDR ont donc mesuré la teneur en eau volumique à différentes profondeurs dans les parcelles témoins et stressées. Les sondes ne se trouvaient pas dans les parcelles étudiées pour ce mémoire, mais dans d'autres parcelles du projet ForDrought, soumises aux mêmes conditions climatiques et de déficit. D'après les mesures récoltées par ces sondes, on peut constater l'évolution de la teneur en eau au fil du temps. Cette évolution est présentée sur les graphes ci-dessous pour les différentes profondeurs de mesures.

Intuitivement, on s'attend à observer une teneur en eau qui varie moins à de grandes profondeurs que quelques centimètres sous la surface. Les mesures semblent confirmer cette intuition : les courbes reprenant les mesures faites à 75 et 105cm de profondeur n'évoluent que peu, au cours des quelques mois de mesures. En revanche, on voit que les teneurs en eau à 15cm de profondeur (et à 30cm dans les parcelles témoins) fluctuent nettement plus.

Dans la parcelle stressée, on voit que, durant la période de déficit hydrique (soit de mi-juillet à fin août), la teneur en eau ne remonte jamais, pour toutes les profondeurs. La diminution de la teneur en eau est très faible et indique une activité transpiratoire limitée de la part des plantes. Les mesures effectuées après la fin du déficit indiquent qu'à 15cm de profondeur, la teneur en eau a augmenté de façon importante, alors que pour les autres profondeurs, cette augmentation n'est pas ou très peu présente. On voit même qu'à 75 et 105cm, la diminution de la teneur en eau se poursuit durant le mois de septembre.

En revanche, dans la parcelle témoin, on voit que la teneur en eau à 15cm varie nettement plus : après une baisse durant le mois de juillet et début août, elle est de 30% vers le 10 août alors qu'à ce même moment, dans la parcelle stressée, il y a moins de 15% d'eau dans le sol à 15cm. A 75 et 105cm, la teneur en eau n'évolue que très peu dans la parcelle témoin. Le fait que le sol soit et reste humide en profondeur indique que les plantes disposaient d'eau en profondeur mais que, si elles ont été stressées, c'est qu'elles n'ont pas réussi à l'atteindre. D'autre part, il y avait probablement une sorte de barrière qui empêchait la remontée capillaire de 75 à 30cm, probablement due à la semelle de labour.

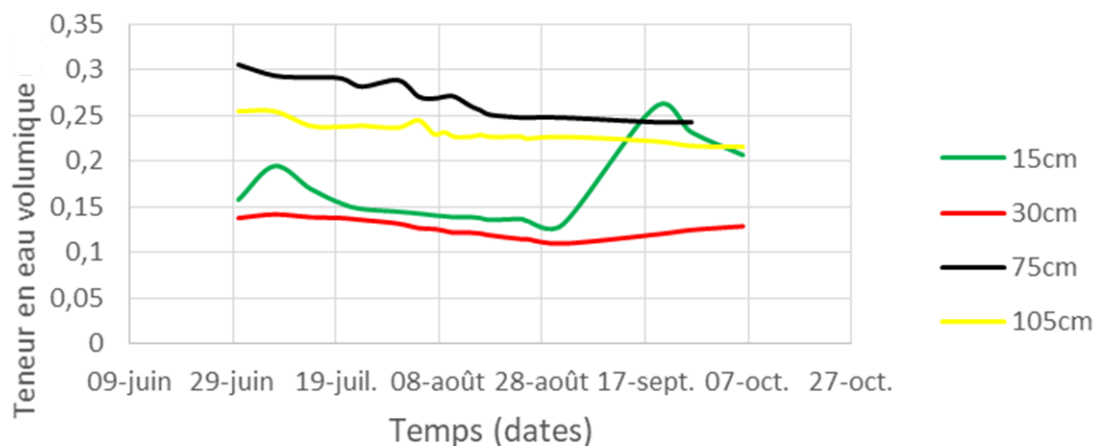


Figure 17: Evolution de la teneur en eau volumique à différentes profondeurs dans une parcelle stressée

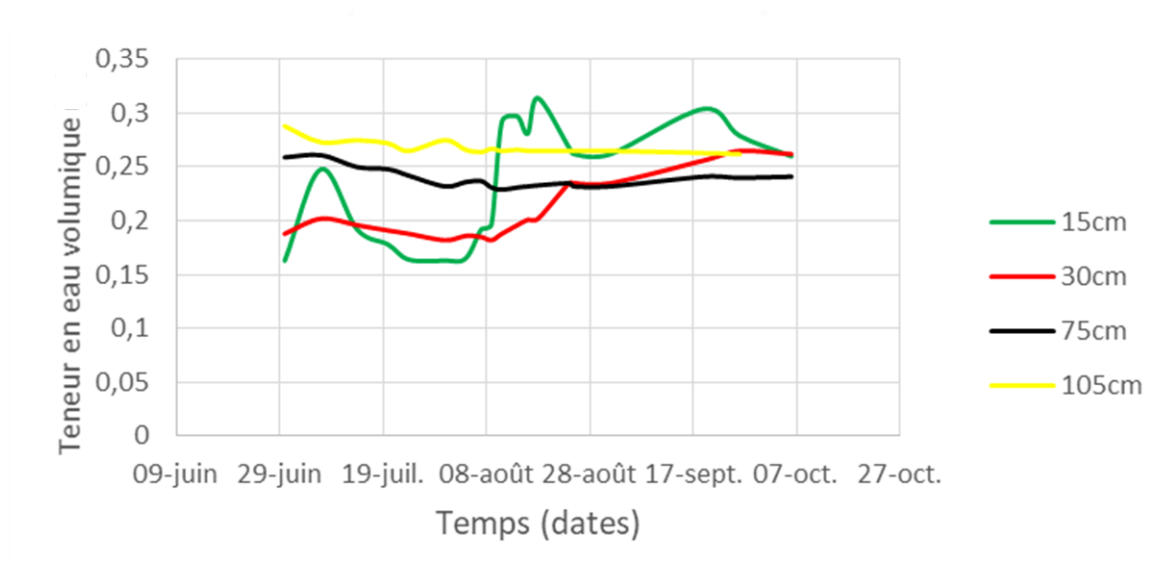


Figure 18: Evolution de la teneur en eau volumique à différentes profondeurs dans une parcelle témoin

### Discussion

En raison de l'absence de répétitions, il n'est pas possible de réaliser une analyse statistique sur ces mesures. On voit nettement que la teneur en eau diminue dans les parcelles stressées, contrairement aux parcelles témoin. Toutefois, comme la variabilité est principalement localisée dans les 30 premiers cm du sol, il y a fort à parier que ce sont les racines situées dans cette zone qui en souffriront. De plus, les teneurs en eau à 75 et 105cm sont nettement supérieures à celles dans les premiers horizons du sol durant le déficit. De ce fait, les racines plus profondes ne subiront donc probablement pas d'impacts causés par ce déficit. Cependant, comme la production de biomasse a été affectée par le déficit hydrique, les racines situées en profondeur n'ont pas réussi à fournir suffisamment d'eau à la plante.

Cependant, il semble difficile de déterminer s'il y a une corrélation entre le nombre de racines ou leur densité et la teneur en eau volumique, car les comptages racinaires et la densité ne représentent pas l'évolution des racines au cours du déficit hydrique, mais bien l'état du système racinaire après coup. Il est donc compliqué d'affirmer tel ou tel comportement de la part de la plante. Malgré cela, il est fort probable que la plante réagisse à la présence ou l'absence d'eau en orientant la croissance de son système racinaire. Une étude [42] a démontré que les plantes étaient capables de choisir les endroits sur les racines principales où les racines latérales se développaient, en fonction de la disponibilité en eau à ces endroits. Le déficit hydrique imposé aura donc sûrement pour conséquence de modifier le développement de ces racines latérales. Il serait donc intéressant de réaliser des études où le système racinaire est comparé avant, durant et après le déficit hydrique.

Ce déficit hydrique peut avoir diverses conséquences pour les plantes étudiées. La luzerne, par exemple, peut présenter des retards de croissance (qui peuvent impacter le rendement), mais les conséquences peuvent également se trouver au niveau des taux de protéines. Il semble que les impacts d'un déficit hydrique chez la luzerne vont dépendre du stade de croissance durant lequel ce déficit est subi par la plante [43]. En ce qui concerne le dactyle, une importante baisse de production risque d'être observée. Le taux de protéines peut aussi être affecté [44].

### 5.3. RENDEMENT

Durant la saison culturale 2017, les parcelles ont toutes été fauchées quatre fois à l'aide d'une récolteuse à herbe (Haldrup F-55, de marque Inotec). Afin d'obtenir la matière sèche, un échantillon de 300g de matière fraîche a été séché durant 48h à 70°. Ces manipulations ont été réalisées par l'équipe du projet ForDrought. Les fauches ont eu lieu avant, durant, et après la mise en place du stress hydrique. Les Figures 17 et 18 représentent les rendements obtenus (en kg de matière sèche par hectare) lors de ces coupes pour les différentes espèces.

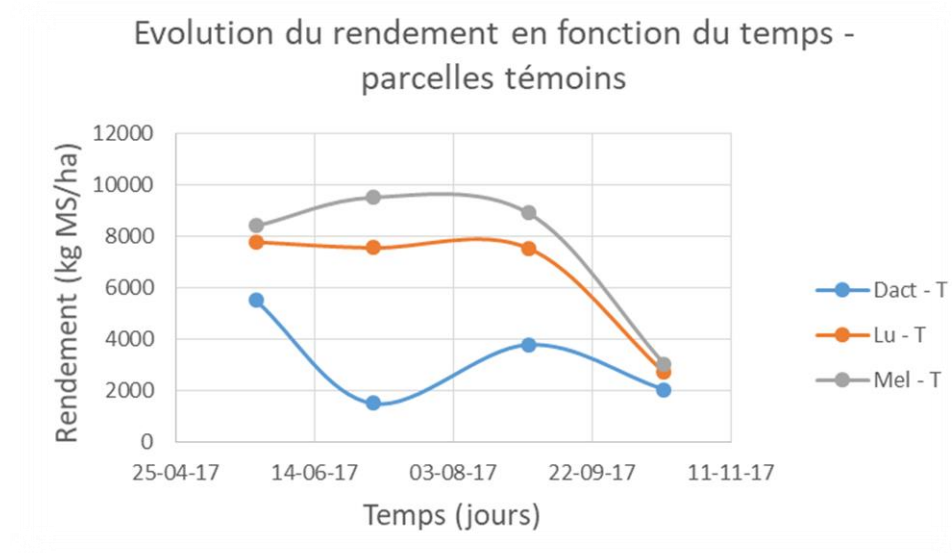


Figure 19: Evolution du rendement des parcelles témoins

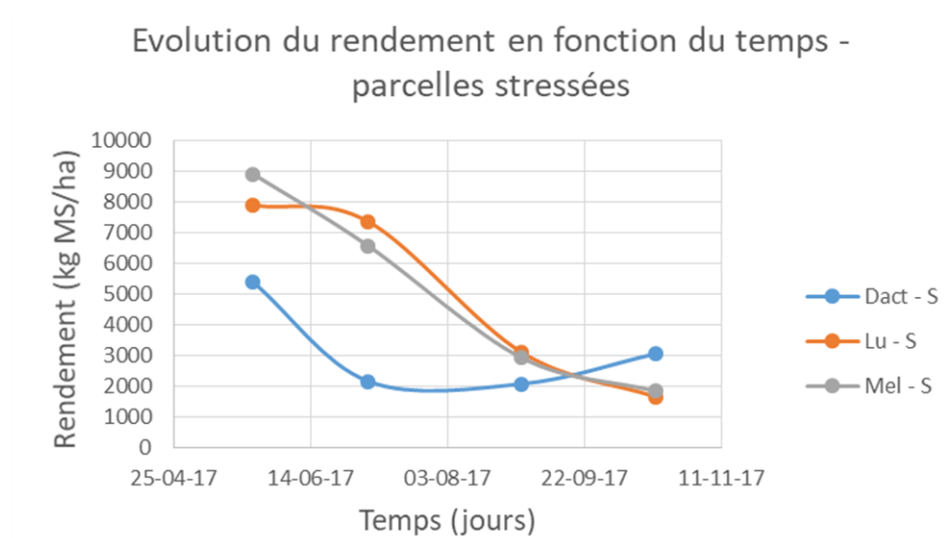


Figure 20: Evolution du rendement des parcelles stressées

En observant et comparant ces résultats, on constate plusieurs comportements. En premier lieu, on voit que les rendements lors de la première coupe, le 25 mai 2017, sont similaires pour les deux traitements, avec environ 5500kg MS/ha pour le dactyle et un peu moins de 8000kg MS/ha pour la luzerne. Le mélange est légèrement plus productif dans la parcelle stressée que dans la parcelle témoin, mais globalement, les valeurs sont similaires et indiquent qu'il n'y a pas de

contrainte préalable à l'établissement du stress hydrique sur une parcelle en particulier. En ce qui concerne les traitements (stressé et témoin), on observe dans les parcelles stressées une chute importante du rendement lors de la troisième fauche, qui a lieu vers la fin du stress hydrique, alors que ceci n'est pas observé pour les parcelles témoins. Il semble donc logique de penser que le stress hydrique a fortement affecté le rendement des différentes espèces.

On remarque également un comportement singulier de la part du dactyle dans le traitement « témoin ». Il marque une importante diminution du rendement lors de la seconde coupe avant de récupérer du rendement lors de la troisième coupe, alors que les deux autres espèces restent remarquablement stables jusqu'à la dernière coupe. Ce comportement se retrouve également dans le dactyle stressé, qui subit une perte de rendement similaire lors de la seconde coupe, alors que le stress hydrique n'a pas encore été mis en place. Pour expliquer cette baisse de rendement, une première hypothèse est celle de conditions climatiques défavorables spécifiquement au dactyle. Un autre facteur envisageable serait une contrainte étrangère, telle la présence d'une maladie ou d'un ravageur ; cependant, aucune contrainte de ce type n'a été décelée durant l'été 2017.

Ces échantillons n'ayant pas été répétés, il est impossible de réaliser des analyses statistiques au sujet de certains des paramètres qui pourraient être à l'origine de ces différences. On peut néanmoins apporter quelques éléments de réflexion : En effet il est possible de comparer statistiquement l'ensemble des rendements des parcelles témoins avec ceux des parcelles stressées et donc étudier l'effet du traitement, de même que l'effet de l'association en comparant les espèces entre elles indépendamment de leurs traitements.

---

### 5.3.1. EFFET TRAITEMENT

---

Ayant soumis la moitié des parcelles à un stress hydrique entre les seconde et troisième coupes, il est attendu d'observer une différence des rendements entre les parcelles stressées et les parcelles témoins pour cette période, les rendements des parcelles stressées étant prévus plus faibles. Ceci se constate clairement : en effet, lorsqu'on compare les figures 17 et 18, on voit que les parcelles stressées de luzerne et de mélange présentent un rendement qui décroît fortement entre la seconde et la troisième coupe. Cela tend à montrer que le déficit hydrique auquel sont soumises ces parcelles résulte en une diminution de rendement, car les parcelles témoins ont un rendement bien stable. En ce qui concerne le dactyle, cette décroissance se retrouve entre la première et la seconde coupe. Cependant, durant les analyses statistiques, il n'a pas été possible de démontrer une différence significative entre l'ensemble des traitements stressés et témoins (p-valeur de 0.27). Cela est probablement dû au fait que, sur les quatre coupes effectuées, seule la 3<sup>e</sup> coupe semble fort affectée par le stress hydrique et présente des valeurs différentes entre les stressés et témoins. Malheureusement, il n'est pas possible de réaliser des analyses statistiques sur cette coupe seule à cause du faible nombre de mesures. D'autres études (portant sur le maïs) [40] indiquent que la productivité diminue bien lorsque le stress hydrique est imposé. Cette étude indique également que l'efficacité de l'utilisation de l'eau diminue lorsque le stress hydrique devient plus important. Il serait donc intéressant de mettre en place un système où des stress d'intensités différents sont appliqués à des parcelles, pour étudier les réponses des plantes dans des cas plus variés.

---

### 5.3.2. EFFET ASSOCIATION

---

Une des hypothèses de départ de ce travail est qu'une association de cultures pourrait avoir une productivité plus importante que les espèces seules. Pour vérifier cette hypothèse, on peut comparer les rendements des différentes espèces à l'intérieur des traitements.

#### a) Parcelles témoin :

Dans les parcelles témoin, on constate que le rendement de la parcelle de mélange est systématiquement supérieur à ceux des parcelles de luzerne et de dactyle. On voit également que son évolution est fort semblable à celui de la luzerne. Cependant, lorsque, par analyse statistique de type ANOVA 1, on compare les moyennes des différentes espèces (le mélange étant considéré comme une troisième espèce dans les statistiques), il n'apparaît pas de différence significative entre les espèces pures et l'association. Ceci peut à nouveau être dû au faible nombre de mesures et au fait que les rendements des première et dernière coupes sont similaires. On peut donc constater sur les graphes, que, dans ce cas, l'intérêt de l'association dactyle-luzerne est bien présent, car le rendement est supérieur, mais on ne peut pas le prouver statistiquement.

#### b) Parcelles stressées :

Dans les parcelles stressées, l'intérêt de l'association est nettement moins évident. En effet, on voit à nouveau que l'évolution du rendement du mélange est similaire à celui de la luzerne pure. Cependant, il n'y a pas de rendement supérieur dans le cas de l'association. Les analyses statistiques ne démontrent aucune différence significative entre les rendements des différentes espèces. Il semble donc que, lorsque les plantes sont soumises à un déficit hydrique, il n'y a pas d'avantage sur la biomasse à avoir un mélange d'espèces.

---

### 5.3.3. EFFET DATE

---

Un troisième paramètre qui peut être utilisé pour expliquer l'évolution du rendement est « l'effet date ». Cet effet est la part de la variabilité qui peut être expliquée par le moment auquel la coupe est effectuée et « l'état » de la plante. En effet, certaines plantes vont produire plus à certaines périodes durant leur cycle de développement. Le dactyle, par exemple, possède un système racinaire qui va produire de nouvelles racines de tallage vers la fin de l'été [8]. Dès lors, il se peut que, après avoir souffert du déficit hydrique durant l'été et perdu ainsi une part du rendement, il récupère en quelque sorte ce rendement grâce à ses nouvelles racines. Ceci pourrait expliquer pourquoi le dactyle semble produire plus lors de la dernière coupe dans les parcelles stressées, bien qu'une reprise de formation de racines n'ait pas été observée dans les comptages racinaires.

---

### 5.3.4. AMÉLIORATIONS POSSIBLES

---

Bien évidemment, des améliorations peuvent être apportées pour une meilleure étude du rendement. Le paramètre le plus important à modifier est le nombre de mesures. En réalisant cette étude sur plusieurs années, ou en ayant plusieurs répétitions, on peut s'attendre à avoir des données plus robustes et on pourra procéder à une meilleure analyse statistique. Il est également possible d'imposer des déficits à différents moments durant le cycle des plantes afin de voir comment elles y réagissent.

#### 5.4. COMPTAGES RACINAIRES

Les comptages racinaires ont été réalisés durant les mois de septembre et octobre 2017. Les résultats de ces comptages sont présentés dans les Figures 19 à 24. Les schémas sont une vue de face du profil, avec le haut du schéma se trouvant au niveau du sol et le bas atteignant une profondeur de 150cm. La largeur représentée est également de 150cm et les pixels représentent des carrés de 2.5cm de côté. La couleur du pixel varie avec le nombre de racines présentes dans le carré. Lorsque le nombre de racines dépasse 12, la distinction n'est plus faite et la couleur ne varie plus. Cette échelle de couleur est identique pour les six schémas. Afin de donner une échelle de taille, des lignes noires sont placées aux profondeurs de 50 et 100cm.

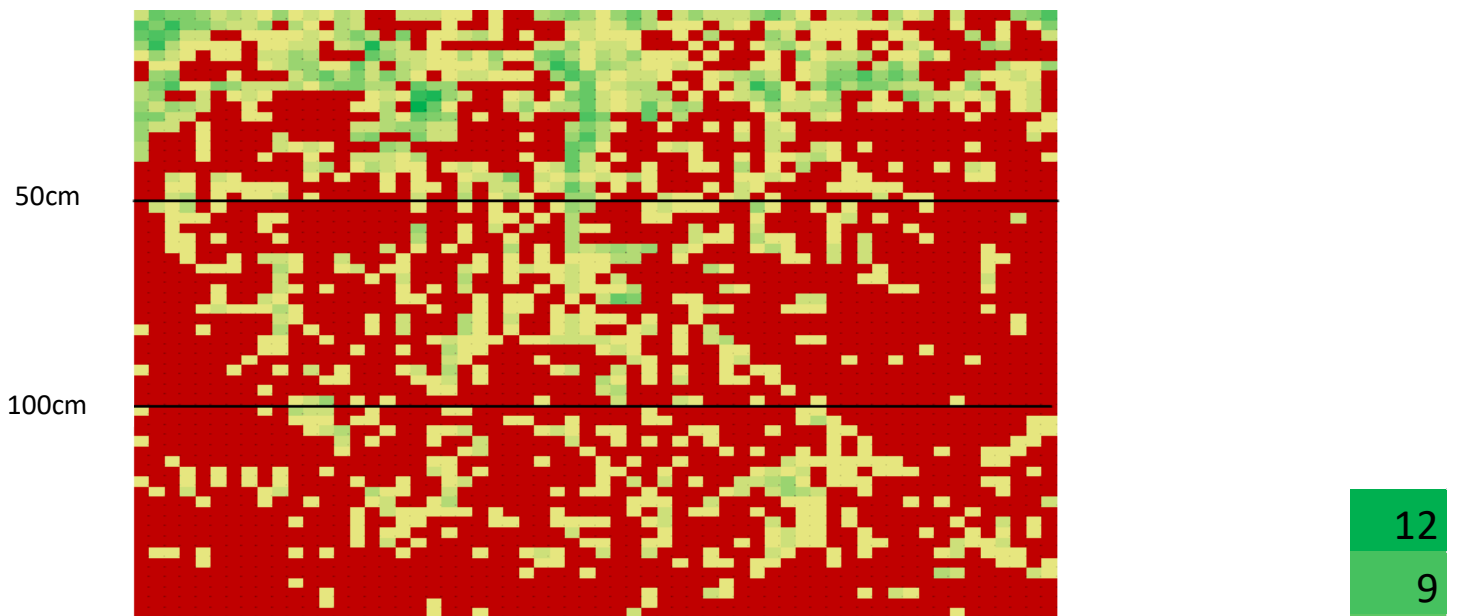


Figure 21: Représentation de la distribution racinaire sur le profil de la parcelle de luzerne témoin

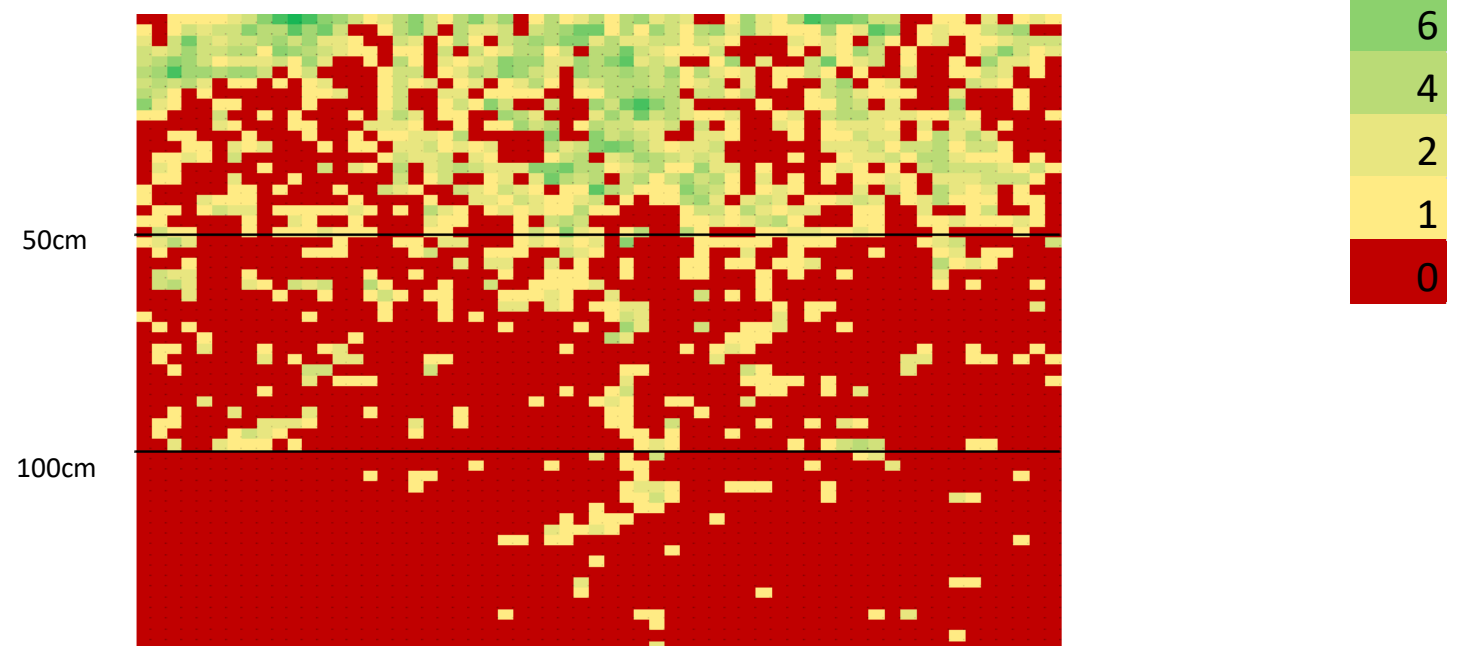


Figure 22: Représentation de la distribution racinaire sur le profil de la parcelle de luzerne stressée

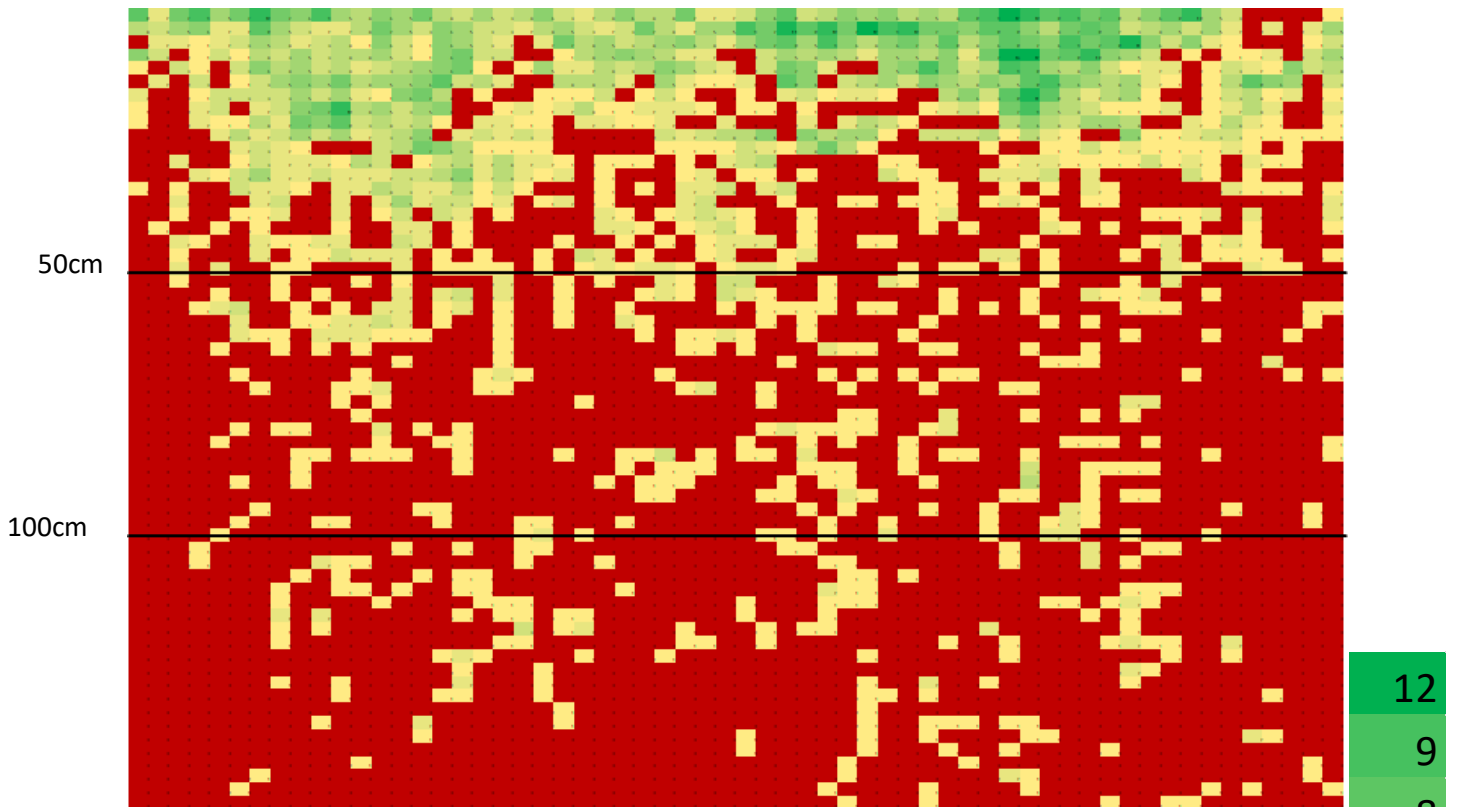


Figure 23: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de dactyle témoin

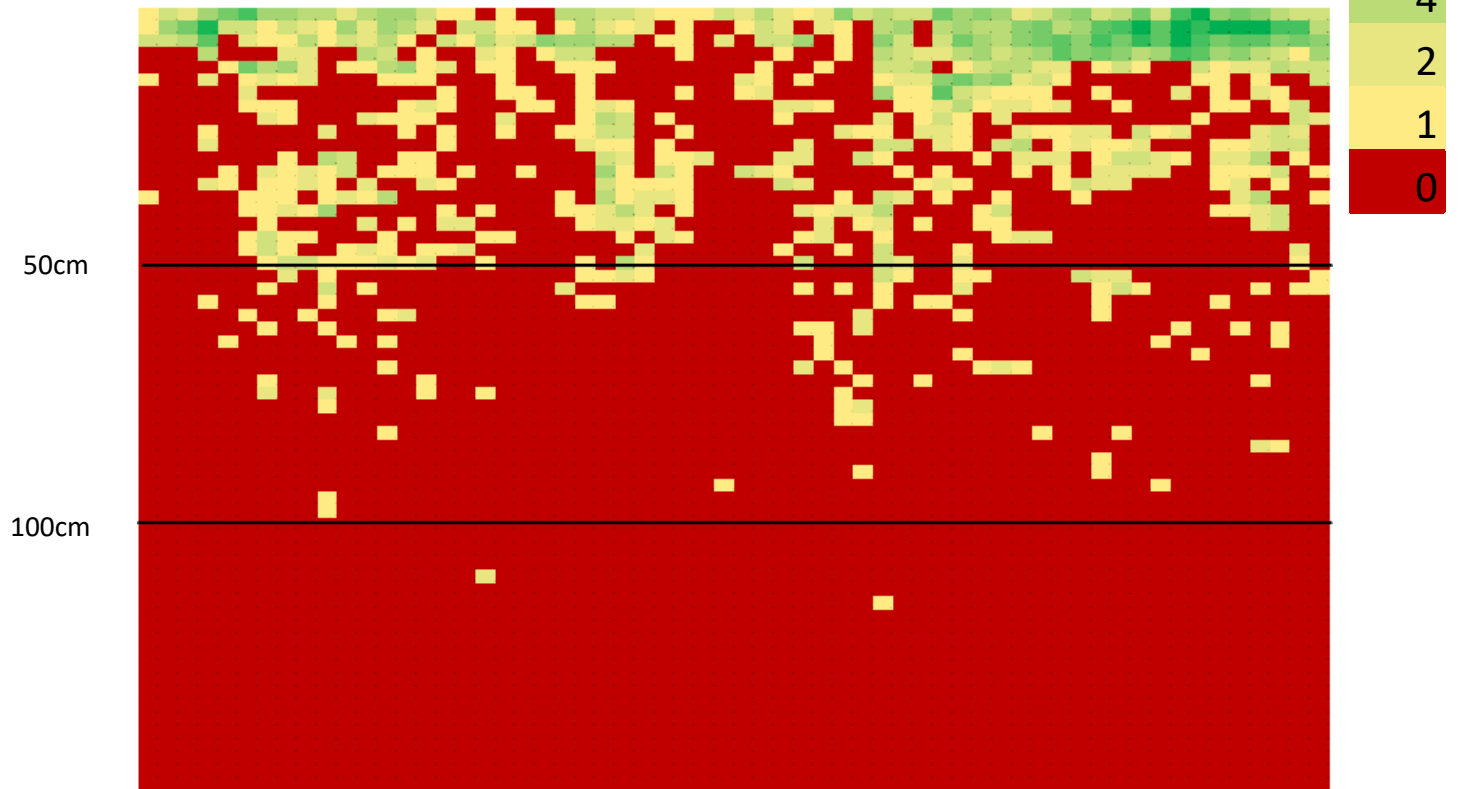


Figure 24: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de dactyle stressé

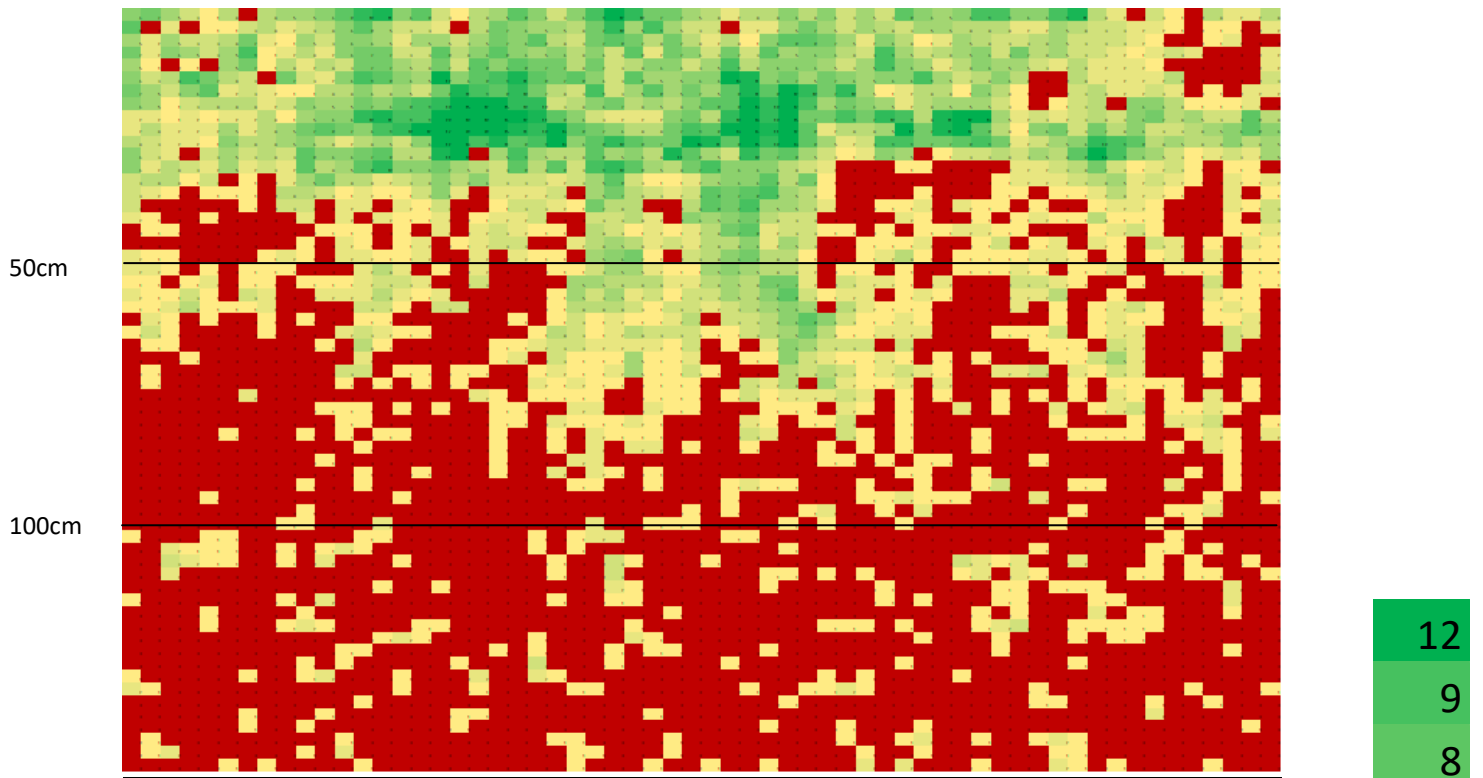


Figure 25: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de mélange témoin

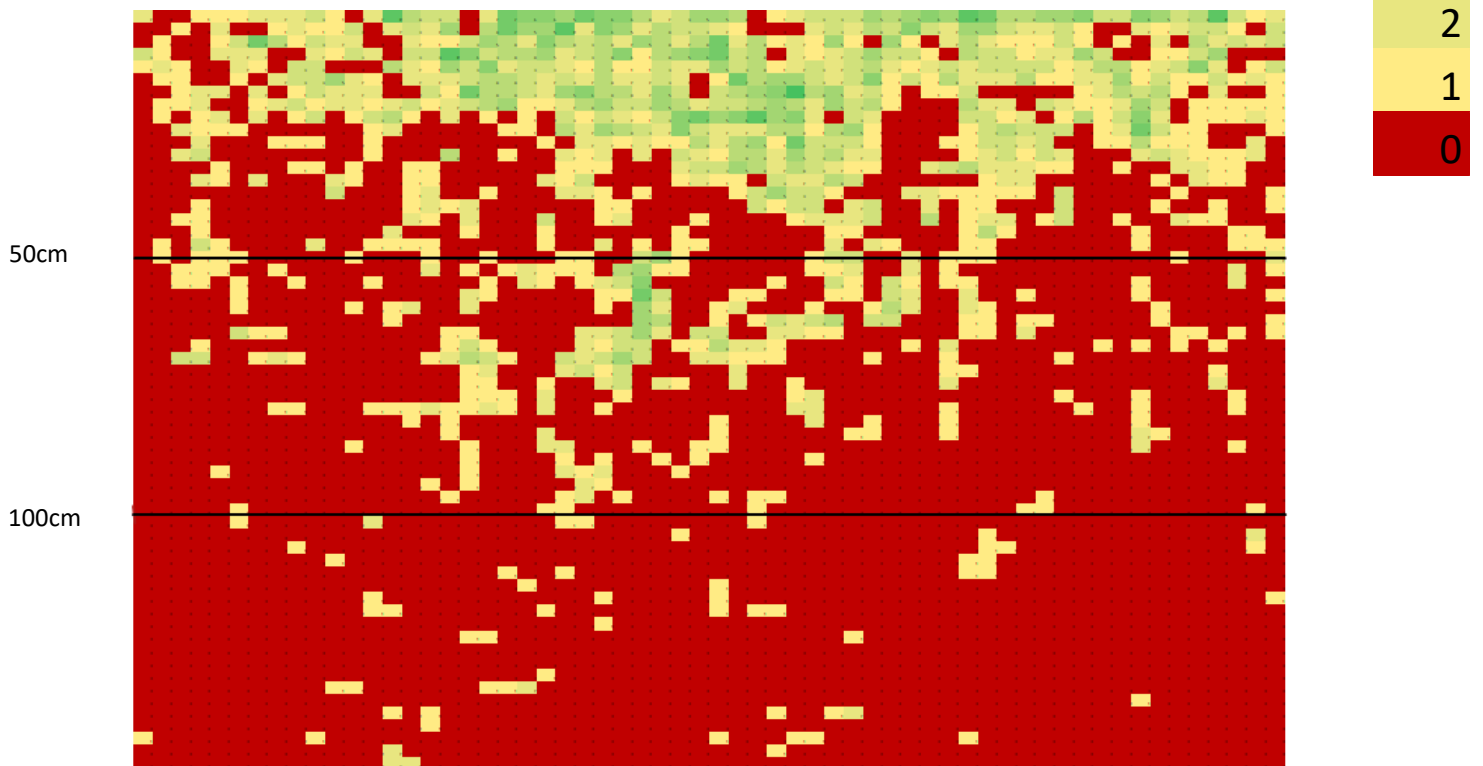


Figure 26: Représentation de la densité racinaire sur le profil de la parcelle de mélange stressé

En comparant qualitativement ces figures, on distingue des différences en fonction de la profondeur, du traitement (stressé ou témoin) et de l'association ou non d'espèces (appelée également mélange). On voit par exemple clairement l'effet du traitement dans la distribution des racines du dactyle : le dactyle stressé a nettement moins de racines que le dactyle témoin lorsque la profondeur augmente. Cette constatation peut être également faite pour la luzerne et pour le mélange. On voit par ailleurs, que, logiquement, le nombre de racines diminue lorsque la profondeur augmente, et ceci dans tous les cas. L'effet de l'association est plus ardu à observer, bien que l'on constate un plus grand nombre de racines dans les horizons de surface de la parcelle de mélange témoin par rapport aux autres parcelles témoins.

Afin de pouvoir observer ces valeurs de façon plus précise, la Figure 25 a été construite. Le nombre de racines présentes pour chaque parcelle a été sommé par profondeur de 2.5cm (donc par « ligne » sur les Fig. 19 à 24). Puis, ces valeurs ont été sommées en horizons de 15cm de profondeur. Afin de mieux visualiser les comportements aux profondeurs plus importantes, un agrandissement de la partie basse du graphique a été réalisé et ajouté sur la figure.

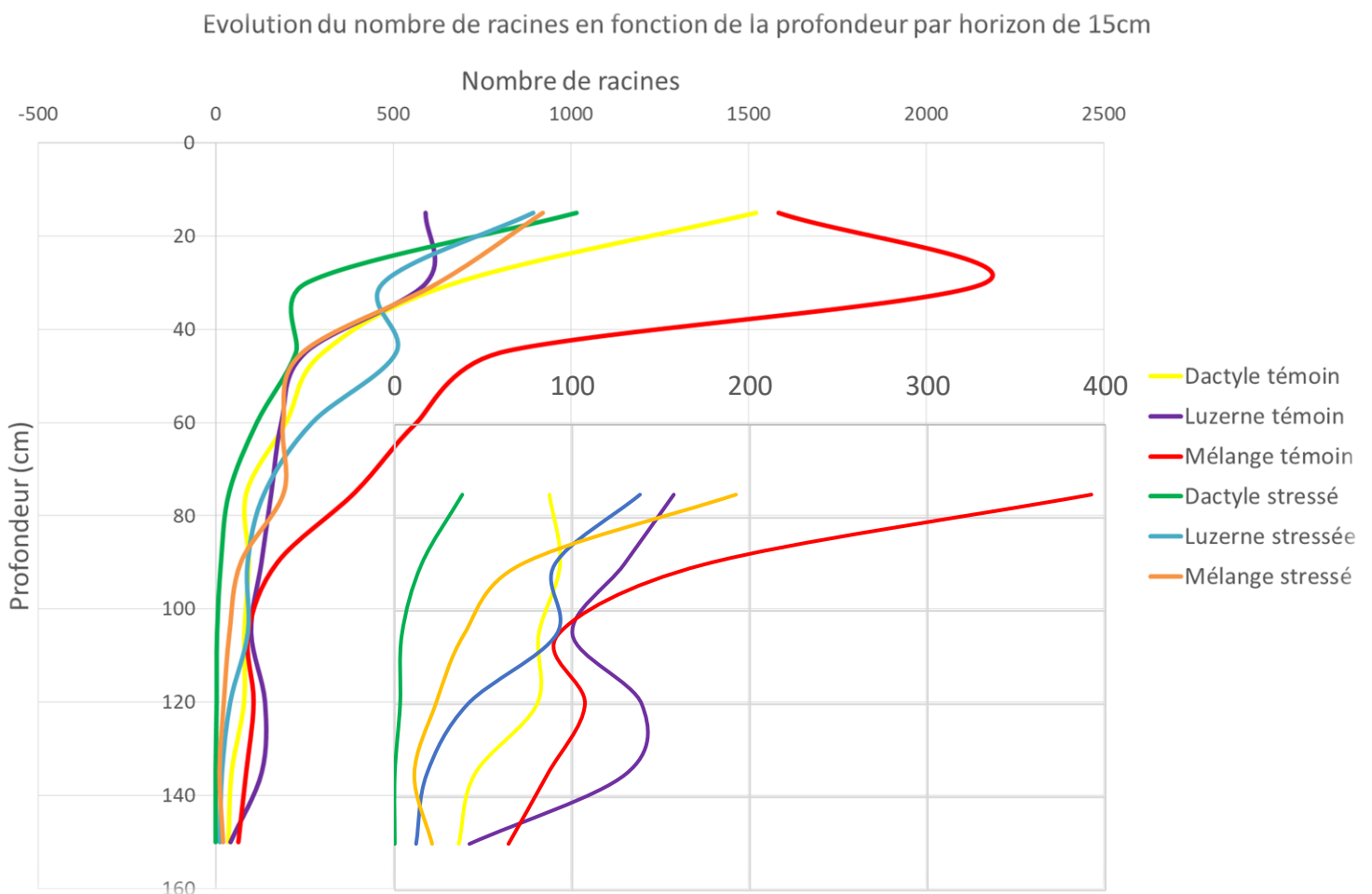


Figure 27: Evolution du nombre de racines en fonction de la profondeur par horizon de 15cm. Le graphique en écart en bas à droite est un agrandissement horizontal des horizons sous 75cm de profondeur.

La Figure 25 représente donc les mêmes valeurs que celles présentées sur les Figures 19 à 24, mais aide à constater l'ampleur des différences entre les parcelles.

On constate à nouveau que la parcelle de mélange témoin présente un nombre de racines nettement supérieur aux autres parcelles jusqu'à une profondeur de 100cm, et ce nombre reste plus élevé que celui du dactyle témoin sur l'ensemble du profil. L'effet de l'association dans des conditions de stress est moins prononcé : à plusieurs reprises, sur le profil, le nombre de racines de luzernes dépasse celui du mélange. En ce qui concerne l'effet du traitement, on constate que la luzerne en conditions de stress produit plus de racines qu'en conditions normales, ce qui est l'inverse de ce que l'on observe chez le dactyle et le mélange. Cependant, ceci n'est le cas que pour les profondeurs supérieures à 75cm. Dans les autres cas, les parcelles témoins présentent plus de racines que les parcelles stressées.

Durant l'analyse statistique, l'effet de trois facteurs va être analysé, à savoir le traitement (stressé ou témoin), l'espèce (luzerne, dactyle ou mélange) et la profondeur. Pour ce dernier facteur, il a été fait usage d'horizons délimités tous les 15cm jusqu'à la profondeur de 150cm, soit 10 horizons.

En ce qui concerne les profondeurs, on peut également les comparer pour un même profil ou évaluer les différences entre profils. Dans l'analyse du facteur espèce, les différences entre les espèces pures et l'association seront comparées.

#### 5.4.1. EFFET DES TRAITEMENTS SUR LA DISTRIBUTION RACINAIRE

Le premier effet étudié est celui du traitement : des nombres de racines différents sont attendus en fonction que la plante ait subi un déficit hydrique ou non. Le tableau 4 présente les moyennes et écarts-types des comptages pour les différents traitements et espèces.

Tableau 4: Moyennes et écarts-types des comptages racinaires pour les différents traitements et espèces

Traitement	$\mu$ [-]	$\sigma$ [-]
Stressé	0.61	1.34
Témoin	1.06	2.00
Espèce		
Luzerne	0.67	1.27
Dactyle	0.67	1.56
Mélange	1.16	2.15

On y constate que les parcelles témoins ont des profils avec, en moyenne, plus de racines que les parcelles stressées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, lorsque la plante est soumise à un déficit hydrique, elle dispose de moins de ressources et peut donc moins facilement produire des racines. Il se peut également qu'elle décide de laisser mourir des racines afin de récupérer certains éléments ou ne plus devoir approvisionner ces racines. Comme les comptages ont eu lieu après la fin du stress et ont duré plusieurs semaines, une partie de ces racines avait peut-être déjà été décomposée. De plus, le sol sec est beaucoup plus compact et moins propice à la croissance racinaire. Par ailleurs, la formation de nouvelles racines se faisant sur les nouveaux entre-noeuds des tiges, et la formation de ceux-ci étant à l'arrêt durant le stress, la formation

des nouvelles racines peut l'être également. Ceci n'est pas le cas pour la formation de racines latérales, mais la formation de celles-ci nécessite une croissance des racines-mères, qui peut être également à l'arrêt durant le stress.

On voit également que, tous traitements confondus, les parcelles de mélange ont une moyenne nettement supérieure à celle des espèces seules, mais que leur variance est importante. Les moyennes de la luzerne et du dactyle sont identiques, mais la variance du dactyle est supérieure à celle de la luzerne.

Afin d'étudier l'effet du traitement de façon plus détaillée, il est nécessaire d'analyser les espèces séparément. Le tableau 5 présente les résultats d'analyses à ce sujet.

Tableau 5: Résultats des analyses ANOVA 1 : moyennes et écarts-types des comptages racinaires en fonction du facteur "traitement" pour les différentes espèces étudiées.

Espèce	Traitement	$\mu$ [-]	$\sigma$ [-]	p-valeur
Luzerne	Stressée	0.70	+/- 1.34	0.0434
	Témoin	0.64	+/- 1.20	
Dactyle	Stressé	0.47	+/- 1.37	<2*10 <sup>-16</sup>
	Témoin	0.87	+/- 1.71	
Mélange	Stressé	0.65	+/- 1.29	2.2*10 <sup>-16</sup>
	Témoin	1.68	+/- 2.66	

Dans le tableau 5, des analyses ANOVA 1 sont utilisées pour tester l'hypothèse que les moyennes entre les traitements sont égales. Seule l'influence du traitement est considérée ici, la profondeur n'est donc pas prise en compte.

Dans le cas de la luzerne, l'analyse statistique démontre que la différence entre les deux moyennes est significative et qu'il y a donc effectivement un effet du traitement sur le nombre de racines observées. En effet, la p-valeur du modèle est de 0.04 alors qu'elle est considérée comme significative lorsqu'elle est inférieure à 0.05. Il semble donc que la production et la croissance des racines de la luzerne sont affectées par le stress hydrique d'une manière qui se reflète sur les profils de densité en fin de traitement. Ce comportement pourrait s'expliquer par le raisonnement suivant : la plante, constatant une carence en eau, investit plus de ses ressources dans la recherche de cette eau et donc produit plus de racines ou allonge davantage celles qu'elle possède. Il est néanmoins à noter que la différence entre les moyennes est, certes, significative, mais nettement plus faible que dans le cas du dactyle ou du mélange. En ce qui concerne le dactyle, on constate que les traitements produisent à nouveau un résultat significativement différent, avec une p-valeur extrêmement faible. Le dactyle produit nettement moins de racines lorsqu'il se trouve dans une situation de stress hydrique. Finalement, pour les mélanges, la différence est bien présente, encore une fois, et la p-valeur est du même ordre de grandeur que celle du dactyle. Dans les trois cas, on constate donc que les traitements ont un impact significatif sur le nombre de racines présentes dans le profil. Cependant, on voit que ces réactions sont différentes selon les espèces, même si le mélange d'espèces se comporte de façon similaire au dactyle, alors qu'en matière de rendement, le mélange se comportait comme la luzerne (voir 5.2.).

#### 5.4.2. EFFET DE L'ASSOCIATION SUR LA DISTRIBUTION RACINAIRE

Le paramètre suivant qu'il convient de tester, est l'impact de l'association sur la densité de racines, en comparaison avec les deux espèces seules. Pour estimer cet effet, d'autres tests ANOVA ont été effectués. L'hypothèse testée est toujours que les moyennes des différents groupes (ici les 3 « espèces » : dactyle – luzerne – mélange) sont égales. Des comparaisons multiples de moyennes ont été effectuées (tests de Tukey). Les résultats de ces comparaisons sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6: Résultats des analyses ANOVA 1 : moyennes et écarts-types des comptages racinaires en fonction du facteur "espèce" pour les différentes espèces étudiées.

Traitement	Comparaison	p-valeur	Groupes
Stressé	Luzerne - Mélange	0.19	b – b
	Dactyle – Mélange	<0.0001	a – b
	Luzerne - Dactyle	<0.0001	a - b
Témoin	Luzerne - Mélange	<0.00001	a – c
	Dactyle - Mélange	<0.00001	b – c
	Luzerne - Dactyle	<0.00001	a - b

De ces analyses, il ressort que, dans le cas des parcelles stressées, il n'y a pas de différence significative entre les parcelles de luzerne et de mélange. En revanche, la différence est bien présente entre le dactyle et la parcelle en association. Ces différences sont très significatives.

En ce qui concerne les parcelles témoins, on constate qu'il y a une différence significative entre les deux parcelles contenant une espèce seule et la parcelle contenant l'association de cultures. La différence se retrouve également entre les parcelles de luzerne pure et de dactyle pur, qui forment des groupes bien distincts.

### 5.4.3. EFFET DE LA PROFONDEUR SUR LA DISTRIBUTION RACINAIRE.

Le troisième effet à observer est celui de la profondeur. Instinctivement, on s'attend à observer une diminution du nombre de racines lorsque la profondeur augmente, mais il est instructif de regarder l'importance de cette diminution par horizon et de comparer cette diminution entre les espèces et les traitements. En observant l'évolution du nombre de racines, il est également possible d'estimer l'effet de la semelle de labour, décrite plus haut. L'hypothèse est que, si la structure du sol est compacte à une certaine profondeur, on puisse retrouver les répercussions dans le nombre de racines.

Afin de représenter l'évolution du nombre de racines en fonction de la profondeur et par espèce, deux graphes ont été réalisés (Figures 26 et 27). Des analyses statistiques (ANOVA 1 et 2) ont été menées pour comparer les effets des associations par traitement et pour les différentes profondeurs. Les résultats de ces analyses sont présentés dans les tableaux 7 et 8. Suite à ces analyses, les nombres de racines des Figures 26 et 27 ont pu être classés par groupes, représentés par les lettres présentes dans les Figures. Un troisième graphe (Figure 28) met en lumière la différence qu'il y a entre le nombre de racines dans les parcelles stressées et témoins par espèce et par horizon. Une analyse ANOVA 1 a été réalisée sur ces données, permettant de classer les nombres de racines par groupes (représentés à nouveau par des lettres) pour chaque horizon.

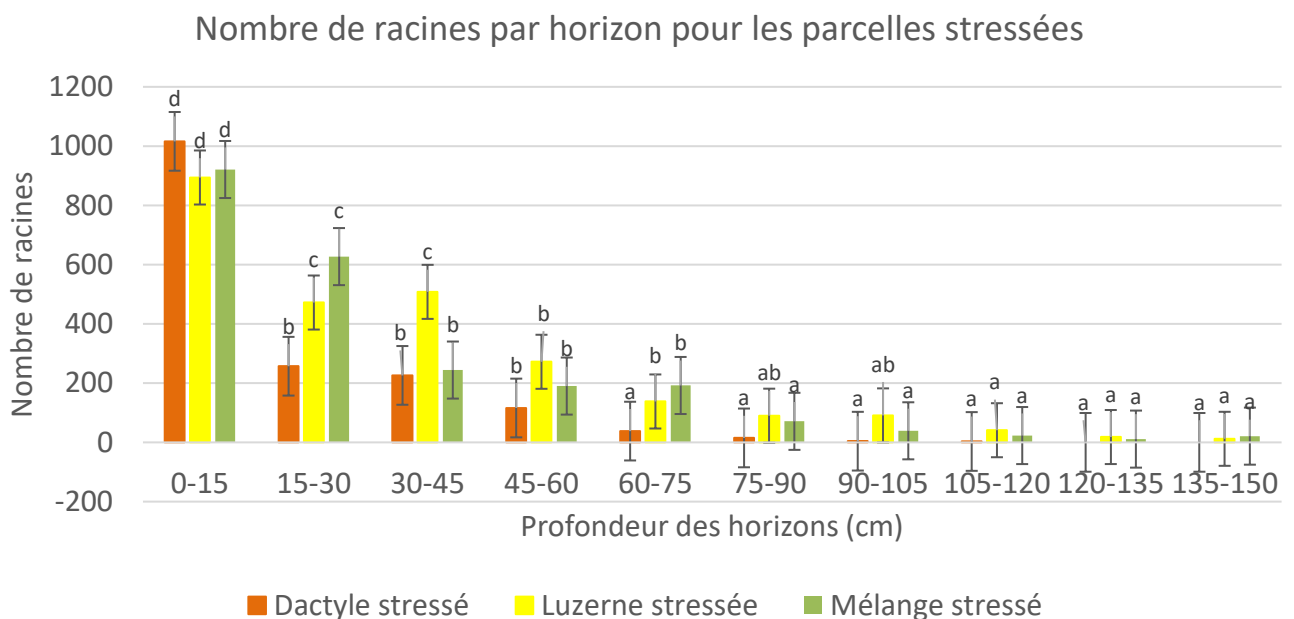


Figure 28: Nombre de racines par horizon pour les parcelles stressées et comparaison statistique par espèce

Sur cette figure, on peut voir que le nombre de racines par horizon diminue selon une allure exponentielle, ce qui a également été constaté par d'autres travaux [41]. Comme la semelle de labour est présente dans toutes les parcelles, il n'est pas possible d'en détecter l'effet. On voit également que, sous une certaine profondeur, le nombre de racines ne diminue plus significativement. Chez le dactyle et le mélange, cette profondeur est moindre que chez la luzerne.

Ceci mis à part, on voit que le nombre de racines des plantes en association n'est pas plus élevé

que celui des plantes en culture pure, autrement dit, il ne semble pas y avoir d'effet dû à l'association.

L'ANOVA 1, identique pour les parcelles stressées et témoin permet de comparer les différents horizons, par espèce et d'afficher les lettres correspondant aux groupes, par espèce. L'ANOVA 2 permet d'inclure un deuxième facteur dans la comparaison et de déterminer simultanément l'effet de la profondeur, de l'espèce et de leur interaction. Les résultats de ces ANOVA 2 sont présentés dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7: Résultats de l'ANOVA 2 sur les parcelles stressées.

Facteur	Degrés de liberté	F-value	p-valeur
Espèce	2	49.401	$<2.2 \cdot 10^{-16}$
Profondeur	9	633.348	$<2.2 \cdot 10^{-16}$
Interaction	18	16.019	$<2.2 \cdot 10^{-16}$

Le tableau 7 montre que pour les parcelles stressées, les 2 facteurs considérés ainsi que leur interaction ont bien une importance significative car la p-valeur est très faible.

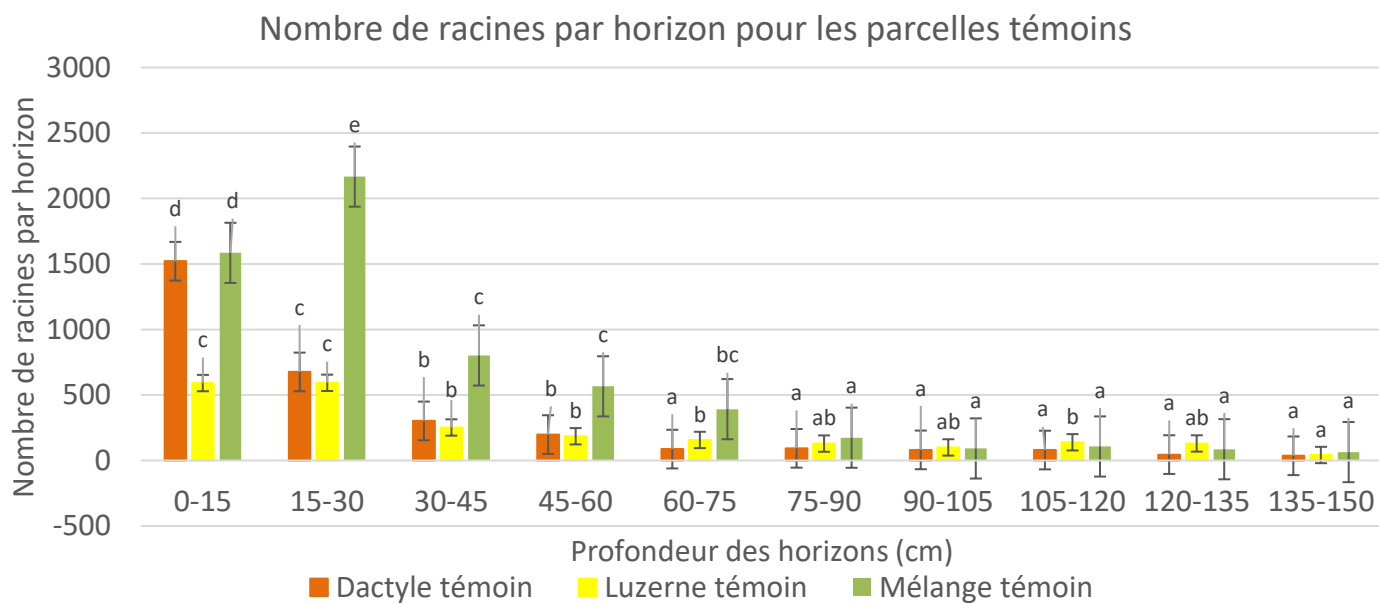


Figure 29: Nombre de racines par horizon pour les parcelles témoin et comparaison statistique par espèce

En ce qui concerne la figure 27, on voit que, pour le dactyle, le nombre de racines suit bien une courbe exponentielle décroissante, mais ceci n'est pas le cas pour les autres espèces. La luzerne semble évoluer par plateaux, avec peu de différence entre les deux premiers horizons ainsi qu'entre les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> horizons. Le mélange témoin montre une augmentation du nombre de racines dans le second horizon, ce qui pourrait correspondre aux profondeurs immédiatement après la semelle de labour. Dans les parcelles témoins, contrairement aux parcelles stressées, il semble qu'il y a bien un effet de l'association sur le nombre de racines.

Tableau 8: Résultats de l'ANOVA 2 sur les parcelles témoins.

Facteur	Degrés de liberté	F-value	p-valeur
Espèce	2	529.87	$<2.2*10^{-16}$
Profondeur	9	814.52	$<2.2*10^{-16}$
Interaction	18	135.52	$<2.2*10^{-16}$

Le tableau 8 montre que, comme pour les parcelles stressées, les facteurs espèce et profondeur ont une influence significative sur le nombre de racines, ainsi que le facteur dû à leur interaction.

Les deux graphes 26 et 27 montrent que, comme attendu, les quantités de racines dans le sol diminuent avec la profondeur. En comparant les groupes entre eux, on voit que, pour les parcelles stressées, le nombre de racines n'est plus significativement différent entre horizons à partir d'une profondeur de 105cm, et ce, pour les trois espèces. Dans les cas du mélange et du dactyle, on voit même qu'il n'y a plus de différence à partir de 75cm de profondeur.

Les résultats sont sensiblement les mêmes pour les parcelles témoins (figure 27) : le nombre de racines de dactyle n'évolue plus de façon significative sous 60cm de profondeur. Pour les mélanges, ce « plateau » est atteint à 75cm de profondeur, alors que le nombre de racines de luzerne continue de varier significativement jusqu'en bas du profil, à 150cm.

La figure 28 représente la différence par horizons entre le nombre de racines dans les parcelles témoins et stressées. Ces nombres sont classés par espèce et comparés par profondeur grâce à une analyse ANOVA1 (les lettres au-dessus de chaque nombre de racines indiquent donc les groupes par horizon et pas pour l'ensemble du profil). On voit que la luzerne est la seule espèce pour laquelle on dénombre plus de racines dans les parcelles stressées. Ceci tendrait à confirmer l'hypothèse citée plus haut, disant que la luzerne investit plus de ses ressources dans son système racinaire en cas de manque d'eau. On voit également que les différences entre les nombres de racines sont bien plus faibles chez la luzerne que chez le dactyle et le mélange, et que ces différences se réduisent lorsque la profondeur augmente.

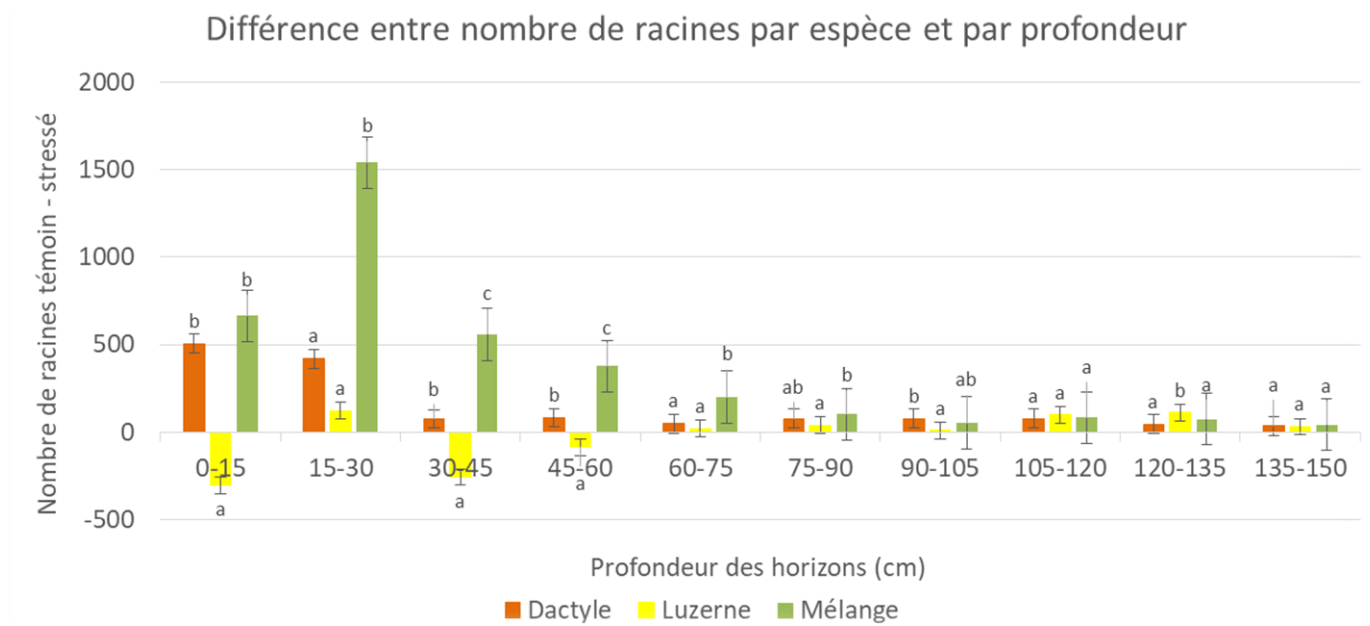


Figure 30: Différence entre nombre de racines par espèce et par horizons

#### 5.4.4. DISCUSSION

Une analyse ANOVA 3 a été effectuée sur les 3 facteurs étudiés et leurs interactions. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9: Résultats de l'ANOVA 3 à propos de l'influence des trois facteurs et leurs interactions sur le nombre de racines dans le profil de sol.

Facteur	Degrés de liberté	F-value	p-valeur
Espèce (1)	2	370.473	<2.2*10 <sup>-16</sup>
Traitement (2)	1	712.017	<2.2*10 <sup>-16</sup>
Profondeur (3)	9	1392.722	<2.2*10 <sup>-16</sup>
Interaction (1-2)	2	340.241	<2.2*10 <sup>-16</sup>
Interaction (1-3)	18	117.790	<2.2*10 <sup>-16</sup>
Interaction (2-3)	9	104.715	<2.2*10 <sup>-16</sup>
Interaction (1-2-3)	18	66.439	<2.2*10 <sup>-16</sup>

Grâce au tableau 9, on voit que, pour l'ensemble des comptages, le nombre de racines dépend des différents facteurs. En premier lieu, le stress hydrique va avoir un effet sur la quantité de racines que la plante produit ou entretient. Un système racinaire comportant un nombre de racines plus important est constaté chez le dactyle et le mélange témoin, alors que la différence est plus faible (bien que significative) chez la luzerne. L'effet de l'association est, lui aussi, bien

présent : les parcelles en associations ont un plus grand nombre de racines que les parcelles ne comprenant qu'une seule espèce, du moins chez les parcelles témoins. Pour les parcelles stressées, cet effet est moins net, mais néanmoins présent pour certains horizons. Le troisième facteur, à savoir la profondeur, a lui aussi un impact, car le nombre de racines diminue avec la profondeur, et on constate, grâce à la figure 25, que la majorité des racines se trouve dans les 45 premiers cm du sol.

Le tableau 9 permet également de constater que les interactions entre les différents paramètres sont, elles aussi, significatives.

### *Critique de la méthodologie*

Les comptages effectués en utilisant le quadrillage décrit dans le point 4.2.1. permettent une évaluation assez précise du nombre de racines. En effet, en comptant les racines dans chaque carré de 2.5cm de côté, le nombre de mesures est important. Cependant, certaines sources d'erreurs persistent.

En premier lieu, puisque la grille ne mesure qu'1m de côté, il a été nécessaire de la déplacer sur le profil, afin d'obtenir un quadrillage de 1.5m de côté. Durant ces déplacements, même si des points de repères avaient été mis en place, il est possible que certaines racines aient été comptées deux fois ou oubliées. Cet effet est bien présent même s'il est probablement de faible importance.

Une deuxième source d'erreur possible est liée à la personne qui compte : la probabilité de faire une erreur dans un carré est bien réelle lorsque les racines sont nombreuses. De plus, le profil n'étant pas parfaitement lisse, la grille se trouve parfois à plusieurs cm du profil, ce qui rend la tâche compliquée de savoir dans quel carré la racine se trouve. Cependant, tous les comptages ayant été réalisés par la même personne, l'erreur devrait être du même ordre pour les six profils. Par ailleurs, les comptages ont pris du temps et se sont déroulés durant plusieurs semaines. Il est donc important de ne pas exposer tous les profils à la lumière, dès le premier jour afin de ne pas dégrader les racines. Il est préférable de les dégager juste avant d'entamer les comptages pour chaque profil séparément. Une alternative pourrait être de travailler par images : il suffirait de prendre des photos des profils le jour où ceux-ci sont excavés et ensuite de compter les nombres de racines que l'on voit sur ces photos, ce qui permettrait d'obtenir un aperçu des profils à un instant précis. Cette méthode, certes précise, prend du temps : de ce fait, les profils pour lesquels les comptages ont été réalisés en dernier peuvent présenter une différence avec les premiers car l'impact du stress hydrique peut déjà être en train de s'estomper, du moins en surface. Il est donc important de trouver le bon équilibre entre la précision et la rapidité des comptages. Lorsqu'il y avait deux personnes pour réaliser les comptages, ceux-ci étaient nettement plus rapides. De plus, cette méthode requiert de réaliser des fosses aux dimensions importantes, avant de pouvoir commencer les mesures. Il est donc nécessaire de disposer d'un certain espace autour des parcelles. Cependant, les fosses ayant été creusées en bord de parcelles, il est possible qu'un effet de bord se soit fait sentir et que les nombres de racines observés aient été différents de ceux qui se trouveraient au milieu de la parcelle.

### *Perspectives*

Ce genre de méthode d'analyse fournit des résultats intéressants. Pour les améliorer, il serait peut-être utile de réduire quelque peu la taille des carrés, afin de pouvoir réaliser les comptages plus vite et avoir une vue « instantanée » de l'état du système racinaire.

De même, s'il est possible de dégager plusieurs horizons vers l'intérieur de la parcelle, il pourrait être intéressant de réaliser ce genre d'analyse avant, durant et après l'application d'un stress hydrique, afin d'observer l'évolution du système racinaire. Cependant, dans la pratique, cela restera toujours assez compliqué car cela nécessite de l'espace et du matériel.

Il est important de considérer qu'il peut y avoir une différence si l'on réalise cette expérience sur un jeune couvert et le même couvert implanté depuis plusieurs années. En effet, le système racinaire peut avoir une importance et une disposition différente avant le début du stress hydrique (de par l'âge du couvert), et la plante pourrait donc réagir différemment. Une hypothèse pourrait être qu'un jeune couvert aura un système racinaire moins développé, et que la plante pourrait plus rapidement se trouver en difficulté, alors que le stress serait perçu comme moins important par un couvert plus âgé.

### 5.5. DENSITÉ RACINAIRE

Après avoir effectué les comptages racinaires afin de cartographier, en quelque sorte, le sous-sol des parcelles, il était nécessaire d'avoir une idée de la densité des racines. Cette information pouvait s'obtenir en s'intéressant non plus au nombre de racines mais bien à leur longueur (évaluée par leur poids) et donc à leur densité. Ces données ont été obtenues grâce aux prélèvements de carottes horizontales et verticales. En connaissant les profondeurs auxquelles ces prélèvements sont effectués, il est possible de représenter l'évolution de la densité racinaire en fonction de la profondeur pour chaque parcelle étudiée, tant pour les prélèvements verticaux qu'horizontaux. Ces résultats sont présentés sur les Figures 29 et 30 ci-dessous.

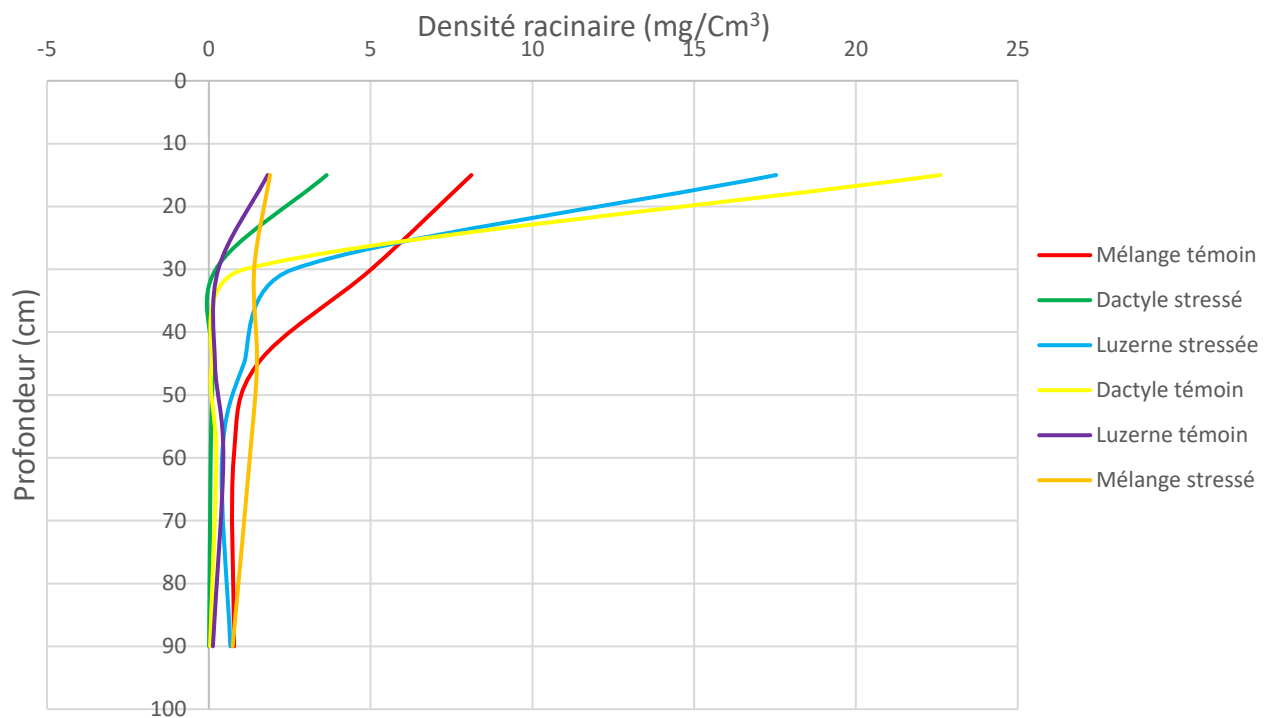


Figure 31: Evolution de la densité racinaire en fonction de la profondeur pour les échantillons verticaux

On voit sur la Figure 29 qu'il y a d'importantes différences entre les densités racinaires (obtenues par échantillonnage vertical) présentes sur les différentes parcelles. Dans le cas du dactyle et du mélange, les densités sont plus importantes lorsque la parcelle n'est pas stressée, alors que l'inverse se produit chez la luzerne. Ce phénomène était également observé dans les comptages racinaires.

On constate par ailleurs que les densités racinaires sont plus importantes lorsque les espèces ne sont pas associées, du moins dans les premiers horizons. Il est aussi intéressant d'observer comment la densité racinaire diminue avec la profondeur selon les parcelles. En effet, la densité racinaire de la parcelle de mélange stressé reste presque constante sur toute la profondeur du profil, alors que le dactyle témoin ou la luzerne stressée marquent une forte diminution dans les 30 premiers cm du profil.

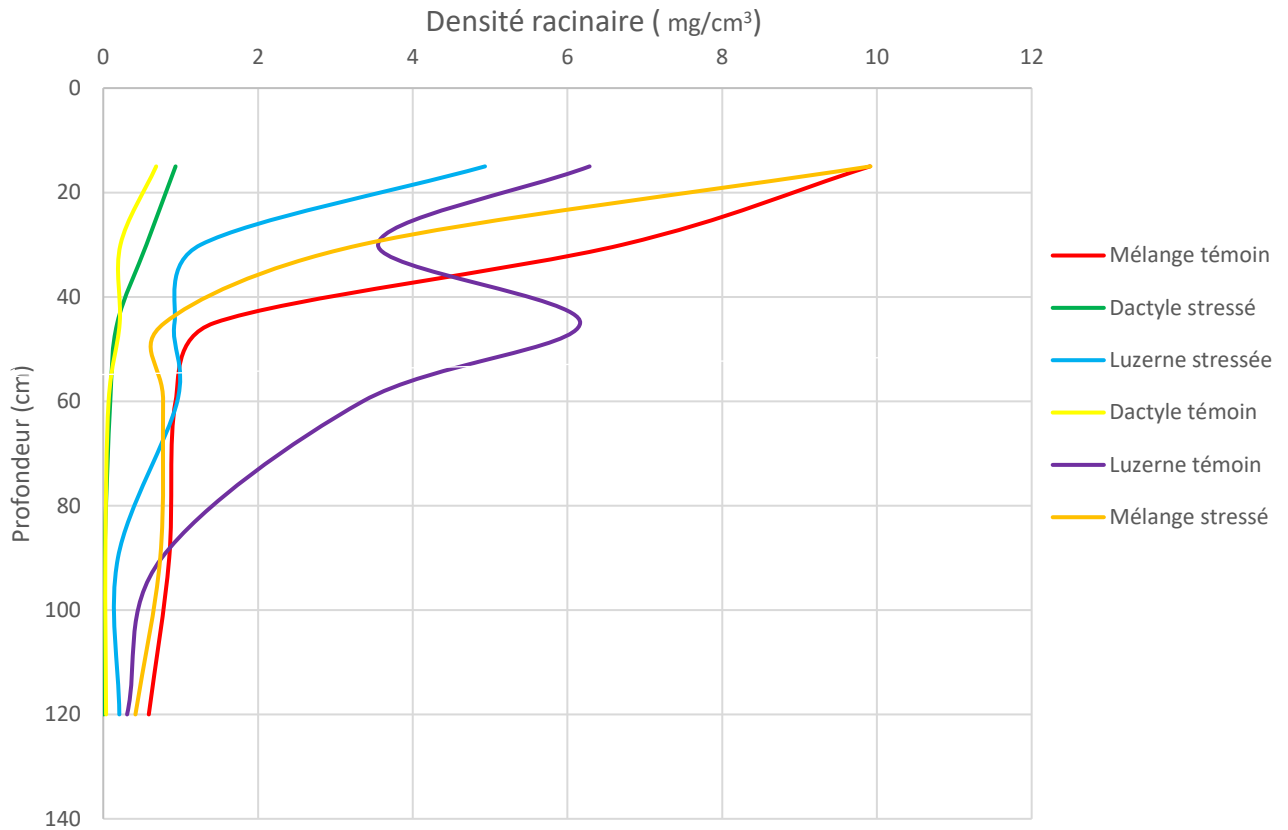


Figure 32: Evolution de la densité racinaire en fonction de la profondeur pour les échantillons horizontaux.

Sur la figure 30, qui représente les densités racinaires obtenues grâce aux échantillons horizontaux, on peut voir que les densités varient fortement, tout comme pour la figure 29. Cependant, on a l'impression que les densités sont similaires par espèces, indépendamment du traitement : les densités du dactyle sont très faibles alors que celles du mélange et de la luzerne sont plus importantes. Les courbes suivent le même genre de tendance par espèce, à l'exception de la luzerne témoin à 45 et 60cm de profondeur, qui marque une forte augmentation de densité. Dans les autres cas, les différences entre traitements semblent faibles, contrairement à ce qu'il était possible de voir sur la figure 16. Il semble que, selon le type de prélèvement utilisé, les observations varient de façon importante.

Pour pouvoir interpréter correctement ces graphes, des analyses statistiques sont à nouveau requises. Les données provenant des prélèvements verticaux et horizontaux sont analysées de manière identique.

### 5.5.1. MOYENNES ET ÉCARTS-TYPES

Le tableau 10 présente les moyennes et écarts-types des densités racinaires des différents traitements et espèces pour les deux méthodes de prélèvements. Pour les prélèvements verticaux, on voit que, toutes profondeurs confondues, la luzerne présente à nouveau un comportement inverse de celui du dactyle et du mélange : sa densité racinaire est nettement plus élevée en conditions de stress qu'en conditions normales, au contraire du dactyle et de l'association. On voit également que la variance de la luzerne stressée et du dactyle témoin sont

très élevées par rapport aux autres variances. Il est cependant important de noter que les variances sont élevées car ces moyennes reflètent les différentes profondeurs auxquelles sont pris les échantillons. Or, comme les densités ont une allure d'exponentielle décroissante sur l'ensemble du profil, des différences importantes sont attendues aux diverses profondeurs. On retrouve donc logiquement des variances importantes.

En ce qui concerne les prélèvements horizontaux, on remarque que, cette fois, la luzerne a le même comportement que le mélange, au contraire du dactyle qui a une densité racinaire plus faible en conditions témoin qu'en déficit hydrique. On peut remarquer une différence notable de résultats obtenus entre les deux méthodes de prélèvements : dans les prélèvements verticaux, la différence entre les densités racinaires moyennes en conditions stressée et témoin est nettement plus importante que celle observée dans les prélèvements horizontaux. Pour estimer si les différences vues sont significatives, des analyses statistiques sont effectuées sur les trois mêmes facteurs que pour les quadrillages racinaires, à savoir le traitement, l'espèce et la profondeur. Cependant, pour éviter de comparer les différentes profondeurs entre elles (sachant que la variabilité le long du profil est importante), l'effet du traitement et celui de l'espèce ont été analysés en utilisant des ANOVA 2, avec comme second facteur la profondeur. Ces deux facteurs sont donc observés par horizon.

Tableau 10: Moyennes et écarts-types des densités racinaires des différents traitements et espèces pour les prélèvements verticaux et horizontaux toutes profondeurs confondues.

Verticaux	Luzerne		Dactyle		Mélange	
	$\mu$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	$\sigma$ [-]	$\mu$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	$\sigma$ [-]	$\mu$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	$\sigma$ [-]
Stressé	4.45	+/-10.17	0.81	+/-1.50	1.36	+/-1.15
Témoin	0.57	+/-0.88	4.81	+/-9.64	3.24	+/-4.72
Horizontaux						
Stressé	1.40	+/-2.59	0.35	+/-0.51	2.73	+/-4.69
Témoin	3.40	+/-3.85	0.24	+/-0.33	3.34	+/-5.36

### 5.5.2. EFFET DU TRAITEMENT

Le tableau 11 montre les résultats de l'ANOVA 2 observant les effets du traitement et de la profondeur ainsi que leur interaction pour chaque espèce. On voit que pour la luzerne et le mélange, le traitement n'a pas d'effet significatif sur la densité racinaire, quelle que soit la méthode de prélèvement. Les différences constatées dans le tableau 10, bien qu'importantes, ne sont donc pas significatives à 95% (p-valeur inférieure à 0.05). En revanche, pour le dactyle échantillonné verticalement, le traitement a un effet sur la densité racinaire, tout comme la profondeur et l'interaction des deux facteurs. Ceci n'est pas le cas lorsque l'échantillonnage du dactyle est horizontal.

Grâce aux données récoltées durant les comptages racinaires et analysées au point 5.3.1., on constate donc que le traitement a un impact significatif sur le nombre de racines, mais pas sur la densité racinaire à l'exception notable du dactyle échantillonné verticalement.

Tableau 11: Résultats de l'ANOVA 2 concernant l'effet du traitement sur la densité racinaire. Les valeurs en rouge sont significatives (inférieures à 0.05).

Espèce	Effet de	Verticaux	p-valeur	Horizontaux	p-valeur
Luzerne	Traitement		0.05178		0.05864
	Profondeur		0.01813		0.04910
	Interaction		0.07123		0.74200
Dactyle	Traitement		1.486*10 <sup>-5</sup>		0.1518
	Profondeur		3.648*10 <sup>-12</sup>		10 <sup>-7</sup>
	Interaction		7.834*10 <sup>-9</sup>		0.3769
Mélange	Traitement		0.05940		0.6144
	Profondeur		0.04513		10 <sup>-4</sup>
	Interaction		0.14366		0.6446

### 5.5.3. EFFET DE L'ASSOCIATION

Pour établir un éventuel effet causé par l'association d'espèces, de nouvelles analyses ANOVA 2 ont été menées. Les résultats de ces analyses sont exposés dans le tableau 12. Pour les deux méthodes de prélèvement et pour les deux traitements, la luzerne et le dactyle ont été comparés en termes de densité racinaire lorsqu'ils étaient semés seuls et en association. En ce qui concerne la luzerne, on voit que, dans un seul cas, celui de l'association en conditions témoins échantillonnée verticalement, l'association a un effet significatif sur la densité racinaire. Au contraire, la profondeur a systématiquement une p-valeur inférieure à 0.05 et joue donc un rôle dans la densité racinaire. Dans aucun cas, il n'y a d'effet causé par l'interaction entre les deux facteurs (association et profondeur). Il semble donc que, pour la luzerne, l'association avec le dactyle n'influence que rarement la densité racinaire.

En revanche, en ce qui concerne l'effet de l'association sur le dactyle, les résultats sont complètement différents, et on constate des différences entre les résultats obtenus selon les deux méthodes de prélèvements. Dans le cas des prélèvements verticaux, il n'y a pas d'effet du facteur « association » mais bien de la part de la profondeur et de l'interaction entre les deux facteurs. En revanche, pour les prélèvements horizontaux, le facteur association a un effet significatif ainsi que l'interaction en conditions stressées. Dans les conditions témoins des prélèvements horizontaux, il ne semble pas y avoir d'interaction significative entre les facteurs profondeur et association.

Tableau 12: Résultats de l'ANOVA 2 concernant l'effet de l'association sur la densité racinaire selon les différents traitements et modes de prélèvement. Les valeurs en rouge sont significatives (inférieures à 0.05).

	Traitement	Espèce	Effet de	p-valeur
Verticaux	Stressés	Luzerne – Mélange	Association	0.11915
			Profondeur	0.02527
			Interaction	0.05205
		Dactyle – Mélange	Association	0.06794
			Profondeur	7*10 <sup>-5</sup>
			Interaction	0.00903
	Témoins	Luzerne – Mélange	Association	0.00763
			Profondeur	0.02047
			Interaction	0.18928
		Dactyle – Mélange	Association	0.19916
			Profondeur	9*10 <sup>-9</sup>
			Interaction	2*10 <sup>-4</sup>
Horizontaux	Stressés	Luzerne – Mélange	Association	0.09324
			Profondeur	8*10 <sup>-6</sup>
			Interaction	0.07212
		Dactyle – Mélange	Association	10 <sup>-4</sup>
			Profondeur	8*10 <sup>-7</sup>
			Interaction	2*10 <sup>-5</sup>
	Témoins	Luzerne – Mélange	Association	0.96141
			Profondeur	0.02839
			Interaction	0.46375
		Dactyle – Mélange	Association	0.00824
			Profondeur	0.04838
			Interaction	0.11696

#### 5.5.4. EFFET DE LA PROFONDEUR

Le troisième facteur dont l'effet est à estimer est la profondeur. Les prélèvements ont en effet été réalisés à différentes profondeurs, et il est attendu intuitivement que la densité racinaire diminue lorsque la profondeur augmente (voir Fig 29 et 30).

Les résultats sont représentés sur les graphes ci-dessous, d'abord pour les prélèvements verticaux, puis pour les horizontaux. Les lettres présentes au sommet des barres représentant les densités racinaires indiquent l'appartenance des résultats à différents groupes.

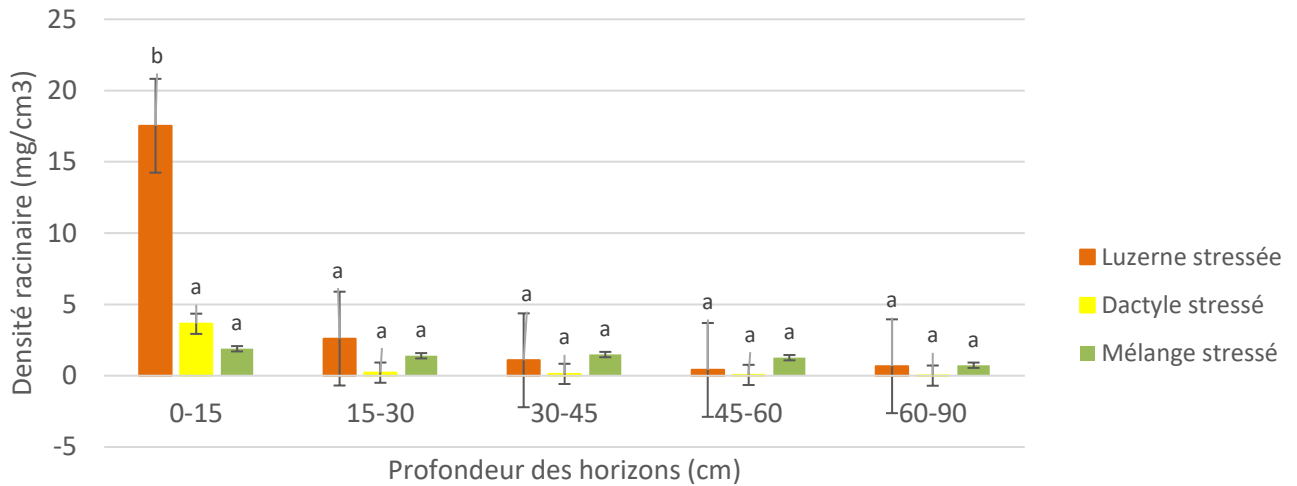


Figure 33: Evolution des densités racinaires par horizon pour les prélèvements verticaux des parcelles stressées

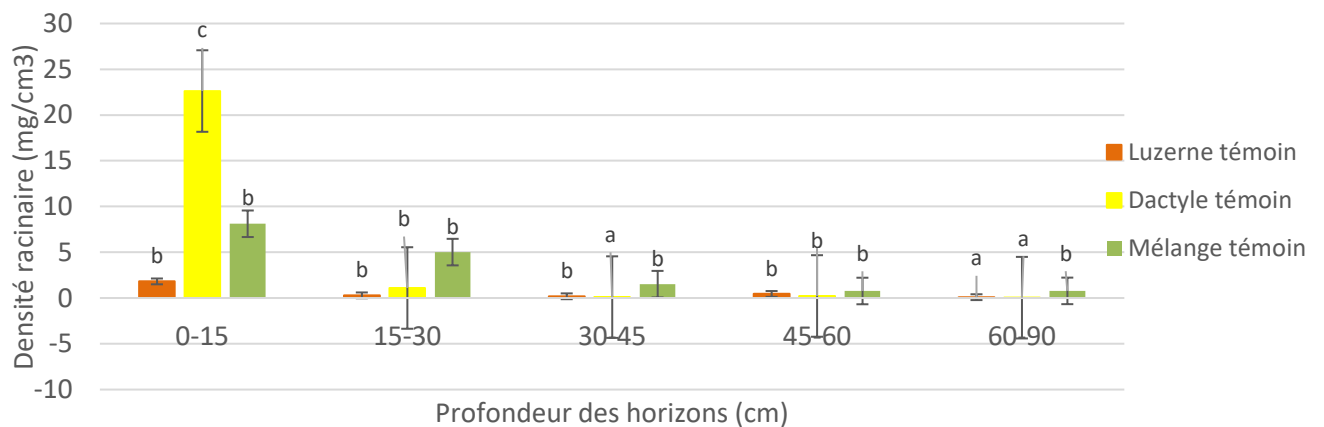


Figure 34: Evolution des densités racinaires par horizon pour les prélèvements verticaux des parcelles témoins

Les figures 31 et 32 montrent clairement qu'il y a une diminution de la densité racinaire avec la profondeur, tant dans les parcelles stressées que dans les parcelles témoins, comme attendu. On constate qu'il y a finalement peu de différences significatives entre les horizons et les espèces : dans les parcelles stressées, la luzerne dans l'horizon supérieur est la seule à présenter une différence avec les autres résultats. Dans les parcelles témoins, il y a trois groupes significativement différents.

Par ailleurs, dans les parcelles stressées, on constate que c'est la luzerne qui présente la densité racinaire la plus élevée, mais qui décroît fortement après le premier horizon, alors que la densité du mélange reste très constante et dépasse même, par endroits, celle de la luzerne.

Dans les parcelles témoins, c'est l'inverse qui se produit et le dactyle produit des densités beaucoup plus élevées dans le premier horizon, avant de tomber quasiment à une densité nulle ( $0.04\text{mg/cm}^3$  dans le dernier horizon). Dans les parcelles témoins, le mélange présente les densités les plus élevées dans tous les horizons, à l'exception du premier.

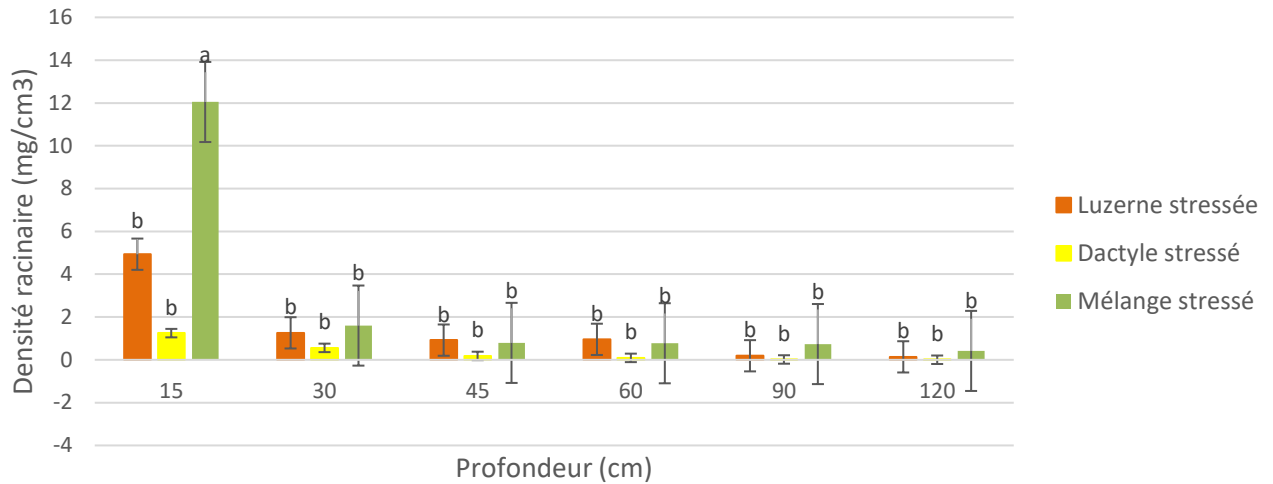


Figure 35: Evolution des densités racinaires par horizon pour les prélèvements horizontaux des parcelles stressées

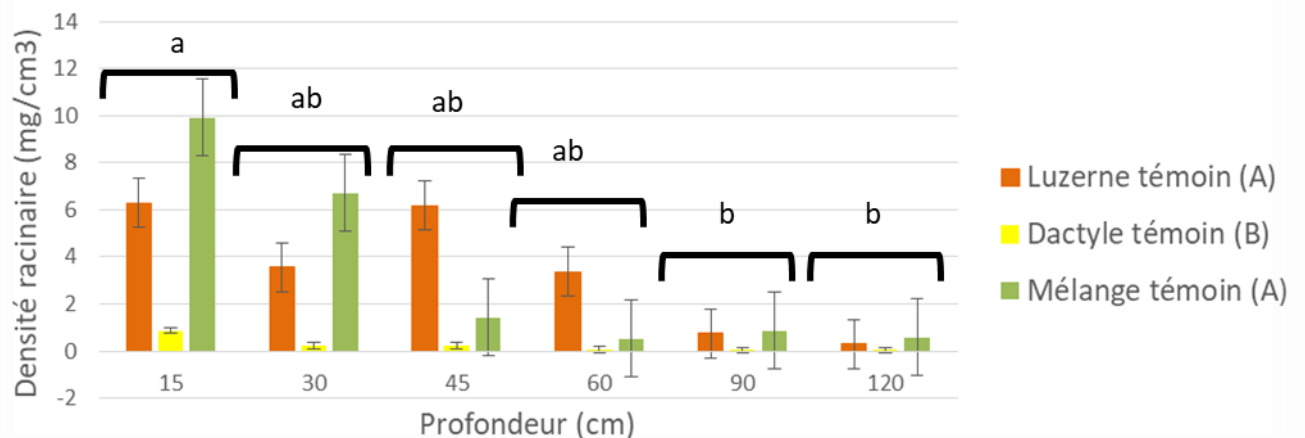


Figure 36: Evolution des densités racinaires par horizon pour les prélèvements horizontaux des parcelles témoins.

Dans la Figure 34, les lettres sont globalisées par horizon et par espèce car les analyses statistiques ont montré qu'il n'y avait aucune interaction entre les facteurs de profondeur et d'espèce (voir également le tableau 12). Deux ANOVA 1 ont donc été effectuées pour analyser ces facteurs.

En ce qui concerne les résultats des prélèvements horizontaux, de nombreuses constatations apparaissent d'emblée. Dans les parcelles stressées, seule la densité du mélange dans l'horizon de surface est significativement différente des autres.

Les résultats ont montré que les densités du dactyle, tous horizons confondus, étaient significativement différentes de celles de la luzerne et du mélange, ces deux dernières espèces faisant partie du même groupe.

En ce qui concerne l'effet de la profondeur, il y a une différence entre les horizons profonds (b) et celui de surface (a), les autres faisant partie des deux groupes (ab). Il est intéressant de constater que de grandes différences de densité sont présentes selon la méthode de prélèvement qui est utilisée. De même, les facteurs significatifs pour expliquer la densité varient selon que l'échantillon est prélevé horizontalement ou verticalement.

Les deux graphes ci-dessus représentent la différence entre les densités racinaires des parcelles témoins et des parcelles stressées pour chaque espèce et profondeur. La différence est obtenue en soustrayant la densité des parcelles stressées aux parcelles témoins.

On remarque que les différences sont plus importantes pour les prélèvements verticaux que pour les horizontaux. Les espèces sont comparées par profondeurs et classées par groupes. Le seul cas où la différence est significative entre les espèces est celui de l'horizon de surface, pour les prélèvements verticaux. Dans tous les autres cas, il n'y a pas de différence significative entre espèces par horizon. Chaque comparaison entre les espèces a été effectuée par des ANOVA 1.

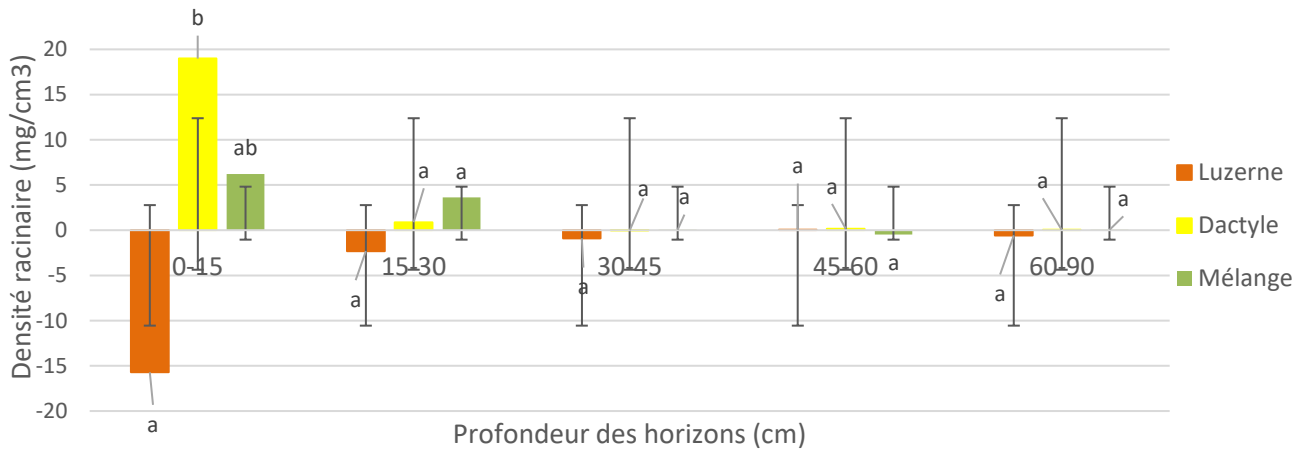


Figure 37: Différence entre densités racinaires des deux traitements par espèce et par horizon pour les prélèvements verticaux

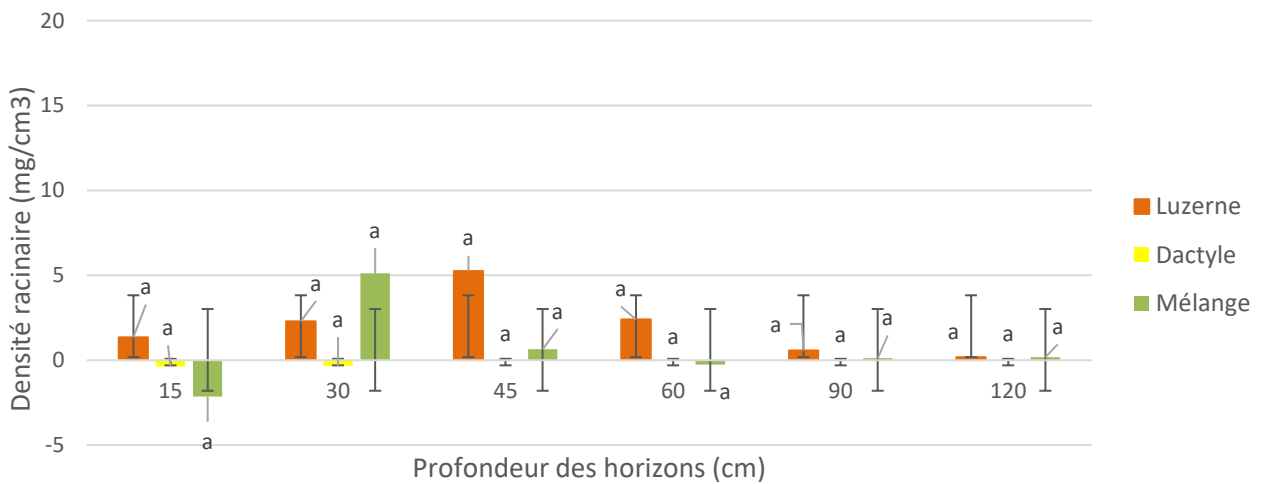


Figure 38: Différence entre densités racinaires des deux traitements par espèce et par horizon pour les prélèvements horizontaux

### 5.5.5. EFFETS DES DIFFÉRENTS FACTEURS ET LEURS INTERACTIONS

Tableau 13: Résultats de l'analyse statistique à propos des différents facteurs et leur significativité pour les prélèvements verticaux.

Facteur	Degrés de liberté	F-value	p-valeur
Espèce (1)	2	0.1546	0.857
Traitement (2)	1	0.7664	0.384
Profondeur (3)	4	19.9358	$8.82 \cdot 10^{-12}$
Interaction (1-2)	2	9.6063	0.000017
Interaction (1-3)	8	2.1667	0.0374
Interaction (2-3)	4	0.7282	0.575
Interaction (1-2-3)	8	6.7224	$7.07 \cdot 10^{-7}$

Tableau 14: Résultats de l'analyse statistique à propos des différents facteurs et leur significativité pour les prélèvements horizontaux.

Facteur	Degrés de liberté	F-value	p-valeur
Espèce (1)	2	10.0670	0.0001
Traitement (2)	1	2.5578	0.1141
Profondeur (3)	5	10.7192	$10^{-7}$
Interaction (1-2)	2	1.4138	0.2499
Interaction (1-3)	10	3.3018	0.0014
Interaction (2-3)	5	0.7326	0.6013
Interaction (1-2-3)	10	0.5675	0.8350

Une ANOVA 3 a été réalisée sur les trois paramètres étudiés séparément et leurs interactions, et ce, pour les deux types de prélèvements. Les résultats sont présentés dans les tableaux 13 et 14 ci-dessus. On constate que les facteurs significatifs dépendent du mode de prélèvement. Pour les prélèvements verticaux, le tableau 13 permet de constater que l'espèce n'a pas d'effet significatif alors que, dans le tableau 14 (prélèvements horizontaux), elle en a un. L'interaction entre le traitement et la profondeur n'est significative dans aucun cas, alors que celle entre l'espèce et la profondeur l'est. Ceci souligne à nouveau les différences observées selon le type de prélèvement.

### 5.5.6. DISCUSSION

L'une des constatations les plus importantes au niveau des densités racinaires est que des différences notables sont observées selon que les échantillons ont été prélevés horizontalement ou verticalement.

De plus, il semble qu'à part la profondeur, la densité racinaire n'est pas influencée par des facteurs de déficit hydrique ou d'association d'espèces. Ceci est fort surprenant lorsqu'on compare la significativité de ces paramètres avec celle de ces mêmes paramètres lors des comptages racinaires. Au vu de tous ces résultats, il apparaît que le déficit hydrique et l'association d'espèces vont avoir un impact sur le nombre de racines mais pas sur la densité. Or, comme la densité racinaire est le reflet du poids de la biomasse souterraine, ces résultats indiqueraient que le poids n'est ni influencé par le déficit hydrique ni par l'association d'espèces.

Une première explication est que ceci est dû à un artefact de la méthode utilisée durant les comptages racinaires. Cette méthode pourrait ne pas être assez représentative et induire des erreurs.

Une seconde cause de ces observations pourrait être un effet du stress, qui va modifier l'architecture du système racinaire. Le système racinaire pourrait, par exemple, privilégier la production de nombreuses petites racines au détriment de la croissance des racines principales. Une étude portant sur les caractéristiques du système racinaire du blé en conditions de stress hydrique a montré que le stress pouvait en effet provoquer des modifications de la structure du système racinaire. Certaines variétés, par exemple, produisaient jusqu'à 70% plus de racines en conditions de stress. D'autres réponses observées, chez d'autres variétés, étaient l'élongation de la racine principale ou l'augmentation du poids sec des racines [45]. Une autre étude, s'intéressant cette fois à l'orge, montre que, durant un stress hydrique, le nombre de racines est fortement réduit par rapport aux plantes n'ayant pas subi de stress. Cette étude montre également que la masse de matière sèche du système racinaire est réduite durant le stress [46]. Il est donc possible que le stress impacte la densité du système racinaire.

#### *Critique de la méthodologie*

Comme pour les comptages racinaires, diverses sources d'erreurs peuvent survenir durant les analyses.

En premier lieu, durant les prélèvements, seule une faible surface de la parcelle est échantillonnée. En effet, les carottes faisant 5cm de diamètre, seuls quelques dizaines de cm<sup>2</sup> étaient prélevés sur l'entièreté de la parcelle. Afin d'être plus représentatif, il serait peut-être intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons ou de prélever des carottes plus larges. Pour les carottages horizontaux, comme les carottes mesuraient une trentaine de cm de long maximum, et qu'elles étaient prélevées depuis le bord de la parcelle, il est possible qu'un effet de bord se soit fait sentir, du moins dans les premiers cm de la carotte. De plus, comme certaines racines étaient de dimensions conséquentes, il se peut que, lorsque la carotte était enfoncée, elle dévie légèrement le long de ces racines, car son tranchant s'émoussait rapidement. Ces déviations peuvent induire des biais dans les observations. Le tranchant était néanmoins aiguisé régulièrement.

Le nombre de racines prélevées grâce à un carottage vertical peut varier fortement selon que le carottage est fait directement sur une plante ou entre deux rangées de plantes. Ceci peut induire une forte variance dans les résultats.

Durant le lavage des racines, la méthode utilisée présente certains inconvénients. Le lavage des racines avec un tuyau d'arrosage sur un tamis peut causer la perte des plus petites racines à travers les trous du tamis, mais surtout, ces racines peuvent être éjectées à cause de l'intensité du jet d'eau. Le temps nécessaire pour briser certains agrégats est considérable mais peut être réduit en laissant préalablement tremper les échantillons de terre dans des récipients remplis d'eau.

L'effet de la méthode d'échantillonnage est également important. Les carottes verticales fournissent une résolution importante vis-à-vis de la profondeur mais sont très peu représentatives à chaque profondeur (vu la faiblesse du volume échantillonné). En revanche, les carottes horizontales ont une faible résolution vis-à-vis de la profondeur mais sont bien représentatives de la densité car, pour chaque profondeur, un volume important est échantillonné. Comme la densité varie assez fortement selon la profondeur, l'échantillonnage pour les carottes horizontales est très fort et ne donne aucune information sur ce qui se passe entre les carottes (soit sur quasi 80% du profil). Cependant, les valeurs mesurées à chaque profondeur sont plus fiables que celles du carottage vertical aux mêmes profondeurs.

### *Perspectives*

Ces résultats, où ni le déficit hydrique ni l'association d'espèce ne semblent jouer un rôle dans la densité racinaire, invitent à de nouvelles études. On pourrait, par exemple, imaginer de réaliser des prélèvements en plus grands nombres afin de limiter les effets de bord ou les erreurs dues à la manipulation des outils.

## 5.6. ANALYSES ADN

---

### 5.6.1. MISE AU POINT

---

Afin de s'assurer du bon fonctionnement de la méthode, une première extraction d'ADN a été réalisée sur des échantillons de dactyle et de luzerne pure. Ces échantillons avaient été combinés pour former des associations artificielles et pouvoir juger de l'efficacité de la méthode. Des échantillons des deux espèces pures avaient également été prévus pour établir une échelle de référence des tailles de fragments, amplifiés pour les marqueurs moléculaires utilisés.

Il est apparu dès les premiers tests que le dactyle posait des problèmes de détection, comme le montre la figure 37. Cette figure présente le premier gel d'électrophorèse qui a été fait durant les mises au point, reprenant les différentes espèces : luzerne (« Lu »), dactyle (« Dact ») et mélange (« Mel »). Les différents échantillons ont été pris à deux profondeurs différentes dans le profil : soit à 90cm (« bas »), soit dans l'horizon 0-15cm (« haut »). Les lettres T et S indiquent si l'échantillon provient des parcelles témoin ou stressées. Le marqueur utilisé pour ce premier gel était le trnL-intron et la dilution effectuée était de 100x.

On constate que, dans les échantillons de mélange, le dactyle n'est jamais visible, alors que, dans la plupart des cas où il est seul, on le détecte correctement. La luzerne est détectée chaque fois et on remarque également que la différence de poids moléculaire entre dactyle et luzerne est assez importante pour permettre la distinction.

Après ce premier gel, l'autre marqueur, à savoir le trnL-trnF, a été testé et a fourni des résultats similaires.

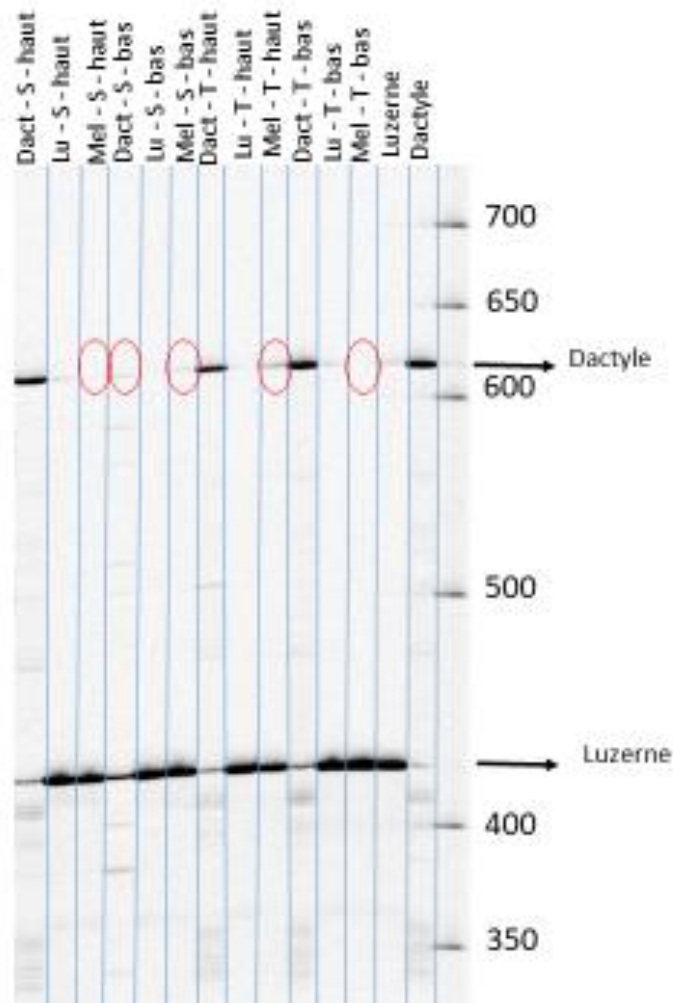


Figure 39: gel d'électrophorèse des résultats d'amplifications PCR des fragments d'ADN issus des espèces pures et des mélanges artificiels pour le marqueur moléculaire *trnL*-Intron. Les cercles rouges indiquent les endroits où le dactyle aurait dû être détecté.

Afin d'obtenir de meilleurs résultats, la dilution a été diminuée, passant de 100x à 20x, afin de mieux détecter l'ADN sur les gels, mais cela n'a rien apporté de nouveau.

Ensuite, il a été décidé de doubler les quantités de marqueurs dans les PCR, afin de vérifier que le problème n'était pas causé par une forme de compétition pour les marqueurs entre les espèces, mais les résultats sont restés identiques.

Ayant tenté de jouer sur de nombreux paramètres, mais sans résultat, il a été décidé de procéder aux broyages, aux extractions d'ADN et aux amplifications, afin de détecter ce qui pouvait l'être dans les échantillons.

### 5.6.2. RÉSULTATS

Même si le dactyle est resté indétectable, cela n'a pas été le cas pour la luzerne. Il est donc possible d'affirmer que, dans chaque échantillon provenant de parcelles de mélange, prélevé de façon verticale ou horizontale, des racines de luzernes étaient présentes à toutes les profondeurs.

La figure 38 présente ces résultats pour les échantillons témoins (sur la partie gauche de l'image) et stressés (sur la partie droite de l'image). Les trois emplacements entourés en rouge représentent des endroits où la luzerne n'était, soit pas visible, soit accompagnée d'un autre signal. Une deuxième PCR a été effectuée sur ces échantillons afin de vérifier si la luzerne était bien présente. Lors de ce nouveau test, aucun des trois échantillons n'a posé de problème et la luzerne a été détectée, ce qui prouve qu'elle était présente dans tous les échantillons.

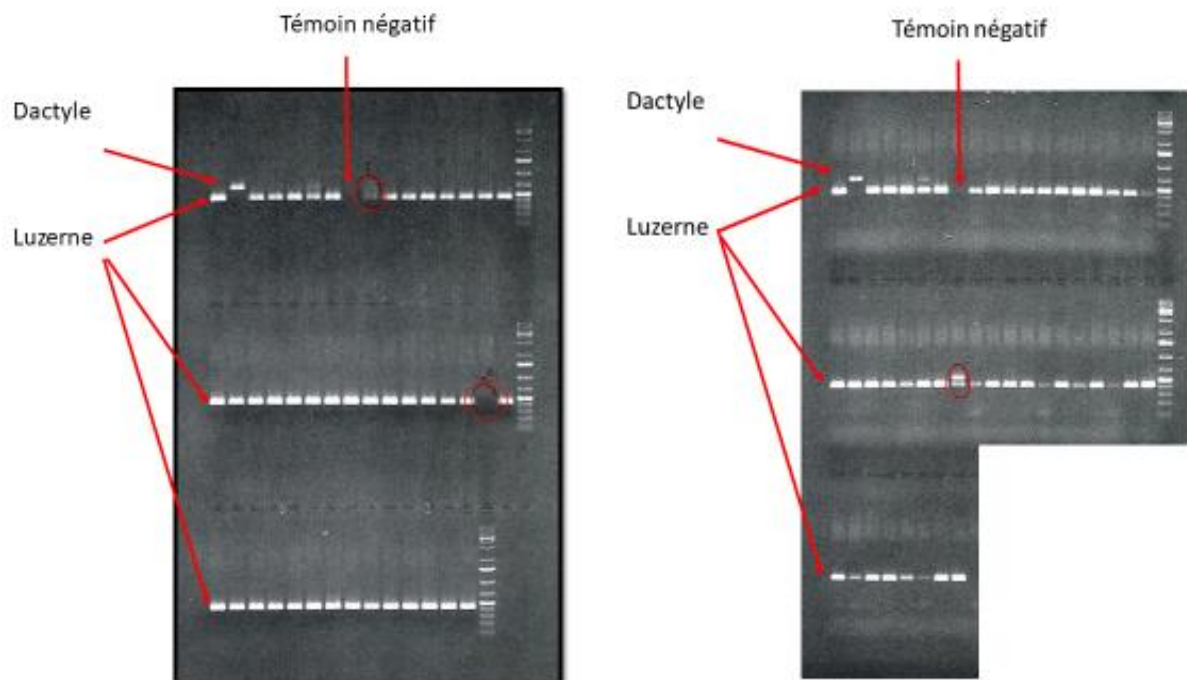


Figure 40: gel d'acrylamide des résultats d'amplifications PCR des fragments d'ADN issus des échantillons des parcelles de mélange témoin (gauche) et stressé (droite) et des mélanges artificiels pour le marqueur moléculaire trnL-Intron

### 5.6.3. DISCUSSION ET RÉFLEXION CRITIQUE

Connaissant l'étendue habituelle du système racinaire de la luzerne et sa capacité d'atteindre des profondeurs importantes [15], il n'est guère étrange de retrouver la présence de luzerne dans les différents échantillons, même à 150cm sous le niveau du sol. Le fait que la luzerne soit présente dans absolument chaque échantillon de sol indique que son système racinaire est bien répandu, même dans les couches plus profondes du sol et même dans des conditions de déficit hydrique.

Cependant, la principale réflexion à mener au sujet de ces analyses génétiques porte sur les difficultés à détecter le dactyle. Les différentes méthodes d'analyses utilisées visaient à

comprendre ce qu'il se passait et pourquoi le dactyle était invisible. Elles n'ont malheureusement pas abouti au résultat désiré, mais permettent de rejeter certaines possibilités concernant ce qu'il se produit.

En premier lieu, on peut être catégorique sur le fait que le problème ne se produit pas lors du broyage ou de l'extraction d'ADN. En effet, chaque échantillon est soumis à une analyse spectrophotométrique avec un Nanodrop. Cette analyse permet de déterminer la quantité d'ADN présente dans l'échantillon afin d'établir les dilutions à réaliser. Les résultats de cette analyse ont révélé qu'il y avait bien de l'ADN dans chaque échantillon, preuve que l'extraction se déroulait correctement. Le problème se produit donc lors de la PCR.

Afin d'obtenir des résultats, diverses méthodes ont été étudiées, chacune tentant d'aborder le problème d'un angle différent. En premier lieu, il a été cru que le dactyle serait plus visible en variant la dilution effectuée sur le gel. Celle-ci est donc passée de 200x à 20x, mais sans résultats. Ensuite, il a été vérifié que les marqueurs n'étaient pas en cause : d'autres marqueurs ont été testés, sans que ceux-ci n'apportent une amélioration. Les conditions de la PCR ont également été altérées : afin de laisser à la polymérase plus de temps pour agir, le nombre de cycles a été augmenté. Différents essais de températures ont été réalisés, pour avoir les meilleures conditions d'hybridation, mais sans résultats. Des doubles PCR ont également été réalisées, avec l'espoir que le dactyle serait plus visible après une double amplification, mais à nouveau, cela n'a fourni aucune avancée.

L'hypothèse a été émise que l'erreur pouvait provenir de l'opérateur, mais une technicienne expérimentée a ensuite réalisé les mêmes manipulations et est arrivée aux mêmes résultats.

D'autres études révèlent une certaine difficulté à réaliser des identifications dans des conditions similaires. Certaines [39], par exemple, rapportent des difficultés à détecter des échantillons de plantes monocotylées dans des échantillons contenant plusieurs espèces, alors que l'on sait que ces plantes sont présentes, et qu'il n'y a pas de problème pour les dicotylées. D'autres [32], proposent de développer de meilleurs marqueurs, plus spécifiques, pour remédier à ce problème.

Durant toutes les manipulations, il était important d'empêcher la dégradation des racines en les stockant au froid. Cependant, il se peut qu'une dégradation de l'ADN ait eu lieu, compliquant les identifications génétiques.

### *Perspectives*

L'utilisation de la méthode FALP semble prometteuse mais révèle encore des problèmes. Pour améliorer la détection, c'est bien sur l'étape de la PCR qu'il est nécessaire de travailler. La principale avancée pourrait être faite au niveau des marqueurs. Ceux-ci doivent être rendus plus spécifiques et plus performants vis-à-vis du dactyle et des monocotylées en général. Il serait également intéressant de réaliser plus de tests avec différentes conditions de PCR, afin de mieux déterminer l'efficacité de celle-ci sous les paramètres de température ou de nombre de cycles.

---

## 6. *Conclusion et perspectives*

---

Dans un contexte où les contraintes physiques à la production agricole ne cessent de s'intensifier, il est essentiel de réfléchir aux futures méthodes de production. Ce travail a pour objectif, d'une part, d'observer la réaction de plantes au niveau de leur système racinaire dans des conditions de déficit hydrique, et, d'autre part, d'étudier l'effet d'associations de plantes.

Les analyses menées ont concerné les différentes composantes du système sol-plante, en faisant usage de diverses méthodes d'observation et d'identification. La période durant laquelle le déficit hydrique a été imposé, s'est inscrite dans la moyenne en termes de pluviométrie et de température, ce qui mène à la conclusion que le témoin peut être représentatif d'une année type.

Les observations de la structure du sol ont démontré de légères différences entre les parcelles expérimentales, certaines ayant un horizon de loess plus important que d'autres, et une présence variable de sable à différentes profondeurs. Ces différences ne devraient pas jouer un rôle majeur dans la disponibilité de l'eau dans le sol. En revanche, ces observations ont montré la présence d'une semelle de labour extrêmement importante pour toutes les parcelles. Cette zone compacte risque de limiter l'infiltration de l'eau, la pénétration des racines et donc leur accès à l'eau située en-dessous et pourrait ainsi renforcer un stress ressenti par la plante. Pour étudier l'impact que peut jouer le sol, il pourrait être intéressant de réaliser une étude similaire à celle-ci, mais en soumettant les parcelles à diverses préparations du sol. On pourrait ainsi comparer le labour et le non-labour, ou l'effet du paillage, par exemple.

Une autre série de mesures visait à déterminer si le nombre de racines produites par la plante était influencé par les conditions imposées. Trois facteurs et leurs interactions ont été étudiés, à savoir, le déficit hydrique, l'association de deux plantes (appelée « mélange »), et la profondeur. Les analyses statistiques ont démontré un impact significatif de chaque facteur. Il a été observé que la luzerne réagissait différemment, en conditions de déficit, que le dactyle et le mélange, produisant plus de racines qu'en conditions normales. Il a également été vu que le dactyle et le mélange disposaient de racines en plus grand nombre que la luzerne, du moins aux profondeurs superficielles.

L'effet de l'association est plus difficile à établir, car l'association semble se comporter comme le dactyle pur.

Par ailleurs, comme attendu intuitivement, le nombre de racines diminue lorsque la profondeur augmente, et cette diminution observe une allure exponentielle tendant vers 0.

La densité des racines a également été observée, en tenant compte des 3 mêmes facteurs que pour le nombre de racines, et en considérant deux méthodes de prélèvement des échantillons. Il a été constaté que, selon la méthode de prélèvement, les paramètres ayant un impact significatif variaient. Seule la profondeur a un impact sur la densité racinaire dans les 2 cas, ce qui semble logique. Pour les prélèvements exécutés de façon horizontale, l'association présente également une différence significative, et les comportements sont similaires à ceux observés dans les comptages : la densité racinaire de la luzerne est plus importante en conditions stressées, alors que l'inverse est observé pour le dactyle et le mélange. Il semble donc que la plante réagit aux conditions de stress hydrique, en termes de nombre de racines, mais pas en termes de densité massique de ces racines.

En comparant tous ces résultats avec les données de rendement, on constate que le rendement est impacté négativement par le stress hydrique, même si les résultats des mesures de teneur en eau volumique montrent que le stress n'est pas ressenti à la profondeur de 75cm ou plus bas. Ceci montre que le seuil à partir duquel le manque d'eau impacte le rendement de la parcelle ne concerne que les horizons supérieurs du sol. Il serait donc intéressant d'étudier quels sont les horizons auxquels les plantes prélèvent la majorité de l'eau qu'elles utilisent, et ce, pour différentes espèces avec différents systèmes racinaires. On voit également que les plantes, bien que montrant diverses réponses au déficit hydrique (par exemple la luzerne qui produit plus de racines), ne peuvent empêcher une importante baisse du rendement en conditions stressées. L'effet de l'association d'espèces est certes présent en conditions témoins (avec un rendement supérieur aux espèces pures), mais ne semble pas atténuer les effets négatifs d'un déficit hydrique.

Finalement, une série d'expériences avait pour objectif de déterminer la provenance des racines prélevées, afin de mieux cartographier les systèmes racinaires. Ces analyses devaient se baser sur l'identification génétique des racines. Cependant, malgré tous les efforts et en dépit de nombreuses tentatives d'explorer diverses voies d'amélioration, il a été impossible d'observer du dactyle lorsqu'il se trouvait en mélange avec de la luzerne. Le problème survient lors de l'étape de la PCR, durant laquelle l'amplification des séquences de dactyle semble ne pas avoir lieu. En revanche, il a été possible de détecter de la luzerne dans chaque échantillon provenant des parcelles de mélange, indépendamment de sa profondeur ou de son traitement. C'est donc à ce niveau-ci que se trouve la plus grosse amélioration potentielle à réaliser : il est nécessaire de trouver un moyen de détecter le dactyle. D'autres études, cependant, ont également signalé une difficulté à amplifier l'ADN de plantes monocotylées et suggèrent une amélioration des marqueurs utilisés.

---

## 7. Bibliographie

---

- [1] European Environment Agency, (2015). Climate change impacts and adaptation. <https://www.eea.europa.eu/soer-2015/europe/climate-change-impacts-and-adaptation>
- [2] European Environment Agency, (2012). Climate change, impacts and vulnerability in Europe, 2012. An indicator-based report. EEA report no 12, 27.
- [3] European Environment Agency, (2012). Climate change, impacts and vulnerability in Europe, 2012. An indicator-based report. EEA report no 12, 61-67
- [4] Crémer S. (2015), La gestion des prairies. 2
- [5] Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales, prairie
- [6] Crémer S. (2015), La gestion des prairies. 2-3
- [7] Crémer S. (2015), La gestion des prairies. 3
- [8] Crémer S. (2015), La gestion des prairies. 3-8
- [9] Institut National de la Recherche Agronomique, (2018). Luzerne fiche, <https://www7.inra.fr/hyppz/CULTURES/3c---017.htm>
- [10] Direction générale statistiques, (2017), Chiffres clés de l’agriculture, l’agriculture belge en chiffres, 9-24
- [11] Willey, R.W. (1979) Intercropping—Its Importance and Research Needs. Competitions and Yield Advantages. *Field Crop Abstracts*, 32, 1-10.
- [12] Agence Nationale de la Recherche, (2012), Les cultures associées céréales/légumineuse en agriculture « bas intrants » dans le sud de la France, 4
- [13] Gastal F., Julier B., Surault F., Litrico I., Durand J-L., Denoue D., Ghesquière M., Sampoux J-P., (2012) Intérêt des prairies cultivées multispèces dans le contexte des systèmes de polyculture-élevage. *Innovations agronomiques*. 22 169-183,
- [14] Institut National de la Recherche Agronomique, (2018). Dactyle fiche, <https://www7.inra.fr/hyppz/CULTURES/3c---046.htm>
- [15] Robert L., Bisson M., (2010), Grandes cultures, compaction, racines et rendement, 1-4
- [16] Le Grand P., (1979), Biomasse racinaire de la strate herbacée de formations sahéliennes, ACC lutte contre l’aridité dans l’Oudalan (Haute-Volta), 4-9
- [17] Bengough A.G., Bransby M. F., Hans J., McKenna S. J., Roberts T. J., & Valentine T. A., (2006). Root responses to soil physical conditions: growth dynamics from field to cell. *Journal of experimental botany*, 57(2), 437-447

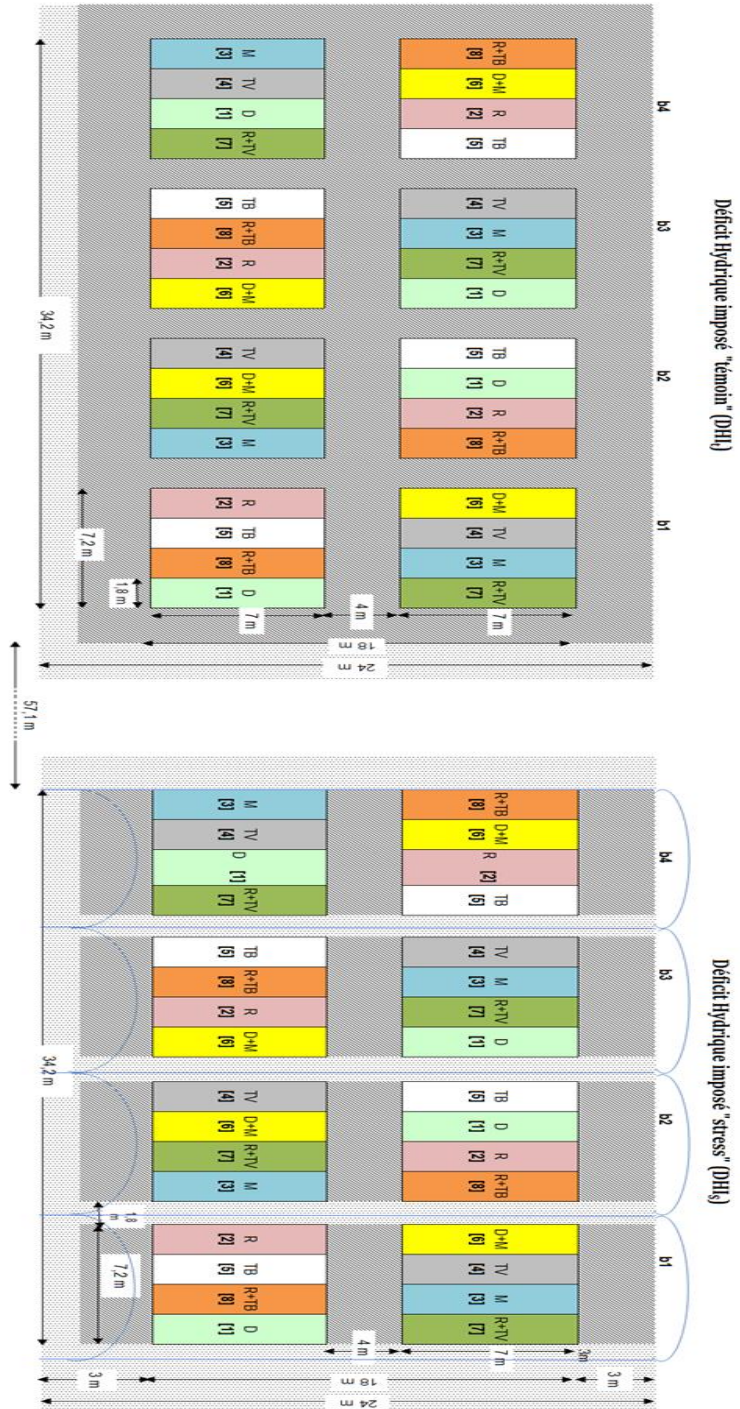
- [18] Grosbellet C. (2008). Evolution et effets sur la structuration du sol de la matière organique apportée en grande quantité. 53-55
- [19] Grosbellet C. (2008). Evolution et effets sur la structuration du sol de la matière organique apportée en grande quantité. Springer : Berlin 33-50
- [20] Hodge A., (2004). The plastic plant : root responses to heterogeneous supplies of nutrients, *New phytologist*. 162, 9-24
- [21] Smit A.L., Bengough A. G. Engels C., Van Noordwijk M., Pellerin S., Van de Geijn S.C., (Eds.), (2000) Root Methods, a handbook. 147-159
- [22] Taiz L., Zeiger E., Moller I. M., Murphy A., (2015) Plant physiology and development. Sinauer Associates
- [23] Bécel C. (2010). Croissance racinaire en verger de pêchers – Influence de la disponibilité en assimilats carbonés et des contraintes du sol. 23-31
- [24] Hodge A., Robinson D., Griffiths B. S., Fitter A.H., (1999), Why plants bother: root proliferation results in increased nitrogen capture from an organic patch when two grasses compete, *Plant cell and environment*, 22, 7, 811-820
- [25] Smit A.L., Bengough A. G. Engels C., Van Noordwijk M., Pellerin S., Van de Geijn S.C., (Eds.), (2000) Root Methods, a handbook. 35-73
- [26] Institut National de Recherche Agronomique, (1990), La structure du sol et son évolution : conséquences agronomiques, maîtrise par l'agriculteur. *Les colloques de l'INRA*. 53, 37-39 Laon
- [27] Institut National de Recherche Agronomique, (1990), La structure du sol et son évolution : conséquences agronomiques, maîtrise par l'agriculteur. *Les colloques de l'INRA*. 53, 40-47 Laon
- [28] Institut National de Recherche Agronomique, (1990), La structure du sol et son évolution : conséquences agronomiques, maîtrise par l'agriculteur. *Les colloques de l'INRA*. 53, 91-97 Laon
- [29] Durand J-L., (2007), Les effets du déficit hydrique sur la plante : aspects physiologiques. *Fourrages*. 190, 181-185
- [30] Zhang J., Davies W.J. (1989), Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status, *Plant, Cell and Environment*, 12, 73-81.
- [31] Di Pietro M., (2011). Régulation des aquaporines et réponses des racines d'*Arabidopsis Thaliana* à des stimuli abiotiques et nutritionnels. 15-19
- [32] Rewald B., Meinen C., Trockenbrodt M., Ephrath J. E., Rachmilevitch S., (2012), Root taxa identification in plant mixtures – current techniques and future challenges, *Plant and Soil*, 359 1-2, 165-182
- [33] Huang B., Fry J. D., (1998), Root anatomical, physiological and morphological responses to drought stress for tall fescue cultivars, *Crop science*, 38, 1017-1022

- [34] Tosti G., Thorup-Kristensen K., (2010), Using coloured roots to study root interaction and competition in intercropped legumes and non-legumes, *Journal of Plant Ecology*, 3,3, 191-199
- [35] Murakami T., Shimano S., Kaneda S., Nakajima M., Urashima Y., Miyoshi N., (2006), Multicolor staining of root systems in pot culture, *Soil Science Plant Nutrition*, 52, 618-622
- [36] Cahill J.F., McNickle G., Haag J., Lamb E., Nyanumba S., Clair C., (2010), Plants integrate information about Nutrients and Neighbours, *Science*, 328, 5986, 1657-1657
- [37] Kesanakurti P., Fazekas A., Burgess K., Percy D., Newmaster S., Graham S., Barrett S., Hajibabaei M., Husband B., (2011), Spatial patterns of plant diversity below-ground as revealed by DNA barcoding, *Molecular Ecology*, 20, 6, 1289-1302
- [38] Mommer L., Wagemaker A.M., De Kroon H., Ouborg N.J., (2008) Unravelling below-ground plant distributions: a real-time polymerase chain reaction method for quantifying species proportions in mixed root samples, *Molecular Ecology Resources*, 8, 947-953
- [39] Taggart J.M., Cahill J.F., McNickle G.G., Hall J.C., (2011), Molecular identification of roots from a grassland community using size differences in fluorescently labelled PCR amplicons of three cpDNA regions: Molecular diagnostics and DNA taxonomy, *Molecular Ecology Resources*, 11,1, 185-195
- [40] Bouazzama B., Xanthoulis D., Bouaziz A., Ruelle P., Mailhol J-C., (2012), Effect of water stress on growth, water consumption and yield of silage maize under flood irrigation in a semi-arid climate of Tadla (Morocco), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 16(4), 468-477
- [41] Frank D., Pontes A., Maine E. M., Caruana J, Raina R., Raina S., Fridley J., (2010) Grassland root communities : species distributions and how they are linked to aboveground abundance, *Ecology*, 9, 11, 3201-3209
- [42] Robbins N.E., Dinneny J.R., (2015), The divining root: moisture-driven responses of roots at the micro- and macro-scale, *Journal of Experimental Botany*, 66, 8, 2145-2154
- [43] Halim R., Buxton D., Hattendorf M., Carlson R., (1989), Water-deficit effects on alfalfa at various growth stages, *Agronomy Journal*, 81, 5, 765-770
- [44] Staniak M., (2016), The impact of drought stress on the yields and food value of selected forage grasses, *Acta Agrobotanica*, 69, 2
- [45] El Fakhri M., Mahboub S., Benchekroun M., Nsarellah N., (2010), Effet du stress hydrique sur les caractéristiques d'enracinement du blé dur (*Triticum Durum* Desf.), *Nature et Technologie*, 1-7
- [46] Khaldoun A., Chery J., Monneveux P., (1990), Etude des caractères d'enracinement et de leur rôle dans l'adaptation au déficit hydrique chez l'orge (*Hordeum vulgare* L), *Agronomie*, EDP Sciences, 10 (5), 369-379

## 8. Annexes

### 8.1. ENSEMBLE DES PARCELLES DU PROJET FORDROUGHT

Symbole	Espèce/variété	Dose kg/ha <sup>2</sup> /sema
D	Dactyle / Archibaid	30
R	Ray-grass anglais 2n/ Cangou	25
M	Luzeerne / Marshall	30
TV	Trefle violet 2n / Pavo	25
TB	Trefle blanc / Milagro	12
D + M	Archibaid + Marshall	15 + 18 (33)
R + TV	Cangou 2n + Pavo	20 + 8 (28)
R + TB	Cangou 2n + Milagro	20 + 2 (22)



Nouvel essai DH1 2016-2018

semé le 27/04/2016

## 8.2. MÉLANGES PCR POUR LES MARQUEURS TRNT-TRNL, C-D ET K1-K2 POUR UN VOLUME FINAL DE 20 $\mu$ L

trnT-trnL	C-D
➤ 1 $\mu$ l ADN	➤ 1 $\mu$ l ADN
➤ 4 $\mu$ l Tampon PCR 5x	➤ 4 $\mu$ l Tampon PCR 5x
➤ 2 $\mu$ l dNTPs (2mM)	➤ 2 $\mu$ l dNTPs (2mM)
➤ 2 $\mu$ l BSA 10mg/l	➤ 2 $\mu$ l BSA 10mg/l
➤ 1.2 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> (25mM)	➤ 1.6 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> (25mM)
➤ 0.3 $\mu$ l amorce trnT-trnL (10 $\mu$ M)	➤ 0.5 $\mu$ l amorce C-D (10 $\mu$ M)
➤ 0.3 $\mu$ l amorce trnT-trnL* (marquée) (10 $\mu$ M)	➤ 0.5 $\mu$ l amorce C-D* (marquée) (10 $\mu$ M)
➤ 9.1 $\mu$ l H <sub>2</sub> O	➤ 8.2 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
➤ 0.1 $\mu$ l Taq 5U	➤ 0.2 $\mu$ l Taq 5U
➔ <b>Total = 20<math>\mu</math>l</b>	➔ <b>Total = 20<math>\mu</math>l</b>

K1-K2
➤ 1 $\mu$ l ADN
➤ 4 $\mu$ l Tampon PCR 5x
➤ 2 $\mu$ l dNTPs (2mM)
➤ 2 $\mu$ l BSA 10mg/l
➤ 1.6 $\mu$ l MgCl <sub>2</sub> (25mM)
➤ 0.5 $\mu$ l amorce K1-K2 (10 $\mu$ M)
➤ 0.5 $\mu$ l amorce K1-K2* (marquée) (10 $\mu$ M)
➤ 8.2 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
➤ 0.2 $\mu$ l Taq 5U
➔ <b>Total = 20<math>\mu</math>l</b>

### 8.3. DÉTAILS DU CYCLE D'AMPLIFICATION UTILISÉ POUR LES PCR AVEC LES MARQUEURS TRNT-TRNL, C-D ET K1-K2

Température (°C) (trnT-trnL)	Temps	
➤ 94°	➤ 5'	2x
➤ 94°	➤ 45''	
➤ 56°	➤ 1'	33x
➤ 72°	➤ 1'20''	
➤ 94°	➤ 45''	T° -0.3°C/cycle
➤ 61.5°	➤ 1'	
➤ 72°	➤ 1'20''	
➤ 72°	➤ 10'	
➤ 12°	➤ Jusqu'au retrait	

Température (°C) (C-D)	Temps	
➤ 94°	➤ 5'	30x
➤ 94°	➤ 45''	
➤ 58°	➤ 3'	
➤ 72°	➤ 10'	
➤ 12°	➤ Jusqu'au retrait	

Température (°C) (K1-K2)	Temps	
➤ 94°	➤ 5'	30x
➤ 94°	➤ 45''	
➤ 53°	➤ 3'	
➤ 72°	➤ 10'	
➤ 12°	➤ Jusqu'au retrait	

## Réponse du système racinaire de *Dactylis glomerata* et *Medicago sativa* à une contrainte hydrique en culture pure et en association.

Présenté par Benoît Destrée

### Résumé

Les prévisions climatiques indiquent que, d'ici à la fin du 21<sup>e</sup> siècle, la Belgique pourrait connaître un régime de précipitations fort différent de celui d'aujourd'hui. Les précipitations pourraient être inférieures jusqu'à 25% durant les mois d'été, induisant des déficits hydriques chez les plantes. Les prairies, très présentes dans tous les systèmes agricoles belges, pourraient voir leur productivité réduite suite à ces nouvelles conditions. Ce mémoire s'insère dans le projet ForDrought, dont le but est d'améliorer les performances de plantes fourragères en conditions de sécheresse et d'identifier les espèces qui résistent le mieux dans ces conditions afin de pouvoir mettre en place les futurs systèmes de production.

L'objectif de cette étude est d'observer le comportement de plantes soumises à un stress hydrique au niveau de leur système racinaire. Les plantes étudiées, le dactyle et la luzerne, le sont en culture pure et en association l'une avec l'autre. Le mémoire comporte deux parties. La première consiste à déterminer si le volume de sol est exploré de façon optimale par les racines lors de l'association et si des différences sont observées par rapport aux plantes cultivées seules. La seconde vise à déterminer l'adaptation du système racinaire lorsque les plantes ont été soumises à un déficit hydrique durant un mois et demi. Les observations réalisées portent sur la distribution et la densité des racines des deux espèces dans le sol.

En ce qui concerne le nombre de racines, des comptages ont permis de montrer qu'un déficit hydrique avait pour conséquence un nombre de racines plus faible qu'en conditions normales chez le dactyle et l'association. En revanche, la luzerne produit plus de racines lorsqu'elle est soumise au déficit qu'en conditions normales. Dans l'absolu, les plantes en association produisent plus de racines que leurs équivalentes en culture pure, même si ce n'est pas le cas pour tous les horizons.

L'impact du déficit sur la densité des racines est plus difficile à déterminer, tout comme l'effet de l'association car ces effets ne sont pas significatifs. En revanche, il semble qu'il y ait des différences selon le mode de prélèvement, avec des effets significatifs différents.

Nous avons tenté d'identifier la provenance des racines prélevées par analyse génétique et, là encore, les résultats ont été surprenants. La luzerne a été identifiée dans chaque échantillon, alors que le dactyle n'a pu être détecté. De nombreux tests et modifications de la méthode n'ont pas pu améliorer cette situation. Le sol des différentes parcelles a également été analysé, et ces analyses ont révélé la présence d'une importante semelle de labour compacte, ce qui peut constituer un obstacle pour les racines en manque d'eau, et qui pointe l'importance de la structure du sol pour le développement d'un bon système racinaire.

Les analyses des rendements semblent, quant à elles, indiquer que le déficit hydrique avait un effet négatif, du moins sur la luzerne et l'association. L'effet de l'association n'est pas clairement établi.

Finalement, les résultats de sondes TDR indiquent que le déficit hydrique s'est fait surtout ressentir dans les zones superficielles du sol, sans impacter des profondeurs de 75cm, ou plus bas.