

COMIFER Groupe PKMg

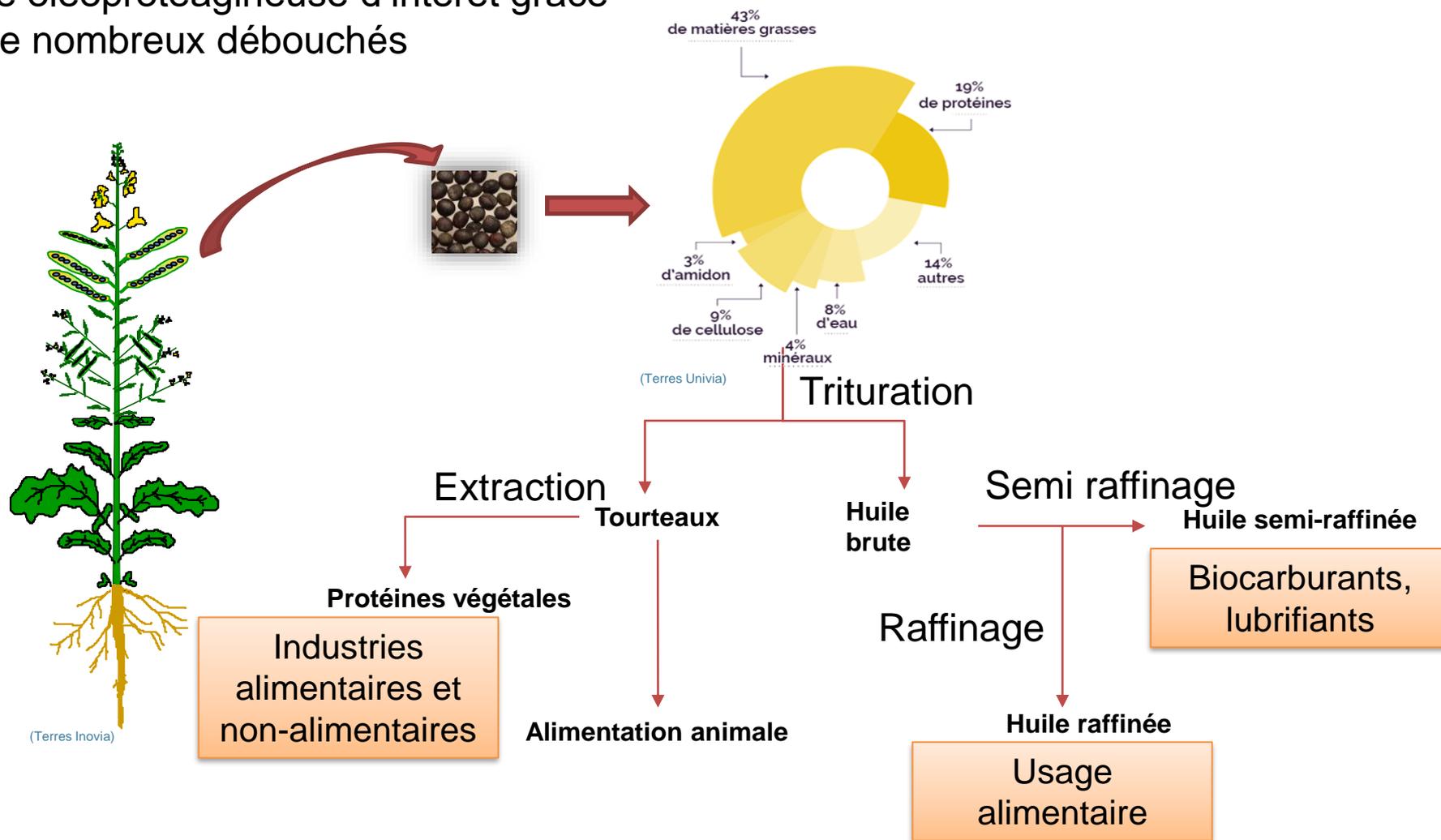
Réunion du 2 juin 2022

Utilisation de bactéries solubilisatrices de phosphates au service de la nutrition du Colza

Charlotte Amy, Karine Laval, Jean-Christophe Avice,
Mélanie Bressan

La culture du colza

Une oléoprotéagineuse d'intérêt grâce
à de nombreux débouchés



- Culture caractérisée par une forte exigence en azote (N) et phosphore (P) (COMIFER)
- Objectif 35 q / ha
 - 90 U de P_2O_5
 - 50 % de perte dans les cas les plus carencés (CETIOM)
 - 245 U de N
 - Jusqu'à 15% de perte de rendement (Perspectives-agricoles)
- Seulement 50 à 60 % de l'azote apporté sous forme d'engrais sont retrouvés dans la plante (Malagoli et al., 2005), et seulement 20 à 30 % du phosphore appliqué (Syers et al., 2009)
- Pertes dans l'environnement (Menesguen et al., 2001)
 - Eutrophisation, émission de gaz à effets de serre
 - Diminution de la biodiversité



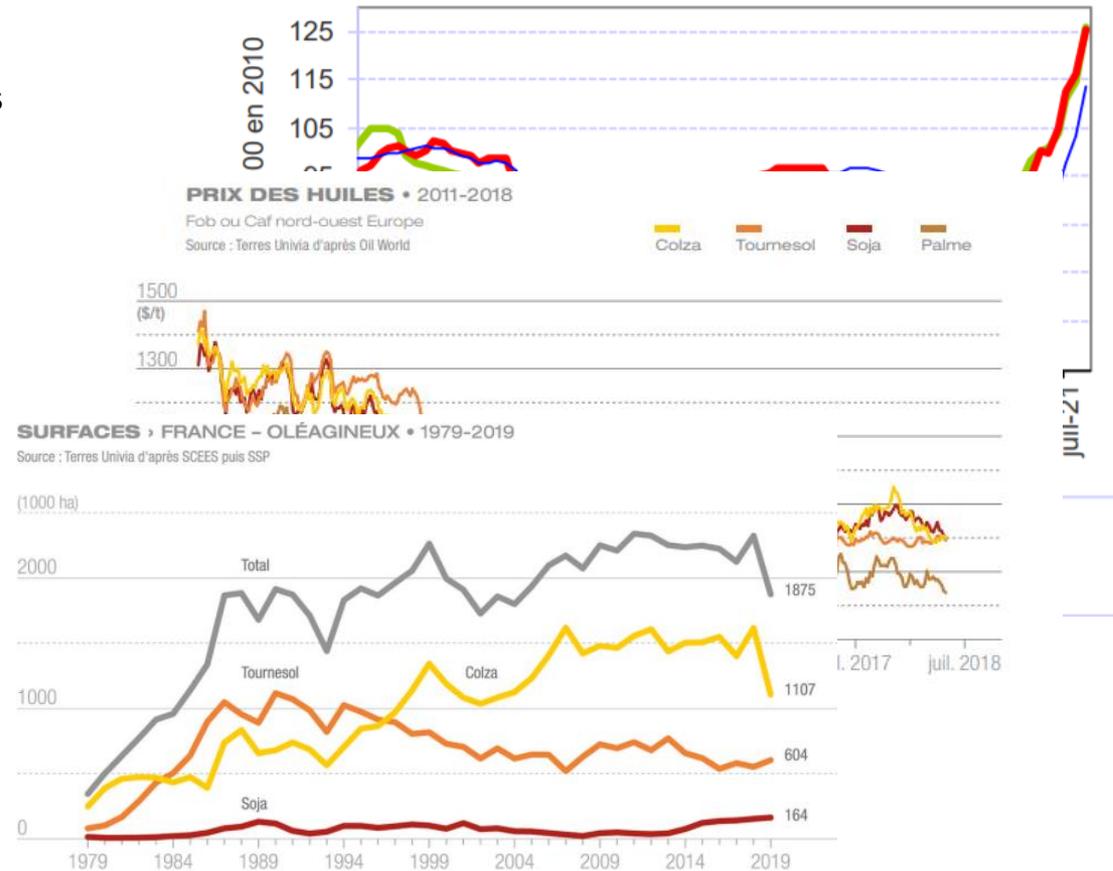
➤ Augmentation du prix des engrais

➤ Diminution des prix des produits depuis 2012

- Graines (-30%)
- Tourteaux (-30%)
- Huiles (-43%)

➤ Recul des surfaces

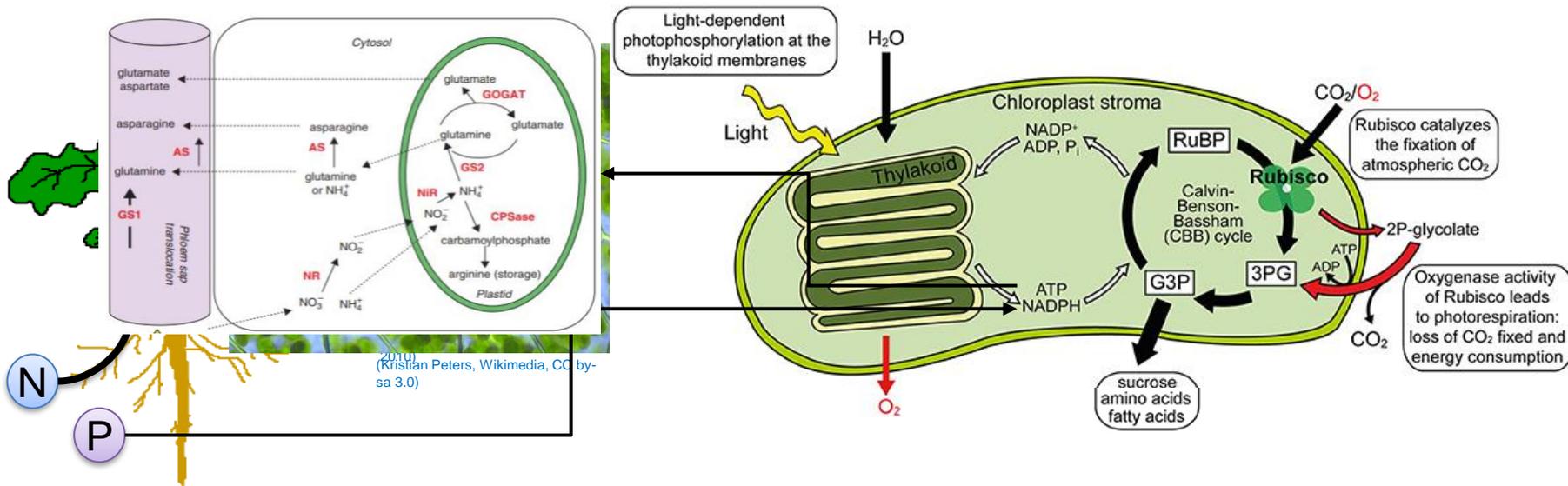
- Vigueur à l'entrée d'hiver
- Susceptibilité ravageurs
- Diminution des phytosanitaires



Liens N&P au niveau de la cellule végétale

Chloroplastes :

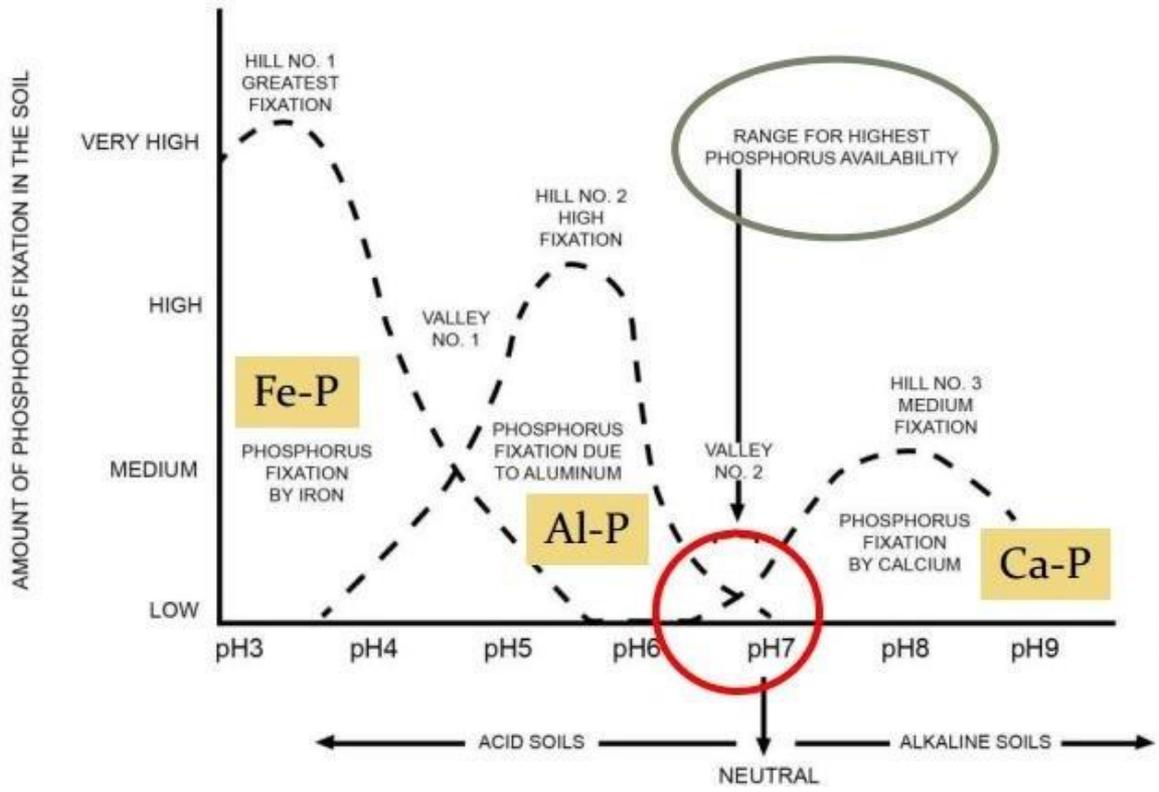
Rubisco > 50 % protéines solubles de la cellule



2011) (Kristian Peters, Wikimedia, CC by-sa 3.0)

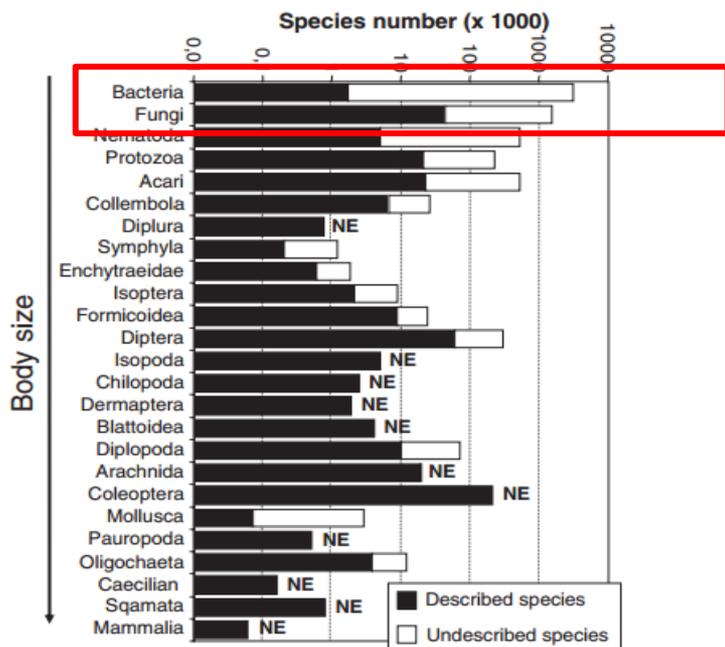
(Baht et al., 2017)

Problématique du P dans les sols



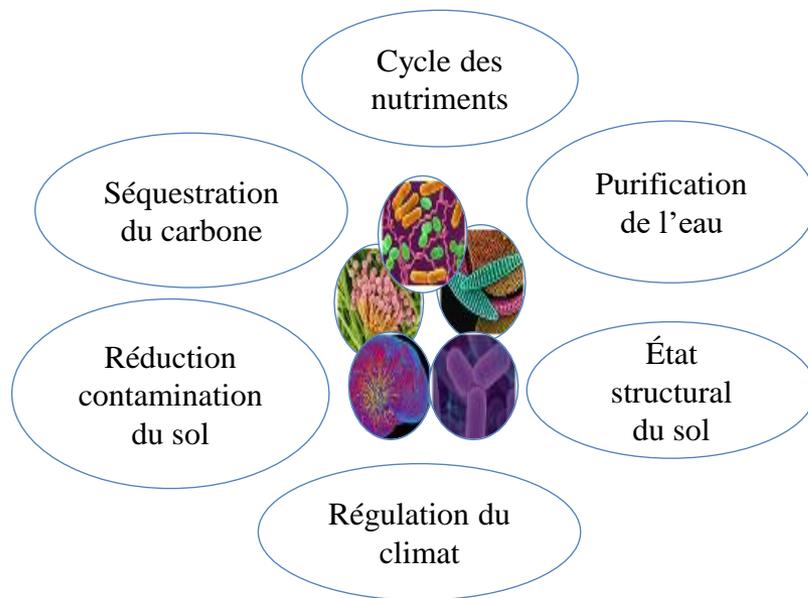
(Seeda et al., 2020)

- Grand nombre d'espèces (10^5 / g de sol, Fierer et al., 2007)
- Impliqués dans de nombreux services écosystémiques
 - Fertilité des sols



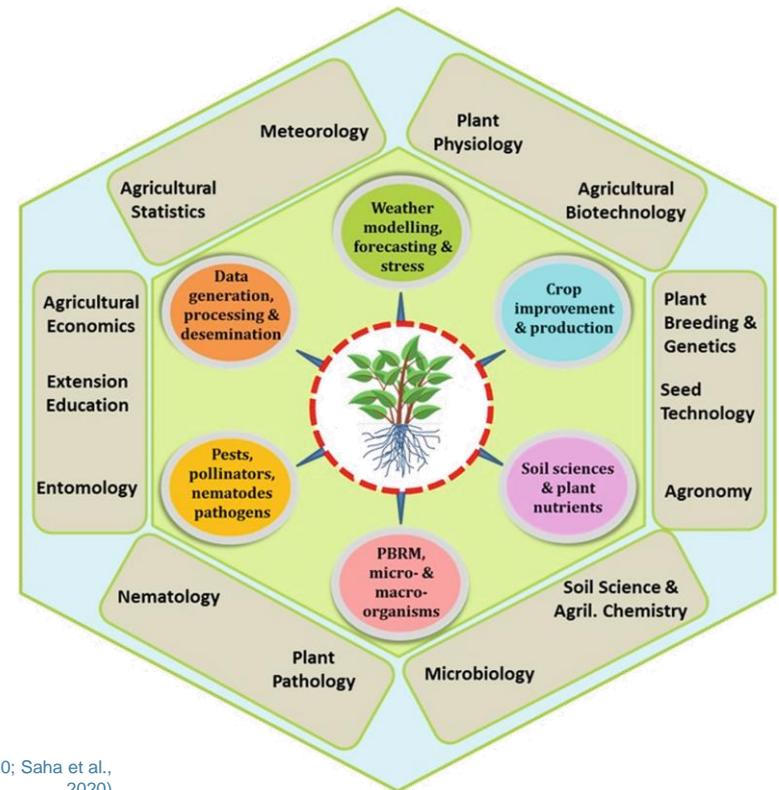
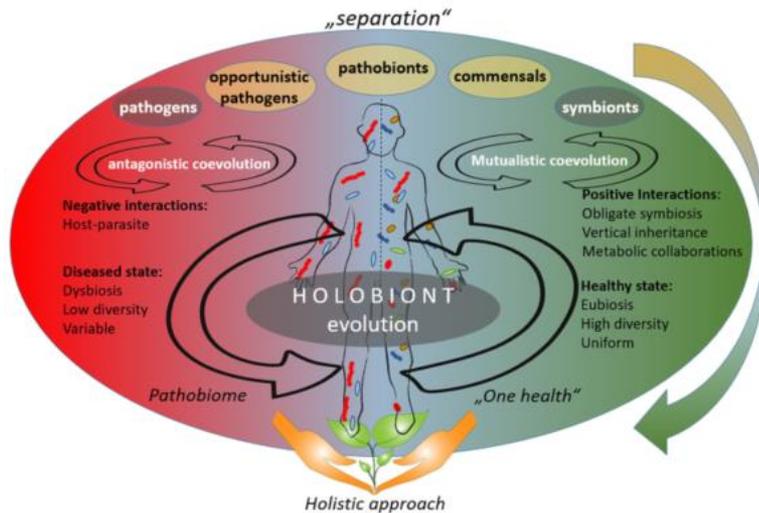
(Torsvik, 1998; Curtis et al., 2002; Lavelle et al., 2006; Decaëns, 2010)

Les microorganismes, moteurs des fonctions du sol



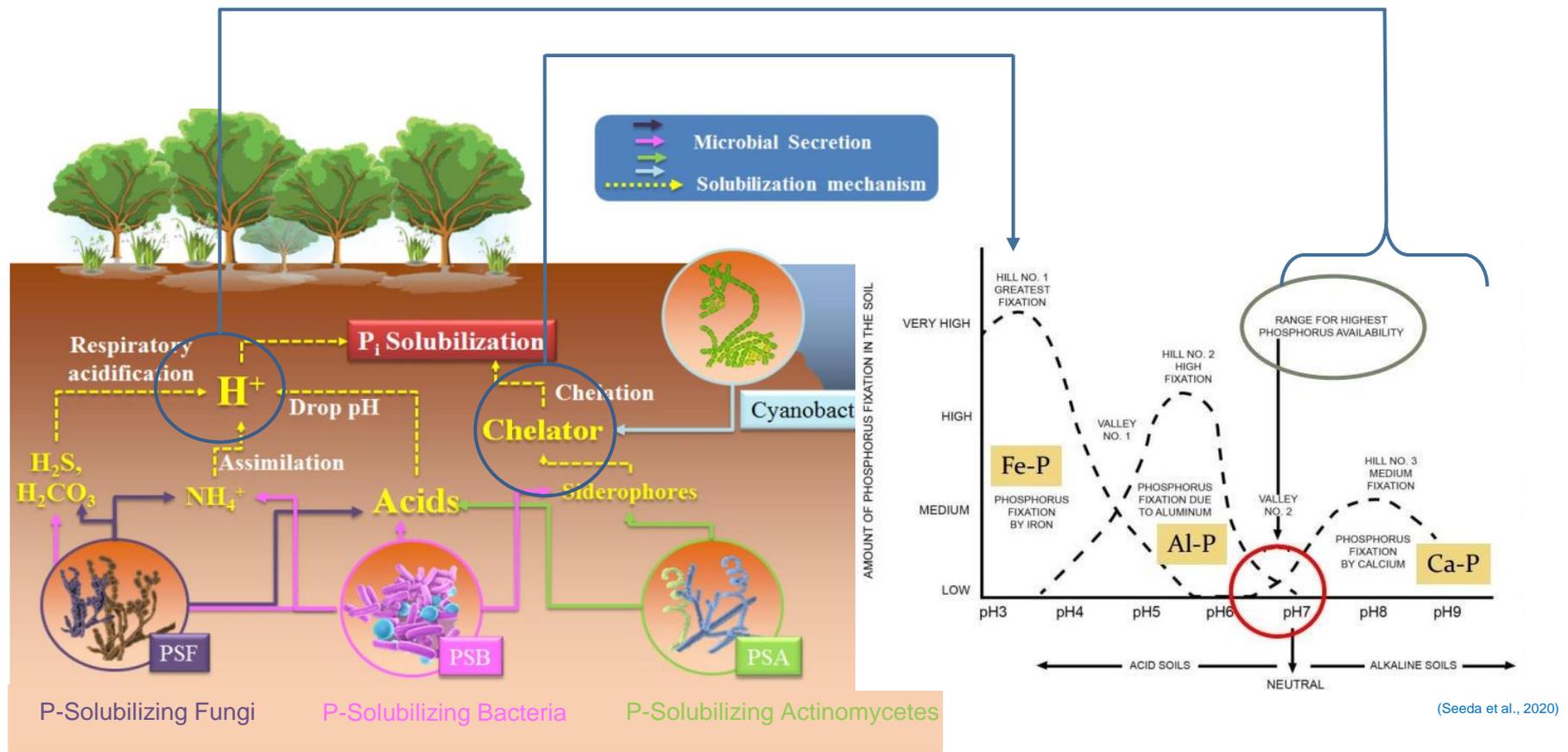
Vers un nouveau concept : L'holobionte

- Concept né dans le domaine de la santé
- Rupture de paradigme
- Prise en compte de l'ensemble plante + microorganismes comme un seul individu
 - Phytobiome



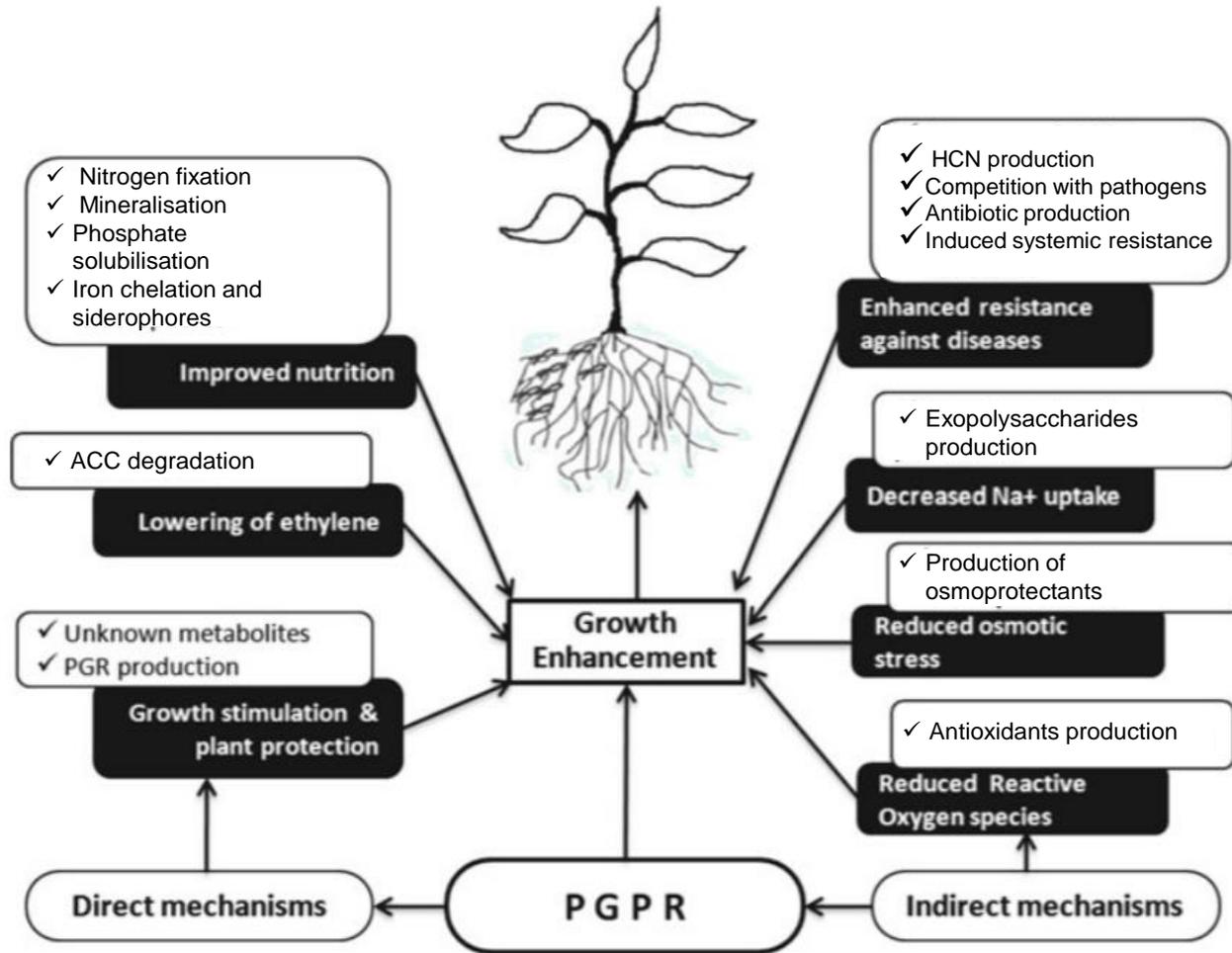
(Berg et al., 2020; Saha et al., 2020)

Les P Solubilizing Microorganisms

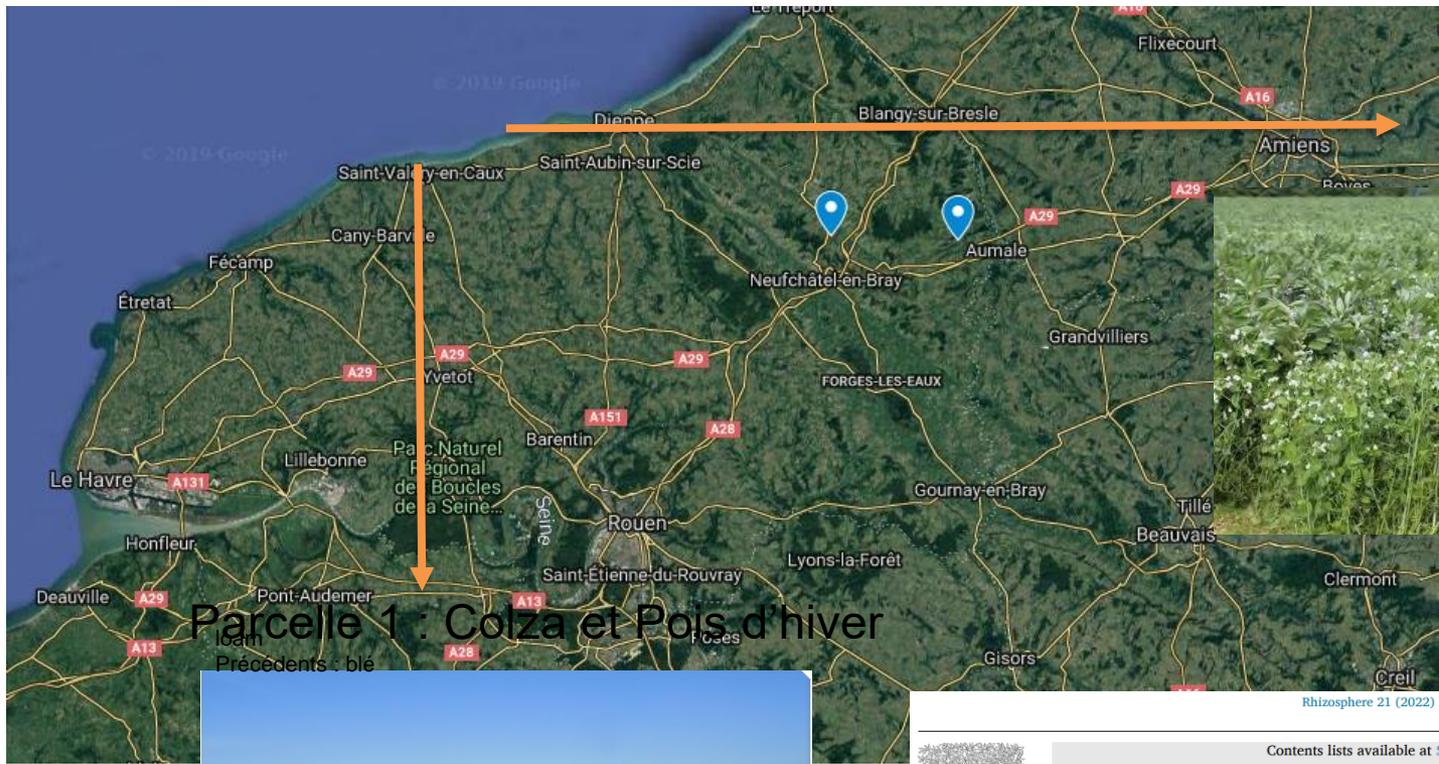


(Adapted from Tian et al., 2021)

Autres traits d'intérêts promouvant la croissance végétale



A la recherche de PSB Normands



Parcelle 2 : Féverole
Limon argileux
Précédents : blé



Parcelle 1 : Colza et Pois d'hiver
Précédents : blé



Rhizosphere 21 (2022) 100476



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Rhizosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rhisph



Are native phosphate solubilizing bacteria a relevant alternative to mineral fertilizations for crops? Part I. when rhizobacteria meet plant P requirements.

Charlotte Amy^{a,b}, Jean-Christophe Avice^a, Karine Laval^b, Mélanie Bressan^{b,*}

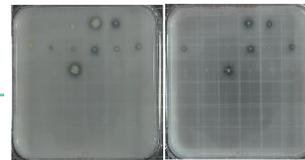
^a UMR INRAE/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), SFR Normandie-Végétal FED 4277, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France
^b UniLaSalle, Unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, SFR Normandie-Végétal FED, 4277, 3 Rue du Tronquet - CS 40118, F-76134, Mont-Saint-Aignan, France



Sols tamisés à 2 mm

Banque de 300 souches bactériennes

Test de solubilisation du P sur deux milieux de criblage



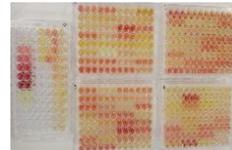
Milieux Pikovskaya et NBRIP

Utilisation du phytate



Phytate Screening Medium

Production d'IAA

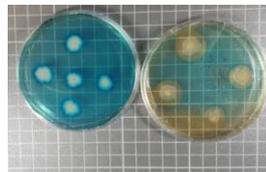


Production d'acide gluconique



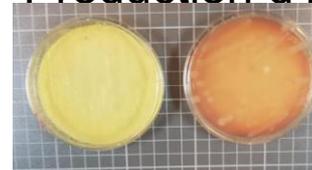
D-Gluconate Assay Kit (SigmaAldrich)

Production de sidérophores



Chrome Azurol S Medium

Production d'HCN



Réactif à l'acide picrique

Activité ACC déaminase



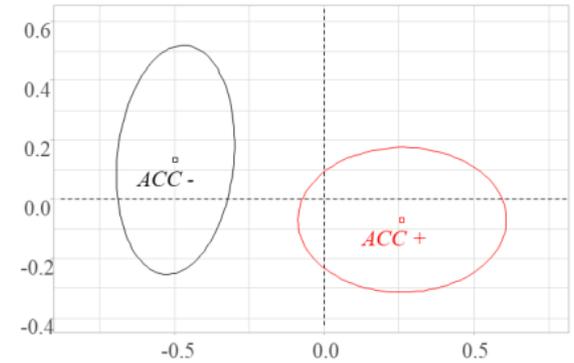
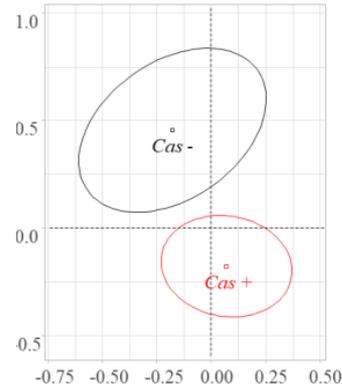
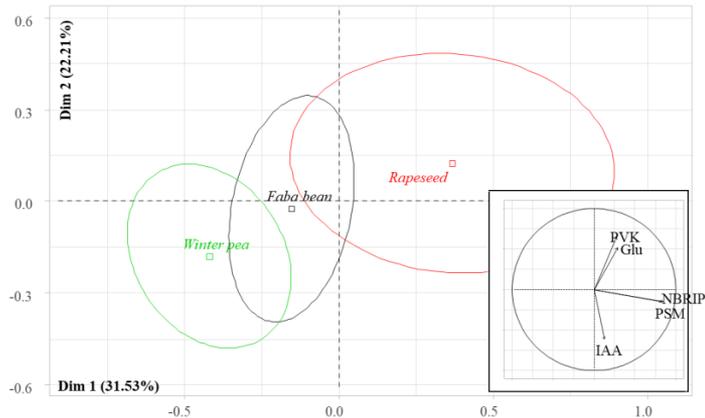
NFb Medium + ACC

L'abondance et la diversité façonnées par le couvert

	Origin of the sampled soil		
	Rapeseed	Winter pea	Faba bean
<i>Pseudomonas sp</i>	28	24	32
<i>Bacillus mycoides</i>	5	3	3
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	7	2	2
<i>Bacillus simplex</i>	11	2	6
<i>Bacillus sp</i>	4	3	2
<i>Paenibacillus</i>	2	3	0
Others	9	1	6
total PSB strains	66	38	51
<i>Pseudomonas</i> proportion	42%	63%	63%
<i>Bacillus</i> proportion	41%	26%	25%
PSB proportion in all isolated bacteria	62.9%	42.7%	48.6%

- *Pseudomonas* et *Bacillus* fréquemment décrits comme souches PGPR et PSB (Ghorbanzadeh et al., 2020 ; Safari et al., 2020; Saxena et al., 2020)
- Proportions similaires de PSB des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* chez les légumineuses (Pois et Féverole).
 - ↓ abondance des *Bacillus* sous Pois (Kumar et al., 2018)
 - *Pseudomonas* et *Bacillus* dans des proportions similaires sous colza
 - ↓ abondance des *Pseudomonas* sous Colza (Gkarmiki et al., 2017)

Des performances et des traits recrutés préférentiellement par le couvert



- PSB isolés sous colza : plus abondants et plus efficaces
 - Exigence plus élevée en P (Bolland et al., 1999)
 - ACC déaminase
- PSB isolés sous les légumineuses :
 - Productrices d'auxine et de sidérophores (Cas +)

- Deux profils de PSB distincts complémentaires des stratégies d'acquisition du phosphore par les plantes:
 - Colza : élongation racinaire, poils absorbants
 - PSB de profil direct : solubilisation forte, diminution locale d'éthylène
 - Légumineuses : acidification locale, activité phosphatase
 - PSB de profil indirect : solubilisation faible, élongation racinaire

(Honvault et al., 2020)

Mise en œuvre des souches PSB

Expérimentation en serre de 10 semaines

Rhizosphere 21 (2022) 100480



Contents lists available at ScienceDirect

Rhizosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rhisph



Are native phosphate-solubilizing bacteria a relevant alternative to mineral fertilizations for crops? Part II: PSB inoculation enables a halving of P input and improves the microbial community in the rapeseed rhizosphere

Charlotte Amy^{a,b}, Jean-Christophe Avice^a, Karine Laval^b, Mélanie Bressan^{b,*}

^a UMR INRAE/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), SFR Normandie-Végétal FED 4277, Université de Caen Normandie, Esplanade de la Paix, F-14032, Caen, France

^b UniLaSalle, unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, SFR Normandie-Végétal FED 4277, 3 Rue du Tronquet - CS 40118, F-76134, Mont-Saint-Aignan, France



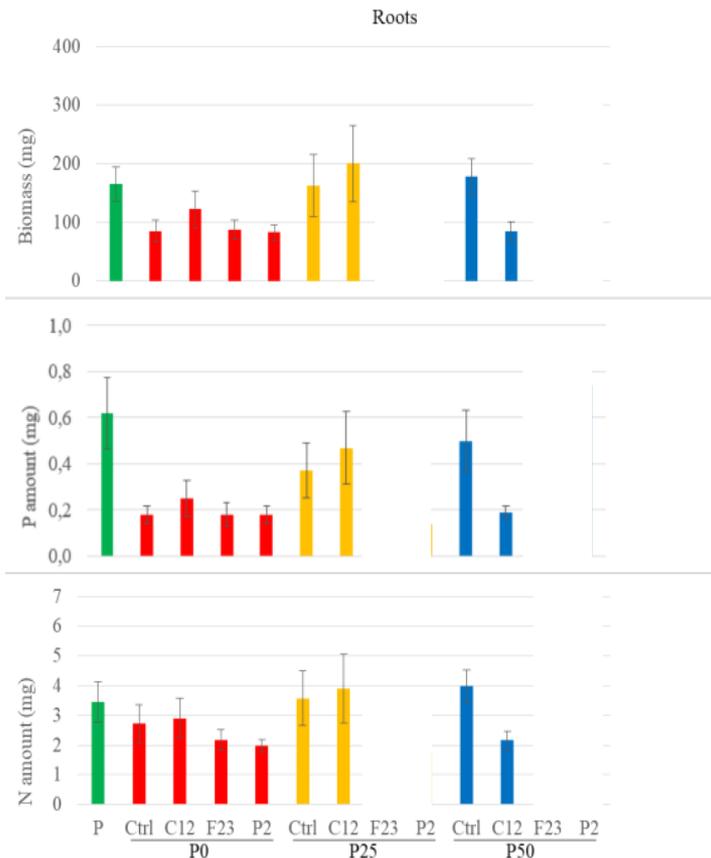
- Sol issu d'une parcelle pauvre en P
 - Argilo-Calcaire superficiel
 - pH : 8,3
 - P Olsen : 26 ppm
- Fertilisation 100% (P100) :
 - N : 373 mg/plante (Ammonitrate 33,5%) équivalent 50 U
 - P : 278 mg/plante (superphosphate) équivalent 50 U



P50	}	Sans PSB
P25		PSB issu du colza (C12)
P0		PSB issu de la féverole (F23)
		PSB issu du pois d'hiver (P2)



Application de PSB dans un gradient de fertilisation : des effets contrastés sur la plante



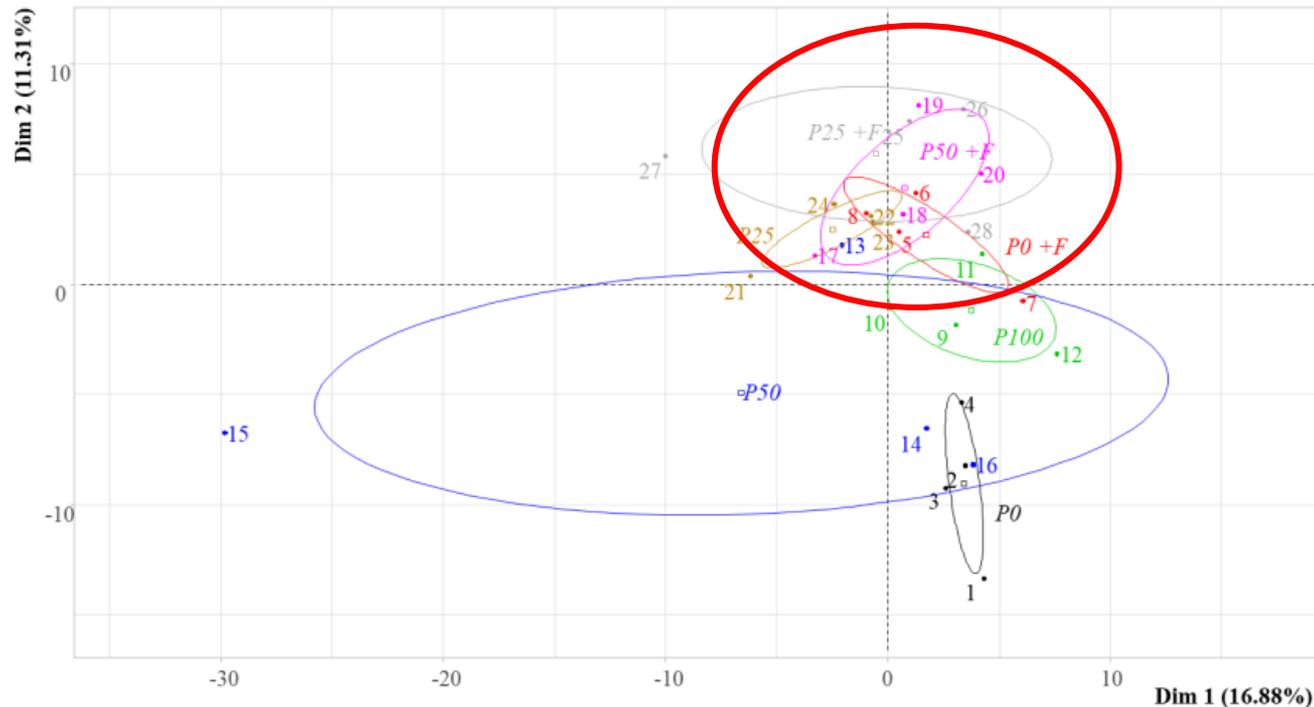
- C12 : pas d'effets à P25, effets négatifs à P50
 - L'origine rhizosphérique seule d'un PSB (*in vitro*) ne garantit pas le succès lors de sa réintroduction chez le colza
 - À P50, sol caractérisé par une plus grande teneur en P Olsen
- F23 et P2 : Augmentation de la biomasse racinaire, de la quantité de N et P à P50
 - Sols caractérisés par une augmentation de la teneur en CaCO₃ libre
 - Pas de modification du P Olsen
- Effet délétère de P2 lorsque la fertilisation P est insuffisante (P25) :
 - Nécessité d'une fertilisation minimale pour établir une relation plante-bioinquant avantageuse (Morcillo et al., 2020)

Résultats des tests *in vitro*

Strain designation	Pikovskaya medium					NBRIP					Phytates	Siderophore production	HCN production	IAA production (ng/μL)	ACC deaminase activity
	SI	solubilized P (μg/mL)	medium pH	Gluconic acid production (μmol/mL)		SI	solubilized P (μg/mL)	medium pH	Gluconic acid production (μmol/mL)	SI					
C12	2.3	197.5 ± 1.5	4.3 ± 0.1	0.0 ± 0.2		2.5	104.5 ± 0.6	3.7 ± 0.1	17.2 ± 1.6		2.3	+	+	10.6 ± 1.1	+
F23	2.3	152.1 ± 0.9	6.7 ± 0.1	11.0 ± 0.7		1.4	49.3 ± 2.1	3.8 ± 0.2	8.3 ± 0.1		3.5	+	-	18.8 ± 3.7	+
P2	1.3	207.3 ± 5.2	4.3 ± 0.0	6.4 ± 0.4		2.1	55.8 ± 0.3	4.1 ± 0.1	5.4 ± 0.8		2.5	+	-	33.7 ± 3.4	-

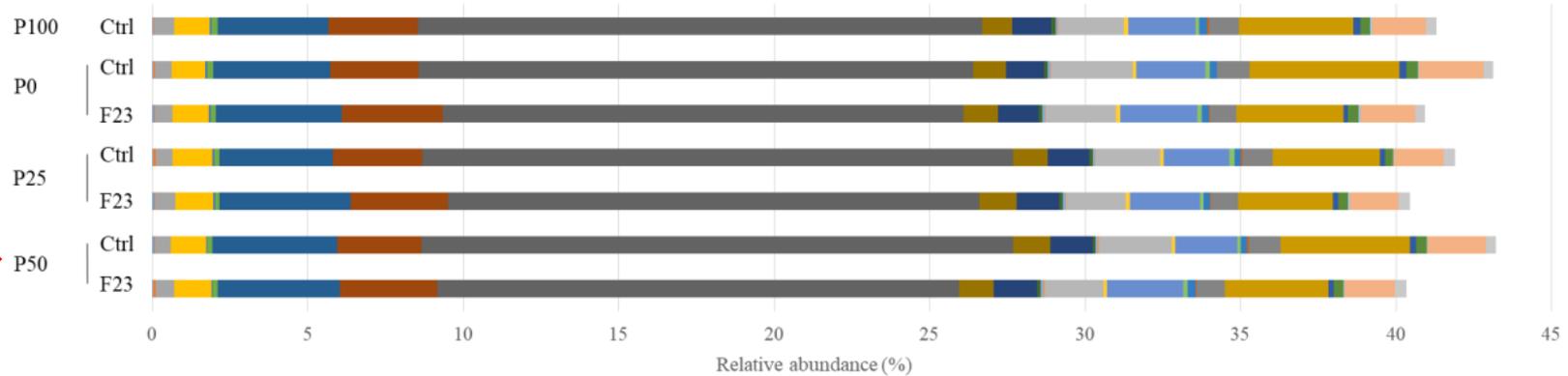
- C12 présentait les meilleures performances en plus d'être originaire d'un sol sous couvert colza
- F23 : quantités de P solubilisé les plus faibles sur milieux Pikovskaya et NBRIP
- P2 montre des résultats contrastés en fonction du milieu dans lequel la solubilisation est testée

L'application de F23 dans un gradient de fertilisation module la structure des communautés bactériennes



- Peu d'impact sur les communautés fongiques
 - Communauté fortement impactée par la présence des glucosinolates (Bressan et al., 2009)
- L'application de F23 modifie les communautés bactériennes vers une structure commune
 - Effet sur la plante uniquement à P50
 - Fertilisation minimale requise à l'expression de fonctions d'intérêts

L'application de F23 à P50 : shift des communautés bactériennes vers une spécialisation nutrition



- | | | | |
|--|-----------------------|------------------|---------------------|
| ■ Allocatelliglobospora | ■ Angiococcus | ■ Bradyrhizobium | ■ Conexibacter |
| ■ Dokdonella | ■ Ferruginibacter | ■ Gemmatimonas | ■ Gp16 |
| ■ Gp6 | ■ Gp7 | ■ Ilumatobacter | ■ Inhella |
| ■ Kitasatospora | ■ Labilithrix | ■ Lysobacter | ■ Methyloversatilis |
| ■ Nocardioides | ■ Pleomorphobacterium | ■ Ramlibacter | ■ Sorangium |
| ■ Spartobacteria genera incertae sedis | ■ Sphingomonas | ■ Sphingosinella | ■ Tepidisphaera |
| ■ Thermodesulforhabdus | ■ Thermomonas | ■ Thiobacillus | |

Biocontrôle

Croissance racinaire

Résistance stress osmotique

Résistance stress osmotique

PGPR

Bioremédiation (cadmium)

Production de sulfate

Fixation du diazote

Les PSB expriment-ils des traits de solubilisation du P complexé dans l'environnement racinaire du colza ?

- L'application de F23 n'a pas augmenté la teneur en P Olsen mais la concentration en CaCO_3
 - Liée à une solubilisation du pool de Ca-P ?



L'inoculation d'un PSB améliore-t-elle réellement les conditions de croissance du colza ?

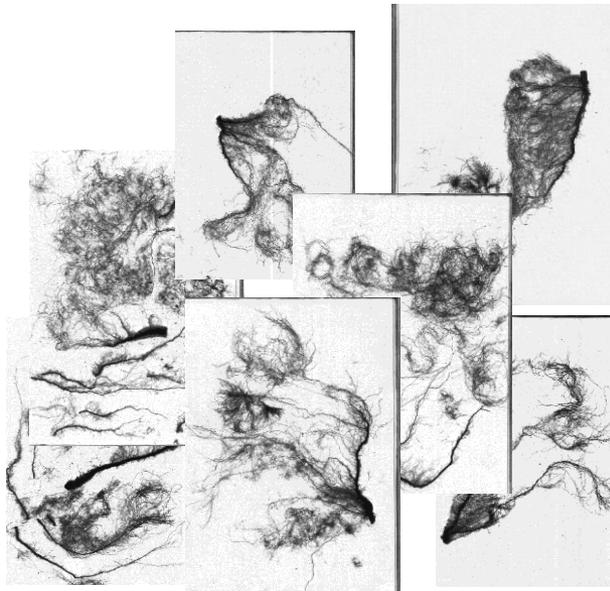
- L'application de F23 a permis une diminution de 50 % de la fertilisation P tout en maintenant le développement du colza
- Complexité de démêler les effets PGPR ou PSB des souches apportées

Quels sont les effets de F23 seule sur les paramètres élémentaires et morphométriques du colza ?

Comment démêler les effets PSB et PGPR ?

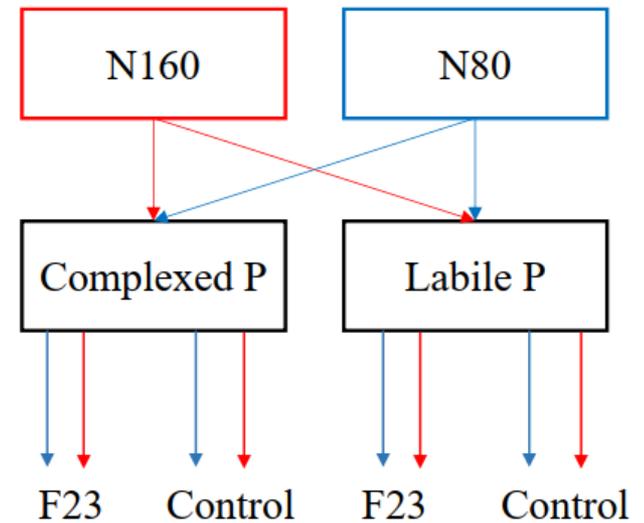
Culture de 10 semaines en rhizotrons

- Sable autoclavé
- 2 niveaux de fertilisation N (Axe 1 : N+ et N-)
- P apporté sous forme labile ou complexée



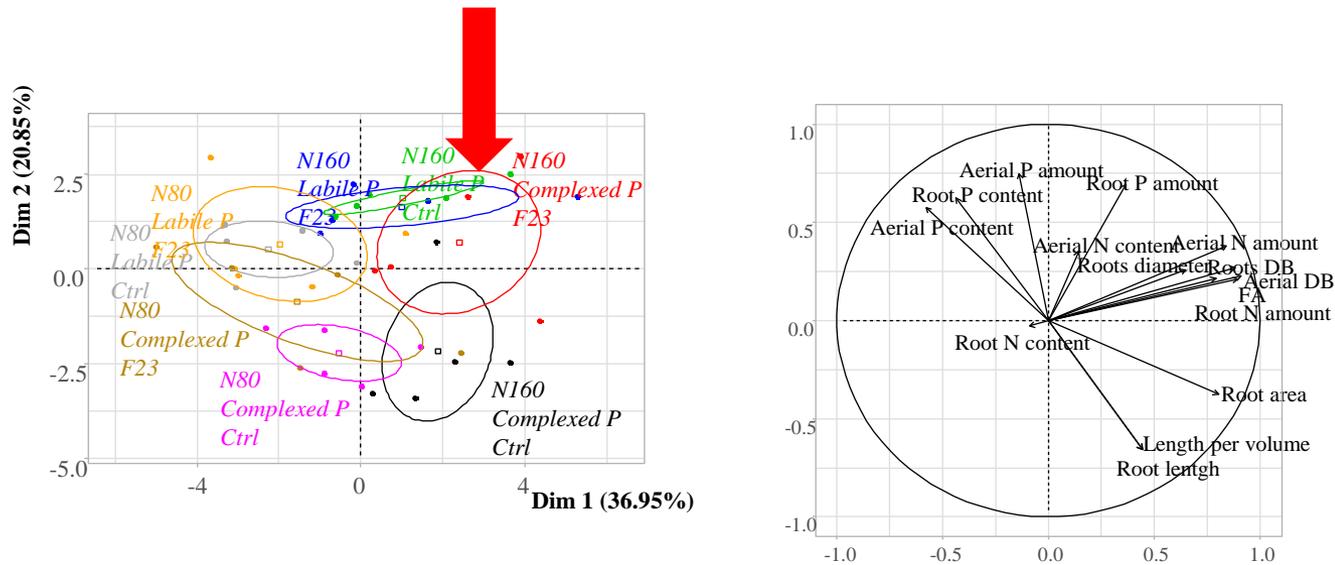
Récolte finale

- Biomasse sèche
- Teneur en N et P
- Etude de traits racinaires
 - Longueur
 - Diamètre moyen
 - Volume



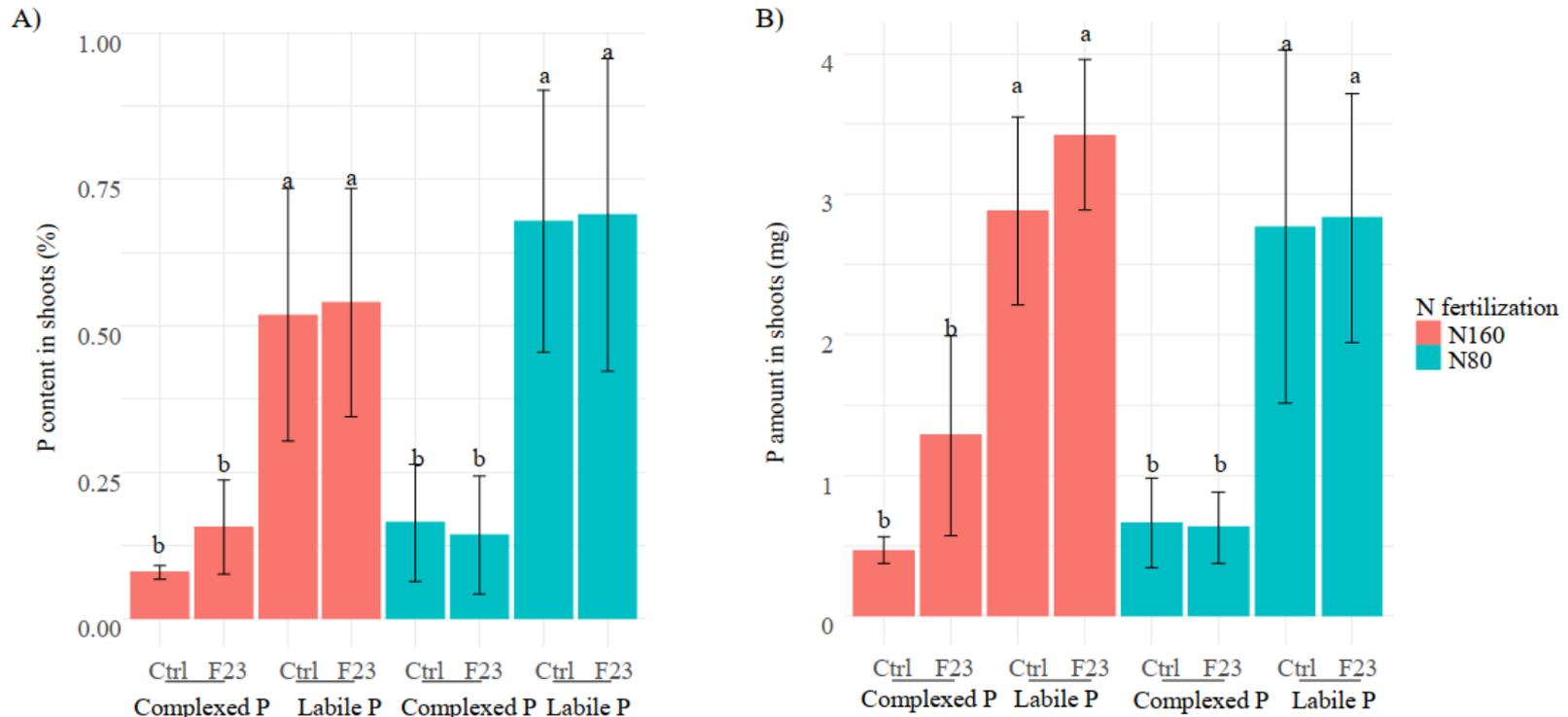
P complexé

- 10% KH_2PO_4
- 2% phytate
- 55% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 23 % Fe-P
- 10% Al-P



- Modalités P labile : teneurs et quantités de P plus élevées
- Pour N 160, P complexé avec F23 : regroupé avec les profils de plantes fertilisés avec une source de P labile
- Confirmation du potentiel intrinsèque de la souche F23 sur la croissance du colza en lien avec la disponibilité en P
 - Confirmation de l'effet PSB de F23
- Effet N semble moduler les effets de la souche

Des effets de F23 visibles seulement en conditions N élevées

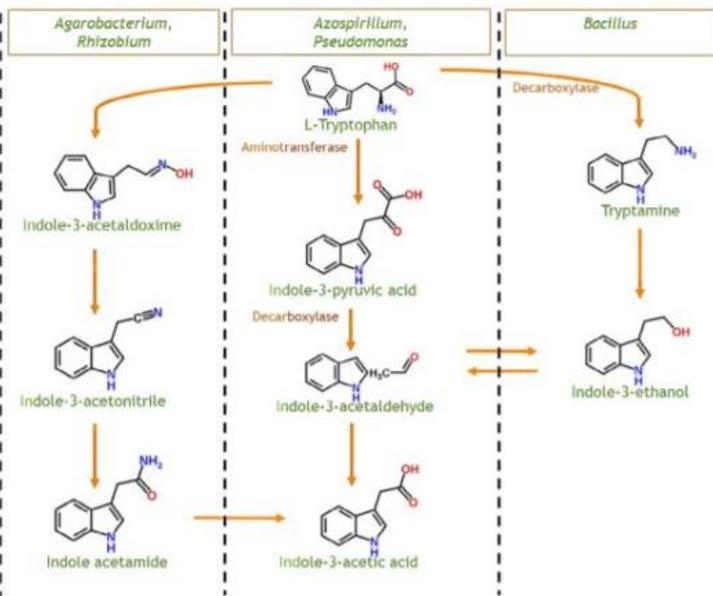


- L'application de la souche tend à améliorer la teneur et la quantité de P dans les parties aériennes à N160
 - La plante a accès à une plus grande quantité de P
 - Effet PSB avéré
 - Pas d'effet à N80

- La colonisation de la rhizosphère est un pré-requis à l'expression de traits d'intérêts et à l'existence d'un réel bénéfice apporté à la croissance végétale (Dutta and Podile, 2010)
- Une carence en N dans le milieu peut restreindre la croissance microbienne (Aldén et al., 2001; Kamble and Bååth, 2016)
 - Absence de colonisation racinaire ?
 - Développement insuffisant pour un effet visible sur la plante ?

- Défaut de coopération plante-microorganismes

- N assimilé sous forme d'acides aminés (Masclaux-Daubresse et al., 2010)
- Exsudés au niveau racinaire (Badri and Vivanco, 2009), impliqués dans la synthèse de nombreuses molécules utilisées par des PGPR
 - Tryptophane → IAA (Spaepen et al., 2007)
 - Peptides → Pyoverdine (sidérophore) faisant intervenir 11 protéines différentes (Gasser et al., 2015)
 - Méthionine → SAM → ACC (Glick et al., 2007)





- Confirmation en conditions non contrôlées :
 - De l'efficacité de la souche F23 sur la croissance et le statut nutritionnel du colza
 - Cycle de culture complet
 - Couplé à des analyses de séquençage métagénomique (communautés totales / actives)
 - Besoin de nouvelles connaissances sur les interactions plantes-microorganismes et l'exsudation racinaire

Merci pour votre attention

