Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Optimiser la nutrition azotée et phosphorée du colza pour une production durable via l'utilisation de biointrants améliorant le fonctionnement du phytobiome

Présentée et soutenue par
CHARLOTTE AMY

Thèse soutenue le 17/12/2021 devant le jury composé de		
M. ALAIN MOLLIER	Chercheur HDR, Université de Bordeaux	Rapporteur du jury
M. CLAUDE PLASSARD	Directeur de recherche, Université de Montpellier	Rapporteur du jury
M. STEPHANE UROZ	Directeur de recherche, Université de Lorraine	Membre du jury
MME MARIE-PASCALE PRUD'HOMME	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Président du jury
M. JEAN-CHRISTOPHE AVICE	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse
MME KARINE LAVAL	Directeur de recherche, UniLaSalle	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par JEAN-CHRISTOPHE AVICE et KARINE LAVAL, Écophysiologie végétale, agronomie et nutritions N.C.S. (Caen)

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

UniLaSalle Terre & Sciences

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

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

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de Doctorat

Spécialité Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-alimentaires

Préparée au sein de UMR INRAe-UCN 950 EVA Écophysiologie Végétale Agronomie et nutritions N,C,S de l'Université de Caen Normandie et l'unité AGHYLE d'UniLasalle Rouen

Optimiser la nutrition azotée et phosphorée du colza pour une production durable via l'utilisation de biointrants améliorant le fonctionnement du phytobiome

Présentée et soutenue par
Charlotte AMY

Thèse soutenue le 17/12/2021 devant le jury composé de		
M. Alain MOLLIER	Chargé de Recherche HDR / UMR INRAe ISPA – Centre de Bordeaux Aquitaine	Rapporteur
Mme Claude PLASSARD	Directrice de Recherche / UMR INRAe Eco&Sols Campus SupAgro Montpellier	Rapporteure
M. Stéphane UROZ	Directeur de Recherche / UMR INRAe IAM Centre de Nancy Grand-Est	Examinateur
Mme Marie-Pascale PRUD'HOMME	Professeur des Universités / UMR INRAe Université de Caen Normandie EVA	Examinatrice
M. Jean-Christophe AVICE	Professeur des Universités / UMR INRAe Université de Caen Normandie EVA	Directeur de thèse
Mme Karine LAVAL	Directrice de Recherche / Unité Aghyle, UniLaSalle Campus de Rouen	Directrice de thèse
Mme Mélanie BRESSAN	Chargée de Recherche / Unité Aghyle, UniLaSalle campus de Rouen	Encadrante / Membre invité

Thèse co-dirigée par le Professeur Jean-Christophe AVICE (UMR INRAe-UCN 950 EVA Écophysiologie Végétale Agronomie et nutritions NCS), Dr. Karine LAVAL (Unité AGHYLE, UniLaSalle Rouen) et encadrée par Dr. Mélanie BRESSAN (Unité AGHYLE, UniLaSalle Rouen).

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE — UniLaSalle Terre & Sciences — EdNBISE École doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement — Aghyle UP 2018.C101 UniLaSalle — EVA Écophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions N,C,S

Remerciements

En premier lieu je tiens à remercier Marie-Pascale Prud'Homme et Philippe Laîné, directrice et directeur adjoint de l'UMR 950 UCN / INRAe EVA, ainsi que Philippe Choquet, directeur d'UniLaSalle, Marie Lummerzheim, directrice d'UniLaSalle Campus Rouen et Isabelle Trinsoutrot-Gattin, directrice de l'Unité Aghyle de m'avoir accueillie au sein de ces deux laboratoires pendant ces quatre années mouvementées.

Marie-Pascale, merci pour ta gentillesse, ton écoute et tes bons conseils dans les bons moments de la thèse comme dans les moins bons. Philippe, merci pour ton soutien et d'avoir toujours su trouver les solutions pour faciliter ma vie de doctorante. Isabelle, merci pour ta confiance, ton soutien et tes conseils avisés qui m'ont fait progresser dans ma réflexion.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury de thèse. Je suis très honorée que Mme Claude Plassard et M. Alain Mollier aient accepté d'être rapporteurs de ce travail, je vous en remercie chaleureusement. Merci également à M. Stéphane Uroz et Marie-Pascale Prud'Homme d'avoir accepté d'en être examinateurs.

Bien évidemment je remercie plus que vivement mon directeur de thèse Jean-Christophe Avice. Merci pour tout, pour ton engagement, tes conseils, les corrections jusqu'à pas d'heure, et surtout ta patience face à mes questions de néophyte (« nouvelle plante », on ne pouvait pas trouver de terme plus adapté). Je remercie également ma co-directrice Karine Laval, merci à toi Karine, pour ton soutien, les discussions qui m'ont permis de progresser scientifiquement, des trouver autant de réponses que de nouvelles question et de nouvelles voies à explorer. Enfin, merci infiniment à Mélanie Bressan, mon encadrante, pour ton soutien sans faille. Merci d'avoir aidé et fait grandir (un peu) le petit bébé chercheur que j'étais. Même si je ne suis pas encore une grande, j'ai quand même beaucoup appris grâce à toi (et c'est pas fini !). Je pense que je ne pouvais pas trouver mieux comme équipe d'encadrement.

Je remercie mon équipe de Comité de Suivi Individuel, Michaël Aubert, Céline Richard-Molard, Laurent Philippot et Pierre-Louis Lucas. Merci pour votre soutien, vos conseils et votre écoute pendant ces quatre années. Merci pour vos encouragements dans les moments compliqués, vos conseils toujours avisés qui m'ont remis sur les rails bien souvent. Je suis toujours ressortie de nos réunions plein de confiance et de motivation.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes que j'ai croisées que ça soit à Caen ou à Rouen au cours de ces quatre années.

Dans la team Caen, je remercie particulièrement Emmanuelle Personeni pour toute son aide et toutes les réponses apportées à mes questions sur les racines du colza ! Jean-Bernard Cliquet et Aurélia Lornac pour toute leur aide avec l'HPLC mais aussi pour les moments de rigolade au quotidien, et les discussions musique. Merci également à Sophie Brunel-Muguet d'avoir toujours trouvé un peu de temps pour échanger, que ça soit de colza ou d'autres choses.

Je remercie très vivement l'équipe technique pour leur aide, parfois (souvent) en dernière minute, merci Josiane, Magali, Julie, Bénédicte et Olivier. Merci à l'équipe Platin : Sylvain, Fanny, Jéhane, Quentin et Josette et Frédérine, pour avoir toujours fait leur maximum pour l'analyse de mes échantillons malgré le planning bien chargé !

Un remerciement tout particulier pour Anne-Françoise. Merci d'avoir été la maman de substitution de mes cultures, merci de m'avoir tant appris, et merci pour ta gentillesse et tout le soin que tu apportes à ton travail.

Merci Sophie pour la gestion de dernière minute de l'administratif ! Et merci pour ta bienveillance.

Je remercie aussi toutes les personnes qui (entre autres) ont toujours trouvé un peu de temps dans leur emploi du temps de chercheur pour m'aider dans mes récoltes, et à qui j'ai souvent lâchement laissé le travail ingrat du lavage des racines : merci à Jacques et Jean-François. Merci à Frédéric, Nathalie, Lucie, Servane, Annette, Philippe Etienne, Emmanuelle Travaillé, Julien, Philippe d'Hooghe pour leur gentillesse et leur soutien.

Merci à tous mes voisins de bureau, dont certains sont partis (mais revenus, que dalle est venu – comprenne qui pourra la référence) depuis un moment déjà. Merci à Galatéa et Antoine, pour faire original je vous souhaite tout le bonheur du monde. Merci à Mohammed, Aurélien, Victor, Hans, Lethicia, Hanh, Jérémy, Maxence, Cylia et Emilie pour tous ces moments, même si je regrette de ne pas avoir pu être plus présente.

Merci Raphaël pour toute ton aide au cours de tes deux stages, merci d'avoir embarqué avec moi dans la tempête. Tu as raison, on s'en est sortis !

Au tour de la team Rouen ! Je remercie en premier lieu Wassila, merci pour ta confiance pendant mes stages de L3 et M2. Merci de m'avoir tant appris, de m'avoir permis de confirmer mon choix de travailler dans la recherche. Merci pour ta bonne humeur et ton enthousiasme !

Merci Pierre-Yves pour ton aide précieuse et pour avoir pris le temps de répondre à mes questions. Adrien, merci pour ta gentillesse, et pour tes précieux conseils. Merci également Coline pour ton aide avec les données métagénomiques et R.

Je remercie également chaleureusement Marie-Pierre, Nadia, Babacar, Guillemette et Marc pour leurs remarques judicieuses qui ont indubitablement fait progresser ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe technique, Caroline, Lisa, Anne et Maëva. Merci pour votre aide, tant pour les manips, les cultures en serre que pour les bons moments, les conseils pour maman débutante et bien sûr comment choisir le meilleur porte-bébé !

Merci aux anciens et nouveaux doctorants. Pauline et Cyrine, merci pour votre aide, merci pour les discussions autour d'un café à refaire le monde. Je vous souhaite tout ce qu'on peut vous souhaiter pour la suite. Merci à Angel pour les échanges sur la méthodo phosphore, je te souhaite un bon courage pour la suite de ta thèse, pas facile quand on est loin de chez soi ! Bon courage aussi à Anouk, bienvenue parmi les thésards !

Merci aussi aux « voisins d’en face », merci à JB, Feriel, Marianne et Hafida pour les bons moments et à Théo et Mathilde qui partagent mon bureau pour leurs conseils et leur vécu de la thèse.

Enfin j’adresse toute mon affection à ma famille. Je remercie mes parents pour tout leur soutien. Merci pour les valeurs que vous m’avez transmises, le goût d’aller chercher les réponses par moi-même et d’aller au bout des choses. Cette thèse, c’est aussi votre réussite. Merci pour tout votre soutien inconditionnel, quels que soient mes choix et mes doutes.

Je remercie mes frères, Gaël, Thomas et Xavier sans oublier mes belles-sœurs Nadège, Sandrine et Estelle, pour les parenthèses (ou arrêts aux ravitos) dans ce marathon. Merci à tous mes neveux et nièces, Baptiste, Hanaé, Louna, Lou-Anne et Gabriel pour tous les moments de tendresse et d’insouciance.

Anthony, merci pour ta patience pendant ces quatre années. Merci pour ton soutien dans les rushs, et pour tous ces beaux moments au quotidien. Enfin, Faustine, mon tout petit cœur (mon petit bébé thèse compatible ahah) merci à toi pour tout ce bonheur, pour les païoupillons. Loin d’être un obstacle, même parfois dans les moments difficiles, ta présence a aussi été une motivation supplémentaire dans l’accomplissement de ce travail.

Sommaire :

Liste des abréviations i
Liste des figures ii
Liste des tableaux vi

Chapitre I : Introduction générale 1

Chapitre II : Synthèse bibliographique 7

A. Le colza, une oléoprotéagineuse exigeante 8

A-1 Domestication et historique. 8
A-2 La culture du colza et ses débouchés 9
A-3 La nutrition azotée du colza 10
A4 La nutrition phosphatée du colza 13
A-5 Des indices agronomiques pour monitorer les performances du colza 16

B. La rhizosphère, une interface d'acquisition des nutriments pour le colza et les microorganismes des sols 18

B1 Comment définir la rhizosphère 18
B-2 Mécanismes de recrutement des microorganismes rhizosphériques 19
B-3 Les fonctions du microbiome racinaire et rhizosphérique 21
B-4 Les PSB : des microorganismes à haut potentiel 23

C. Intégrer les processus écologiques au sein des systèmes de culture pour une agriculture intégrée et durable 26

C-1 Cultiver l'holobionte 26
C-2 L'importance des chaines trophiques pour une meilleure efficience globale des nutriments. 27

Chapitre III : Projet de recherche 28

A. Projet de recherche : Objectif 29

B. Démarches expérimentales 30

B-1 Optimisation des ratios de fertilisation N :P du colza et impacts sur le rendement et la qualité des graines récoltées 30
B-2 Isoler et caractériser des PSB issus de sols Normands de grandes cultures sous des couverts végétaux ayant des préférences nutritionnelles variées 30
B-3 Etude de l'effet de trois souches PSB provenant de sols prélevés sous trois couverts de grandes cultures différents, inoculées sur les plantules de colza et soumises à un gradient de fertilisation P 30
B-4 Etude de l'effet d'une souche présentant des caractéristiques PSB et PGPR sur la croissance et le statut N et P du colza ainsi que sur ses traits racinaires, en conditions axéniques et soumises à deux ratios de fertilisation N : P. 31

Chapitre IV : Résultats 32

A. Optimisation des ratios de fertilisation N : P du colza et impacts sur le rendement et la qualité des graines récoltées 33

B. Isoler et caractériser des PSB issus de sols Normands de grandes cultures sous des couverts végétaux de préférences nutritionnelles variées. 56

C. Evaluer le potentiel de réintroduction dans l'environnement rhizosphérique du colza de trois souches PSB, et l'efficience in planta de leurs traits PSB et PGPR 82

C-1 *Etude de l'effet de trois souches PSB provenant de sols prélevés sous trois couverts de grandes cultures différents, inoculées sur les plantules de colza et soumises à un gradient de fertilisation P* 82

C-2 *Etude de l'effet d'une souche présentant des caractéristiques PSB et PGPR sur la croissance et la composition élémentaire N et P du colza ainsi que sur ses traits racinaires, en conditions axéniques et soumises à deux ratios de fertilisation N : P.* 121

Chapitre V : Discussion générale et perspectives 144

A. Impacts de la fertilisation N et P sur les composantes du rendement et la qualité grainière du colza 146

B. Impact du ratio de fertilisation N :P sur l'efficience d'usage du N et du P, les relations plantes-microorganismes et l'expression de traits PGPR d'intérêts 149

B-1 *Impact du ratio de fertilisation N : P sur les phénotypes individuels de la plante* 150

B-2 *Impact du ratio de fertilisation N : P sur la coopération du colza et de la souche PSM F23* 153

B-3 *Impact du ratio de fertilisation N : P sur le fonctionnement de l'holobionte constitué de l'association entre le colza et les communautés rhizosphériques sous l'influence de l'inoculation de la souche PSB F23* 157

B-4 *Conclusion intermédiaire* 160

C. Le pilotage de la culture de colza par ingénierie écologique : de la souche à la graine 162

C-1 *Impacts de l'exigence en P sur la sélection de PSM de profils distincts* 162

C-2 *Prise en compte du métabolisme global des souches PSM : une nouvelle piste pour un screening de souches plus efficientes ?* 163

D. Conclusion générale : comment modeler les sols et conditionner un état souhaitable favorable à la croissance du colza ? 167

Références bibliographiques 169

Liste des abréviations

		A
ACC	:	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
		C
CIPAN	:	Culture Intermédiaire Piège à Nitrate
		G
GOGATS	:	Glutamine OxoGlutarate Amino Transferase
GS	:	Glutamine Synthétase
		H
HATS	:	High Affinity Transport System
HCN	:	Cyanure d'hydrogène
HI	:	Indice de récolte
		I
IAA	:	Indole 3-Acetic Acid, auxine
InsP	:	Inositol-Phosphate
		L
LATS	:	Low Affinity Transport System
		M
MAMPs	:	Microbial-Associated Molecular Patterns
		N
N	:	azote
N_2O	:	Oxyde nitreux
NAE	:	Efficience d'absorption du N
NHI	:	Indice de récolte du N
NiR	:	Nitrite Réductase
NO	:	Oxyde nitrique
NO_3	:	Nitrate
NR	:	Nitrate Réductase
NSR	:	N starvation Response
NUE	:	efficience d'usage du N
NUtE	:	Efficience d'Utilisation du N
		P
P	:	Phosphore
PAE	:	Efficience d'absorption du P
PGPR	:	Plant-Growth Promoting Rhizobacteria
PHI	:	Indice de récolte du P
PMG	:	Poids de Mille Grains
PO_4^{2-}	:	Phosphate
PREPARAD	:	Plant-REsembling Plant-Associated and Root-Associated Domains
PSR	:	P Starvation response
Ptotal	:	Phosphore total
PUE	:	efficience d'usage du P
PUtE	:	Efficience d'Utilisation du P
		R
ROS	:	Reactive Oxygen Species

Liste des figures :

Figure 1 : Population mondiale depuis 1950 et estimations de 2017 à l'horizon 2100.

Figure 2 : Evolution de la production de viande au niveau mondial de 1961 à 2011.

Figure 3 : Production des différentes formes d'engrais azotés à partir du procédé Haber-Bosch.

Figure 4 : Contribution du procédé Haber-Bosch à l'accroissement de la population mondiale

Figure 5 : Sources et coûts d'engrais phosphatés depuis le début du 19ème siècle.

Figure 6 : Etats de fixation des ions phosphates et disponibilité relatives dans la solution de sol en fonction du pH.

Figure 7 : Les services écosystémiques tels que définis par le MAE. Les services écosystémiques sont les bénéfices que tirent les populations humaines des fonctionnements des écosystèmes.

Figure 8 : Organisation du projet Agroécologique pour la France.

Figure 9 : Composition des graines de colza et débouchés industriels.

Figure 10 : Place du colza dans le triangle de U, décrivant les relations génétiques entre plusieurs espèces de Brassicacées. Parmi les espèces diploïdes : le chou (*B. oleracea*), la navette (*B. rapa*) et la moutarde noire (*B. nigra*). Parmi les espèces allotétraploïdes résultant d'hybridations : le colza (*B. napus*), la moutarde brune (*B. juncea*) et la moutarde d'Abyssinie (*B. carinata*). A, B et C représentent les différents génomes.

Figure 11 : Croissance et stades phénologiques du colza.

Figure 12 : Débouchés en fonction de la qualité des graines.

Figure 13 **:** Schéma simplifié du métabolisme N dans une feuille jeune (A) et une feuille en cours de sénescence (B). En rouge : les enzymes impliquées dans les processus d'incorporation et de transformation du N. AS : Asparagine Synthase, ASN : Asparagine, CPSase : CarbamoylPhosphate Synthétase, GDH : Glutamate Déshydrogénase, GLN : glutamine, GLU Glutamate, SAV : «senescence-associated vacuole».

Figure 14 : Dynamiques de l'absorption, de la remobilisation du N chez le colza et apports de N au sol au cours du cycle de culture. Les flèches en bleu représentent l'absorption de N, et les flèches noires représentent les pertes de N, proportionnellement à leur épaisseur. Les chiffres représentent les stades critiques déterminant l'établissement de la NUE finale : (1) NAE avant floraison, (2) NAE post-floraison, (3) efficience des remobilisations liées à la sénescence séquentielle et monocarpique, (4) interactions entre NUE et les surfaces présentant une activité photosynthétique (feuilles et siliques).

Figure 15 : Flux d'azote chez le colza (cv. Capitol) avant (A) et après (B) floraison. Les flux sont exprimés en mg de N par organe. Les flèches grises à gauche des plantes indiquent les flux de remobilisation et les flèches noires à droite des plantes indiquent les flux de N provenant de l'absorption.

Figure 16 : Les trois phases de la sénescence foliaire.

Figure 17 : Mécanismes de régulation de la P Starvation Response en conditions de nutrition P suffisantes (A) et en situation de carence en P (B). InsPS : inositol-P à différents degrés de saturation, interagissant avec des protéines à domaine SPX, se liant au facteur de transcription PHR1 permettant l'expression des gènes de la PSR. PLT : transporteurs de P de faible affinité, PHT1 : transporteurs de P de haute affinité, PHO1 et 2 : exporteurs de Pi.

Figure 18 : Vue d'ensemble des adaptations métaboliques des plantes pour améliorer l'acquisition du P à partir de sols déficients pour cet élément, et augmenter la PUE

Figure 19: Processus métaboliques d'adaptation aux carences en P. (A) réactions alternatives à la glycolyse, (B) accumulation d'anthocyanes dans les feuilles, (C) exsudation d'acides organiques, (D) utilisation préférentielle des transporteurs H^+-PPiase par rapport aux transporteurs H^+-ATPase, (E) expression de transporteurs de P de haute affinité ; (F) remplacement des phospholipides membranaires par des sulfolipides ou des galactolipides, (G,H) sécrétion dans le milieu rhizosphérique de nucléases, et de phosphatases.

Figure 20 : Rôle de la PSR dans la modulation des relations plantes-microorganismes. PHR1 : facteur de transcription des gènes de la PSR

Figure 21 : Schéma simplifié des composantes de l'efficience d'usage de l'azote. NupE : efficience d'absorption de N, NAE : efficience d'assimilation du N ; NRE : efficience de remobilisation du N

Figure 22 : Réseaux d'échange de métabolites dans la rhizosphère. (A) flavonoïdes, (B) strigolactones, (C) acide malique, (D) protons, citrate, composés phénoliques, (E) sucres et autres, (F) mucilage, protéines, et ADN extracellulaire. En bleu : composants microbiens ; en marron : composants végétaux ; en rouge : transporteurs connus ; en orange : transporteurs non caractérisés.

Figure 23 : Colonisation des racines et assemblage des communautés microbiennes de la rhizosphère. En réponse aux composés exsudés par la plante, les microorganismes sélectionnés vont se déplacer par chimiotactisme, et grâce au quorum-sensing produire du biofilm assurant la colonisation des racines. Le contournement du système immunitaire des plantes se fait par la synthèse à la surface bactérienne de structures mimant les surfaces des cellules végétales (PREPARADOs) et en réduisant l'expression des MAMPs (Microbial-Associated Molecular Patterns).

Figure 24 : Molécules produites par les souches PGPR impliquées dans la reconnaissance de l'hôte et sa colonisation. Les flagelles sont impliqués dans la reconnaissance et la motilité, les auto-inducteurs (AHLs) sont impliqués dans la communication entre microorganismes, les MOMPs (major outer membrane proteins) et les LPS (Lipopolysaccharides) facilitent l'adhésion aux racines et la vitamine B1 et la NADH deshydrogénase sont impliquées dans la colonisation.

Figure 25 : Mécanismes utilisés par les PGPR pour l'amélioration de la croissance des plantes.

Figure 26 : Processus microbiens du cycle de l'azote ((1) fixation de l'azote atmosphérique, (2) nitrification, (3) dénitrification, (4) et (5) co-dénitrification,(5) voie anammox, (6) production d'oxyde nitreux conjointe à la nitrification.

Figure 27 : Fonctionnement symbiotique des nodules chez les légumineuses. Après colonisation, la plante fournit une source de carbone par l'influx de sucres dans les nodules et synthétise localement de la leghémoglobine, créant une atmosphère microaérophile indispensable au fonctionnement de la nitrogénase des *Rhizobium* sous forme de bactéroïdes.

Figure 28 : Cycle de l'azote, voies de transformation régulées par des processus physiologiques microbiens, absorptions végétales et pertes dans l'environnement par lessivage et volatilisation.

Figure 29 : Représentation schématique de la diversité des acides organiques produits par les PSB et utilisés pour la solubilisation du P inorganique.

Figure 30 : Mécanismes consécutifs de la phosphodiestérase et de la phosphatase alcaline impliquant un réarrangement moléculaire (réaction A) et l'incorporation d'atomes d'oxygène (réactions B et C) permettant le dégagement du phosphate à partir des acides nucléiques.

Figure 31 : Approche holistique de la compréhension des relations hôte-microorganismes.

Figure 32 : Généralisation de l'approche par holobionte dans les domaines de la santé et de l'agriculture.

Figure 33 : Structures générales des communautés bactériennes et fongiques de diverses niches écologiques associées aux plantes. La composition du microbiome varie selon le compartiment de la plante. Les camemberts de gauche représentent les proportions relatives des phylums bactériens majeurs, à droite les phylums fongiques.

Figure 34 : Stœchiométries C : N : P des bactéries, bactériophages et nécromasse (cell lysates) normalisées en fonction de la bactérie hôte initiale (chiffres en bleu) ou bruts (chiffres en noir). Ces chiffres sont évalués pour un nombre hypothétique de virions fixé à 40 pour une bactérie infectée.

Figure 35 : Relations entre la plante, les microorganismes rhizosphériques et leurs relations trophiques, à droite la prédation (par des protozoaires, des nématodes bactérivores, etc) à gauche par les infections virales des bactéries dues à la présence de phages dans l'environnement. (DOM : Dissolved Organic Matter, SOM : Soil organic Matter).

Figure 36 : Description des expériences en serre 1 (N-, plantes à faible statut N) et 2 (N+, plantes à fort statut N) avec les différentes fertilisations N et P apportées à la reprise de croissance, à la montaison, et au début de floraison. HN : high N, LN : low N, HP : high P, MP: medium P, LP: low P. Les quantités d'azote et de phosphore apportées sont exprimées en mg par plante.

Figure 37 : Design expérimental de l'expérience en rhizotrons. Deux niveaux de fertilisation N ont été appliqués : un niveau élevé (N160 : 160 mg par plante) et un niveau faible (N80 : 80 mg par plante). Pour chaque niveau de fertilisation N, l'application de P a été réalisée sous forme complexée ou labile. Chaque combinaison N et P a été inoculé avec la souche F23 ou a reçu du NaCl 0.9 % en tant que témoin (Control).

Figure38 : Régression linéaire entre l'efficience d'absorption de l'azote et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+

Figure 39 : Régression linéaire entre l'efficience d'utilisation de l'azote et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+

Figure 40 : Régression linéaire entre les indices de récoltes de l'azote et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+

Figure 41 : Régression linéaire entre l'efficience d'absorption du phosphore et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+

Figure 42 : Régression linéaire entre l'efficience d'usage du phosphore et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+

Figure 43 : Régression linéaire entre les indices de récolte du phosphore et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+

Figure 44 : Partage du marché des biointrants (tous microorganismes confondus) par typologie de produits proposés

Figure 45 : Voies de synthèse de l'IAA à partir de tryptophane chez des souches bactériennes possédant des caractéristiques PGPR (Goswami et al., 2016)

Figure 46 : Ratios de fertilisation N : P testés à l'échelle de l'individu, du couple colza-F23 ainsi que du phytobiome. En vert, les ratios pour lesquels les meilleures performances agronomiques et de coopération plante-microorganismes ont été trouvées.

Figure 47 : Approches intégrées pour explorer et exploiter le microbiome associé à la plante pour de nouvelles stratégies agricoles (Song et al., 2020)

Figure 48 : schéma conceptuel du pilotage par les successions et associations des cultures, ainsi que le raisonnement des fertilisations N et P. Par le biais des exsudats racinaire permettant de recruter et d'assembler des communautés microbiennes désirables, et grâce à l'application d'un ratio de fertilisation N : P raisonné, l'instauration et la contribution de la souche F23 permet un meilleur fonctionnement des microorganismes de la rhizosphère et ainsi optimiser la croissance du colza.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Evolution de l'utilisation totale d'engrais à l'échelle mondiale pour les principales cultures de 1997 à 2030.

Tableau 2 : Indices agronomiques liés à l'efficience d'usage de l'azote.

Tableau 3 : Coefficients de corrélation et p.values obtenus entre les indices agronomiques liés à l'usage de l'azote et du phosphore et les ratios N : P des plantes obtenues au cours des expériences N- et N+ (XAE : Efficiences d'Absorption, XHI : indices de récoltes, XUtE : Efficience d'Utilisation, XUE : Efficiences d'Usage). Les p.values et coefficients de corrélation ont été obtenus en utilisant la fonction "cor.test" du logiciel R (version 4.0.2) associée au test de corrélation de Pearson.

Chapitre I : Introduction générale

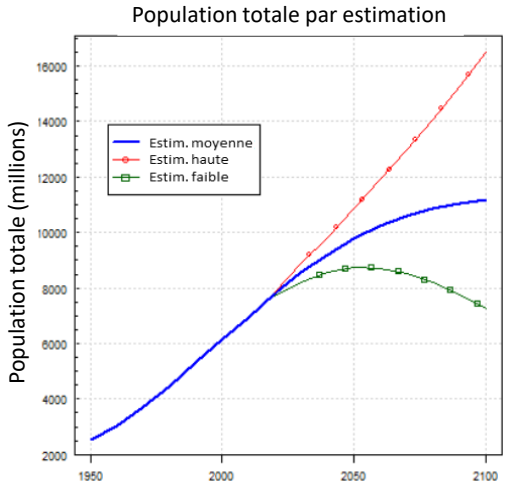


Figure 1 : Population mondiale depuis 1950 et estimations de 2017 à l'horizon 2100 (ONU, 2017).

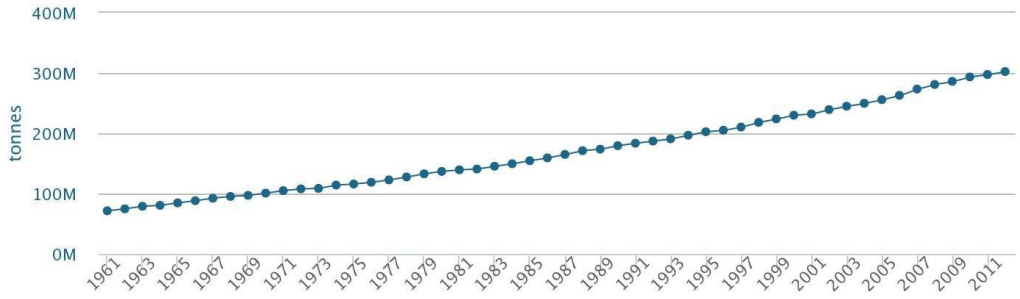


Figure 2 : Evolution de la production de viande au niveau mondial de 1961 à 2011 (viande.info, FAOSTAT, 2020).

Tableau 1 : Evolution de l'utilisation totale d'engrais à l'échelle mondiale pour les principales cultures de 1997 à 2030 (projection, FAO and Bruinsma, 2003).

	1997/99	2015	2030
	Nutrients, million tonnes		
Wheat	25.3	30.4	34.9
Rice	23.8	26.5	28.1
Maize	22.5	29.0	34.5
Fodder	8.5	9.3	10.0
Seed cotton	4.9	6.2	7.1
Soybeans	4.6	7.6	11.5
Vegetables	4.6	5.3	6.1
Sugar cane	4.4	5.5	6.6
Fruit	4.1	4.3	7.5
Barley	4.0	4.4	4.8
Other cereals	3.9	9.2	8.3
Potato	2.7	3.3	3.8
Rapeseed	2.1	3.5	5.1
Sweet potato	1.8	2.0	2.1
Sugar beet	1.4	1.6	1.7
All cereals	79.5	99.5	110.6
% of total	57.7	64.8	58.8
All crops above	118.5	148.2	172.1
% of total	86.0	89.8	91.5
World total	137.7	165.1	188.0

La population mondiale connait depuis la révolution industrielle un état de transition démographique. En effet, depuis le milieu du 19ème siècle, les pays industrialisés voient leur taux de mortalité diminuer et l'espérance de vie augmenter. Cette transition démographique a eu pour conséquence une augmentation exponentielle de la population humaine, notamment depuis les années 1950 (Figure 1). A cette époque, la population mondiale était de 2,5 milliards d'êtres humains tandis que la population mondiale actuelle avoisine les 7,8 milliards de personnes (ONU, 2019).

En parallèle de cette transition démographique s'observe une transition des modes de vie de subsistance vers un mode de vie de consommation, voire de surconsommation. La consommation de produits d'origine animale constitue le cas le plus souvent cité. A titre d'exemple, la production de viande à l'échelle mondiale était de 92 millions de tonnes à la fin des années 1960 (consommation mondiale de 24,2 $kg.an^{-1}.hab^{-1}$ dont 10,2 pour les pays en voie de développement) ; puis en 2003 la Food and Agriculture Organisation (FAO) estimait une production de 300 millions de tonnes (consommation mondiale de 41,3 $kg.an^{-1}$ $.hab^{-1}$ dont 31,6 pour les pays en voie de développement) pour l'année 2015 (Figure 2, FAOSTAT 2020).

Le développement de cette demande de ressources nutritives et de matières premières repose avant tout sur l'augmentation de la productivité agricole. Ainsi, depuis la fin des années 1960, la production agricole annuelle augmente de 1,3 à 2,1% (FAO and Bruinsma, 2003). Cette croissance est expliquée à 15% par l'expansion des terres arables, à 7% par une intensification de l'agriculture au détriment des cultures de subsistance, mais surtout par une augmentation des rendements (78% de la croissance). Cette véritable « révolution verte » a été rendue possible grâce à la sélection variétale et la progression de l'usage d'intrants (Tableau 1), passés de 25 $kg.ha^{-1}$ à 92 $kg.ha^{-1}$ en une vingtaine d'années (FAO).

Historiquement, ces intrants étaient apportés sous forme organique par l'application de fumier, de goémon dans les zones littorales ou par les déjections des animaux à travers la pratique du pâturage sur jachère. A partir du 19ème siècle, l'application de guano en provenance d'Amérique du Sud se répand. Ce matériau, constitué à partir de déjections d'oiseaux, est riche en azote (N) et en phosphore (P), qui sont deux macroéléments fortement limitants de la croissance végétale, et par conséquent de la productivité agricole (Moreau et al., 2015; Vance, 2001). Ces matières organiques étant des ressources limitées et exportées de pays étrangers, leur utilisation croissante a eu pour conséquence une augmentation de leur coût et une influence sur la géopolitique de l'époque.

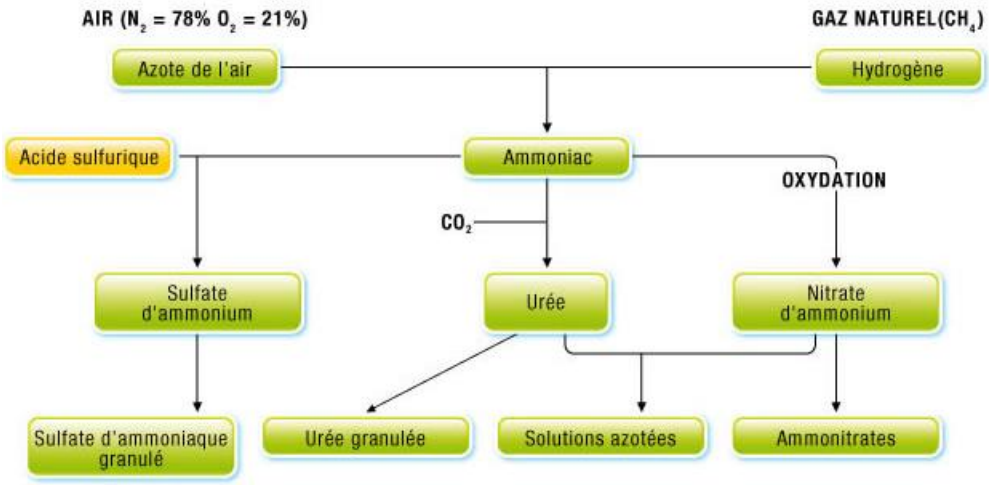


Figure 3 : Production des différentes formes d'engrais azotés à partir du procédé Haber-Bosch (UNIFA, 2017).

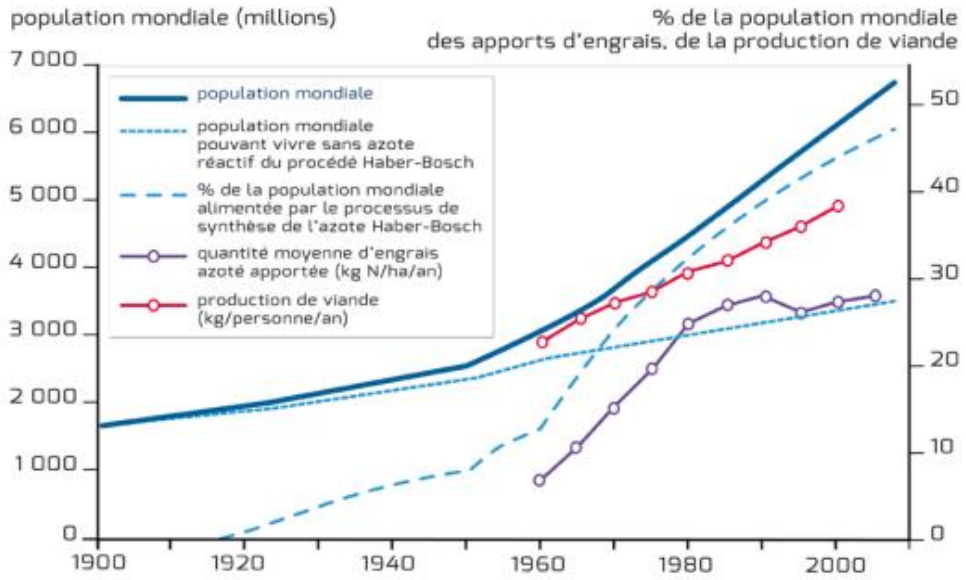


Figure 4 : Contribution du procédé Haber-Bosch à l'accroissement de la population mondiale (d'après Erisman et al., 2008).

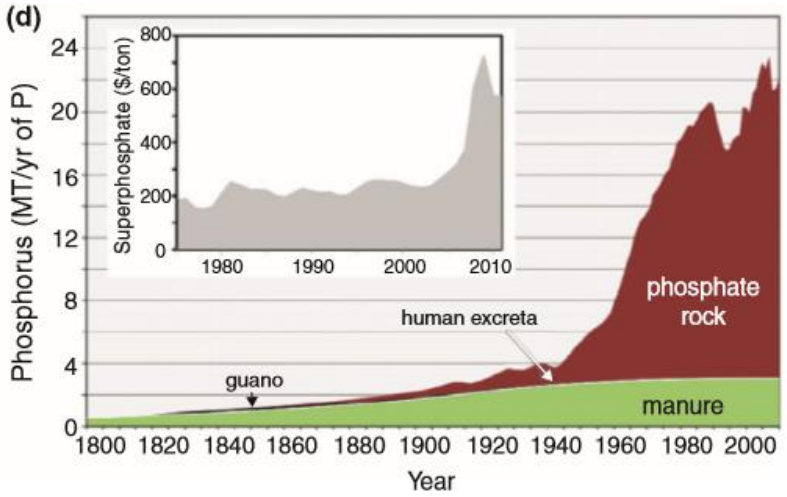


Figure 5 : Sources et coûts d'engrais phosphatés depuis le début du 19ème siècle (Elser, 2012).

A titre d'exemple, les îles Chincha, principal lieu d'extraction de guano péruvien ont permis l'essor économique du Pérou mais étaient également au centre des tensions entre ce pays et l'Espagne peu après son indépendance. Le contrôle de ces îles est alors devenu un lieu de conflit majeur lors de la guerre Hispano-Sud-Américaine (1865-1866), aussi appelée « guerre du guano » (Jarrige and Roux, 2017). Le commerce de cette matière a ainsi été fortement perturbé, et par voie de conséquence son utilisation dans les pays européens également.

Ces difficultés d'approvisionnement, concomitante de l'industrialisation, ont favorisé l'utilisation et la synthèse de matières fertilisantes d'origine minérale. En effet, en 1913, Fritz Haber et ses collaborateurs mettent au point le procédé Haber-Bosch permettant la synthèse de diverses formes d'azote, toujours utilisées aujourd'hui (Figure 3). Ces engrais ont permis de lever la limitation de production agricole et ont ainsi contribué à l'accroissement de la population globale (Figure 4) (Cellier, 2011; Smil, 1999). Concernant les engrais phosphatés, ils sont aujourd'hui majoritairement issus de l'exploitation minérale, ce qui en fait une ressource limitée et non renouvelable. Son potentiel d'épuisement d'ici une centaine d'années impacte à la hausse le coût de cette ressource (Figure 5). De plus, les principaux gisements de roche phosphatée étant majoritairement situés en Tunisie, au Maroc, en Chine et aux Etats-Unis, les autres pays demandeurs se retrouvent ainsi dans un état de forte dépendance (Lougheed, 2011).

Le coût environnemental de ces ressources est également considérable. La synthèse des engrais azotés par le procédé Haber-Bosch utilise de grandes quantités d'énergie pour le chauffage et la mise sous pression du méthane qui sert à obtenir l'hydrogène permettant de convertir le diazote atmosphérique en ammoniac. Le carbone ainsi utilisé dans ce procédé est évacué sous forme de dioxyde de carbone (Figure 3, UNIFA, 2017). Une fois appliqués au champ, le devenir des engrais azotés présente également un bilan environnemental lourd. En effet, l'azote peut être apporté sous forme minérale (nitrate et ammonium qui sont les formes directement utilisables par la plante) ou sous forme organique (par exemple l'urée). Ces différentes formes subissent des processus de transformation par les microorganismes du sol et peuvent aboutir à la production de formes volatiles telles l'oxyde nitrique (NO) ou l'oxyde nitreux (N_2O). Ces formes appartiennent à la famille des oxydes d'azote (ou Nox) et sont des gaz à effet de serre plus puissants que le CO_2. Enfin, l'ammonium peut être volatilisé sous forme d'ammoniac et le nitrate (NO_3^-) est souvent perdu par lessivage des sols et est ainsi responsable de la pollution des cours d'eaux par eutrophisation (Grizzetti et al., 2020; Jarrige and Roux, 2017).

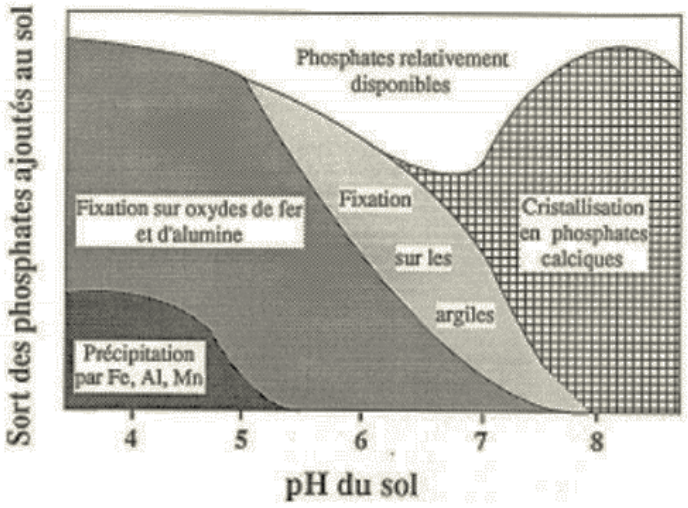


Figure 6 : Etats de fixation des ions phosphates et disponibilité relatives dans la solution de sol en fonction du pH (Demers, 2008).

Le coût environnemental de l'exploitation du phosphate est lui aussi très important. En effet, l'extraction minière dans des carrières de phosphore sous forme d'apatite nécessite l'utilisation d'engins lourds et produit des déchets contenant des métaux toxiques ainsi que des éléments radioactifs. L'apatite n'étant pas directement utilisable comme engrais, le phosphate doit ensuite être purifié par l'application d'acides forts (notamment les acides sulfurique, phosphorique et nitrique) (Reta et al., 2018). De nombreux autres secteurs industriels sont fortement dépendants du phosphate, dont les produits finis sont à plus forte valeur ajoutée. Parmi elles nous retrouvons la production de conservateurs alimentaires, d'agents anti-corrosion, de produits phytosanitaires, de cosmétiques, de céramique et le secteur de la métallurgie. Ces secteurs industriels nécessitent des produits phosphatés de haute qualité, laissant ainsi au secteur agricole les formes de phosphate moins pures. Ainsi, l'application d'intrants phosphatés d'origine minérale se révèle également être une source de pollution des sols agricoles, notamment avec des éléments traces métalliques tels l'arsenic, le plomb ou le cadmium (Hartley et al., 2013; Molina-Roco et al., 2018; Taylor and Percival, 2001).

De plus, la faible disponibilité du P pour les plantes implique sa sur-utilisation au champ. En effet, les plantes ne peuvent l'absorber que sous forme de phosphate (PO_4^{2-}) à partir de la solution de sol. Or cette forme ionisée est fortement retenue par les complexes argilo-humiques (Figure 6). Jusqu'à 80% du phosphore total (Ptotal) est adsorbé ou précipité avec les matières minérales (calcium) ou les métaux (fer et aluminium) selon la nature du sol (Menezes-Blackburn et al., 2017). Au final, il est estimé que seulement 0,1% du Ptotal est disponible dans la solution de sol (Illmer and Schinner, 1995), ne représentant qu'une concentration de 1 à 10 µM (Plassard et al., 2015). C'est pourquoi la FAO estime que seuls 20 à 30 % des engrais phosphatés apportés au sol sont réellement absorbés par les cultures chaque année (Syers et al., 2009). Ainsi dans les pays d'Europe occidentale, plus d'1,1 tonnes de P par hectare ont été appliqués entre 1965 et 2007 alors que seulement 0,3 ont été exportés lors des récoltes (Sattari et al., 2012).

La prise de conscience de la forte dégradation de notre environnement en lien avec les activités humaines par les instances politiques a débuté dans les années 80 par la commission mondiale sur l'environnement et le développement de l'ONU, aboutissant à la rédaction du rapport dit Brundtland, premier document à introduire la notion de développement durable (Brundtland et al., 1988). Cette notion comprend le développement d'une agriculture plus durable, c'est-à-dire un système de production respectueux de l'environnement, économiquement viable, source de produits sains et de haute qualité et ne menaçant pas le futur potentiel agricole

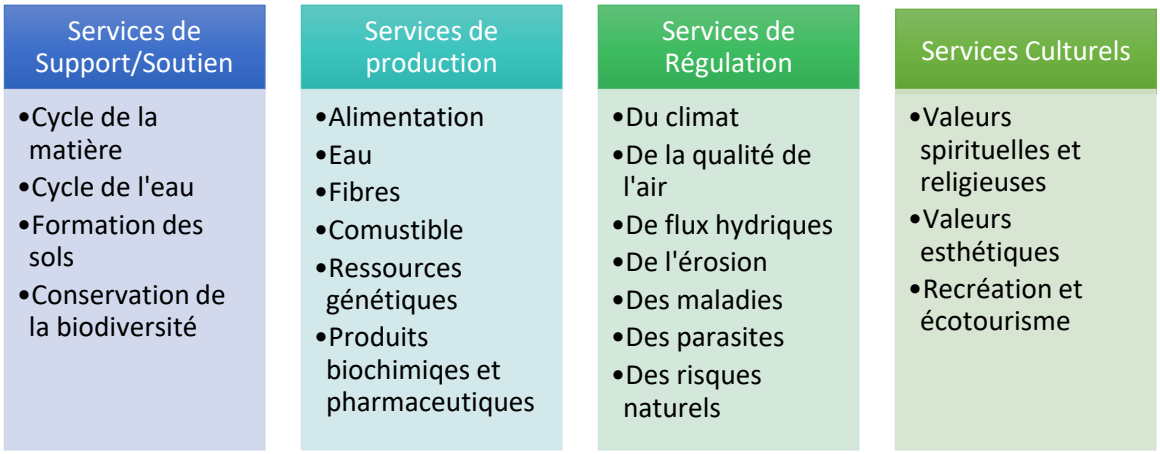


Figure 7 : Les services écosystémiques tels que définis par le MAE. Les services écosystémiques sont les bénéfices que tirent les populations humaines des fonctionnements des écosystèmes (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

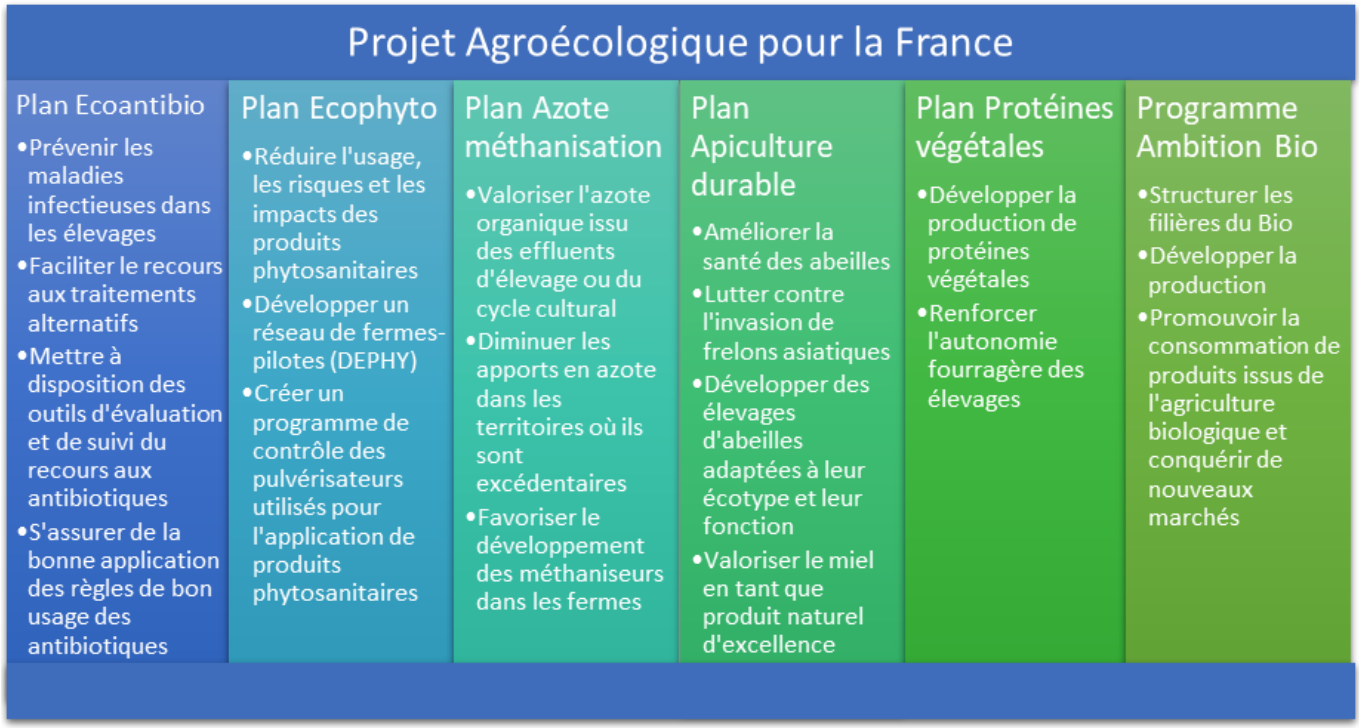


Figure 8 : Organisation du projet Agroécologique pour la France (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2012).

En 2000, le Millennium Ecosystem Assessment (MEA) a mis en avant l'importance des services écosystémiques définis comme l'ensemble des services fournis par un écosystème dont la population humaine tire un bénéfice (Figure 7), ainsi que les impacts qu'ils subissent en lien avec les changements climatiques (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). C'est dans ce cadre conceptuel que le MEA attire l'attention plus particulièrement sur l'état de dégradation des sols et de la nécessité d'évaluer l'état et le fonctionnement de ces écosystèmes par la mise au point d'indicateurs de suivi.

La biodiversité hébergée par les sols constitue à la fois un indicateur et un acteur essentiel des fonctions de cet environnement complexe (Breure, 2004). Cette même biodiversité est aujourd'hui favorisée dans le cadre de la transition agroécologique de l'Agriculture, en particulier en tant que levier pour une amélioration du bilan environnemental des pratiques. En effet, l'agroécologie a pour but principal de maintenir ou d'augmenter le rendement agricole tout en limitant l'impact environnemental lié à l'usage d'intrants (Altieri, 2002; Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2013). Cette transition agroécologique implique trois étapes successives appelées étapes « ESR » pour Efficience (réduire la consommation et le gaspillage des ressources), Substitution (remplacer les produits et pratiques actuelles par des conduites moins nocives pour l'environnement), Reconception (élaborer de nouveaux schémas de production pour des agroécosystèmes plus performants et répondant aux nouvelles exigences, Hill and MacRae, 1996).

En ce sens, le ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt (MAAF) a mis en place en 2012 le Projet Agroécologique pour la France (Figure 8) structuré en six plans distincts (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2012). Ce projet a été renforcé en septembre 2020 dans le cadre du plan de relance économique « France relance » (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2020). Parmi les différents volets de ce projet, le plan « protéines végétales » a pour ambition de s'affranchir de l'importation de soja destiné à l'alimentation animale (4 millions de tonnes par an), principalement depuis le Brésil (Peyronnet et al., 2014). La production de légumineuses, principalement représentée par la culture de pois protéagineux en France, est en déclin depuis plus de 20 ans. En effet, les surfaces cultivées représentaient près de 800 kha dans les années 1990 et seulement 400 kha en 2018 (Terres Univia, 2018). Ce déclin s'explique par la forte prévalence de pathologies associées à la culture du pois, et la préférence d'autres cultures plus rentables à placer en tête de rotation comme le colza.

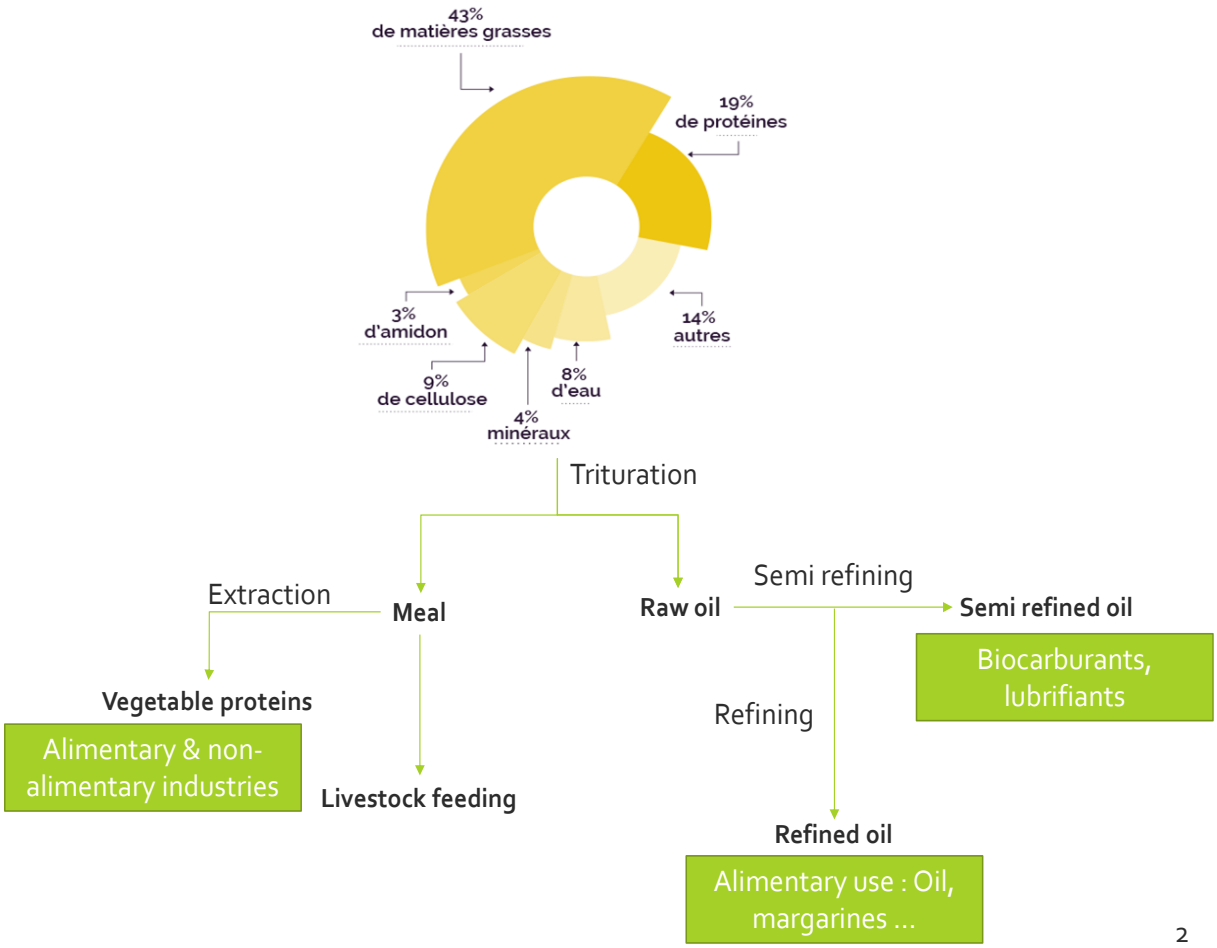


Figure 9 : Composition des graines de colza et débouchés industriels (D'après Terres Univia).

En effet, le colza présente le double avantage d'une meilleure marge financière (fluctuations autour de 200€/t pour le pois contre 350 à 400€/t pour le colza ; Agro-BASF, 2020-) mais également par la multiplicité des débouchés avec l'utilisation de ses graines à la fois dans le domaine de la production d'huiles et pour la production de tourteaux riches en protéines à destination de l'alimentation animale (Figure 9). Dans les années 80, la surface dévolue à sa culture était de 450 kha pour occuper finalement 1,1 Mha en 2019 (Terres Univia, 2020a). Toutefois, alors que la culture de légumineuses ne nécessite pas d'apports d'engrais azotés, et peu d'engrais phosphatés, le colza quant à lui nécessite un apport important de ces 2 macroéléments. Le gain de rendement économique se trouve alors amputé par l'application de ces intrants. En effet, la fertilisation représente une part importante des coûts de production des grandes cultures, occupant même parfois le premier poste de dépenses comprises dans les charges d'approvisionnement (Agreste, 2011; Desbois and Legris, 2007).

Au final, dans un contexte agroécologique, la culture du colza va regrouper des enjeux de «double performance», à la fois écologique et économique. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet EPURE (Enhancing Plant nUtRition and hEalth) porté par la Structure Fédérative de Recherche Normandie Végétal (FED4277 NorVEGE) dont l'un des objectifs est l'optimisation de la culture du colza par une meilleure compréhension des interactions nutritionnelles en lien avec les interactions plantes-microorganismes. Adossé au projet EPURE et en partie au programme investissement Avenir – RAPSODYN ("Optimization of the RAPeSeed Oil content anD Yield under low Nitrogen input: improving breeding of adapted varieties using genetics and genomics" ; 2012-21), ce projet de recherche doctoral s'est plus particulièrement intéressé aux axes d'amélioration de l'efficience d'usage de l'azote et du phosphore chez le colza par l'optimisation et la rationalisation de la fertilisation apportée, et plus particulièrement le déploiement de solutions biointrants plus durables. Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR INRAe-Unicaen 950 EVA et de l'unité AGHYLE UP 2018.C101 qui ont mis en commun leurs compétences et expériences sur les interactions nutritionnelles chez le colza d'une part, et sur les interactions plantes-microorganismes, d'autre part.

Les chapitres suivants décrivent l'état de l'art actuel concernant les interactions entre le phosphore et l'azote dans la nutrition des plantes, leur impact sur la structure et les fonctions exercées par les microorganismes du sol ainsi que les interactions plantes-microorganismes pouvant promouvoir la santé et le rendement de plantes d'intérêt économique.

Chapitre II : Synthèse bibliographique

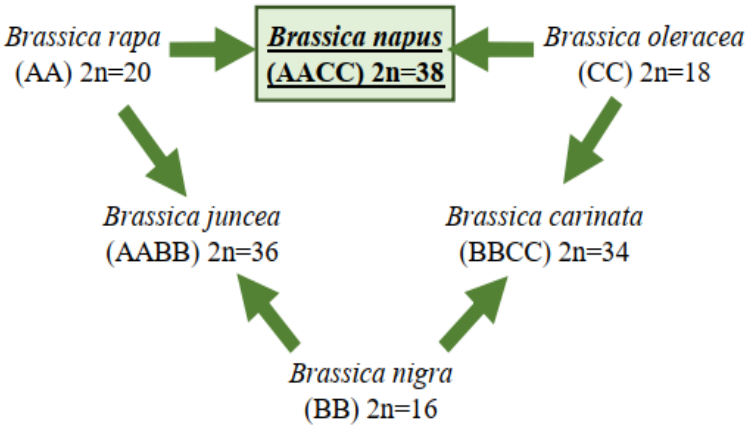


Figure 10 : Place du colza dans le triangle de U, décrivant les relations génétiques entre plusieurs espèces de Brassicacées. Parmi les espèces diploïdes : le chou (*B. oleracea*), la navette (*B. rapa*) et la moutarde noire (*B. nigra*). Parmi les espèces allotétraploïdes résultant d'hybridations : le colza (*B. napus*), la moutarde brune (*B. juncea*) et la moutarde d'Abyssinie (*B. carinata*). A, B et C représentent les différents génomes (U and Nagaharu, 1935).

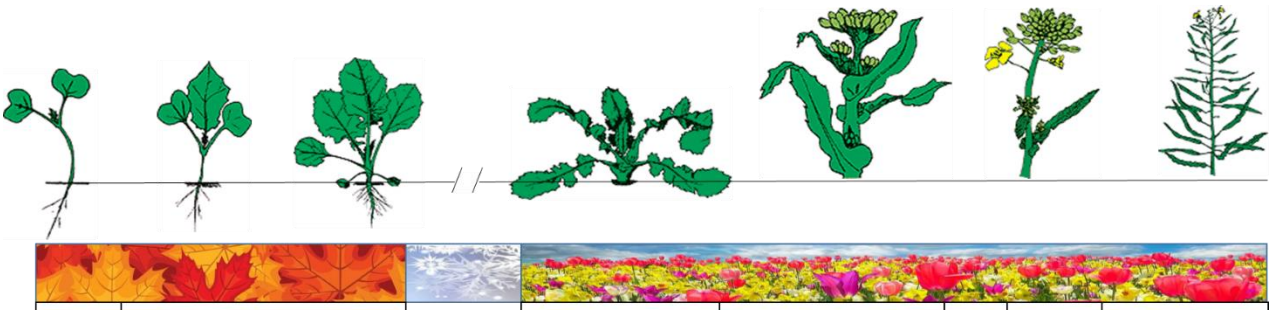
A. Le colza, une oléoprotéagineuse exigeante

A-1. Domestication et historique.

Le colza ou *Brassica napus* est une dicotylédone de la famille des Brassicacées issue de l'hybridation interspécifique naturelle entre le chou (*Brassica oleracea*) et la navette (*Brassica campestris*) (Figure 10, U and Nagaharu, 1935). Les plus anciennes traces de culture du colza remontent à l'antiquité où il était déjà cultivé en Inde (entre -2000 et –1500 av. JC), en Chine et au Japon pour produire de l'huile à destination de l'éclairage. Cette culture est ensuite arrivée en Europe au Moyen-Âge (Gupta and Pratap, 2007), principalement dans les pays prospères comme les Pays-Bas. C'est de ce pays que vient l'appellation « colza », à partir de « Koolzaad » désignant une graine de chou (CNRTL, 2012). La culture du colza s'est alors fortement répandue en Europe à partir du 17ème siècle, en parallèle de l'expansion de l'utilisation de la machine à vapeur. En effet à l'époque, l'huile de colza était principalement utilisée en tant que lubrifiant (Gupta and Pratap, 2007).

Dans les années 60, l'utilisation de l'huile de colza à des fins alimentaires a connu une forte controverse en raison de sa teneur en acide érucique (INRA, 2006), acide gras présent dans les graines. Il serait en effet responsable d'effets négatifs sur la santé, notamment de troubles cardiaques appelés lipidose myocardique chez les enfants fortement exposés. Des effets ont également été observés chez les animaux (changement de poids du foie, des reins et des muscles squelettiques). L'acide érucique pouvait représenter alors jusqu'à 40% des acides gras totaux des graines (EFSA, 2016), freinant la progression des surfaces cultivées. La sélection variétale a alors permis de développer des plantes de colza dont les graines ont un contenu inférieur à 5% en acide érucique (Gupta and Pratap, 2007), plus compatibles avec la consommation humaine et animale. Ces variétés sont appelées variétés « 0 ».

En 1973, la production de soja aux Etats Unis a connu une forte baisse en raison des conditions climatiques. Le gouvernement Américain a alors décrété un embargo sur l'exportation de soja, malgré la dépendance de l'Union Européenne pour la nourriture des animaux d'élevage (Mouillet, 2003). Cet évènement a permis un fort développement de la filière alimentaire du colza pour les animaux. Toutefois, une nouvelle problématique a malheureusement été mise à jour. Les tourteaux alors produits contenaient une forte proportion de glucosinolates, facteur antinutritionnel pour les porcs et les volailles. Ces glucosinolates sont des métabolites secondaires sulfatés transformés lors du processus de pressage/trituration des graines sous l'action de la myrosinase en divers résidus présents en quantités variables.



A	B1 à $Bn_{feuilles}$		C1 – C2	D1 – D2	E	F	G1 – G5
Cotylédons	Rosette	Vernalisation	Montaison	Boutons accolés	séparés	Floraison	Formation des siliques

Figure 11 : Croissance et stades phénologiques du colza (Terres Inovia).

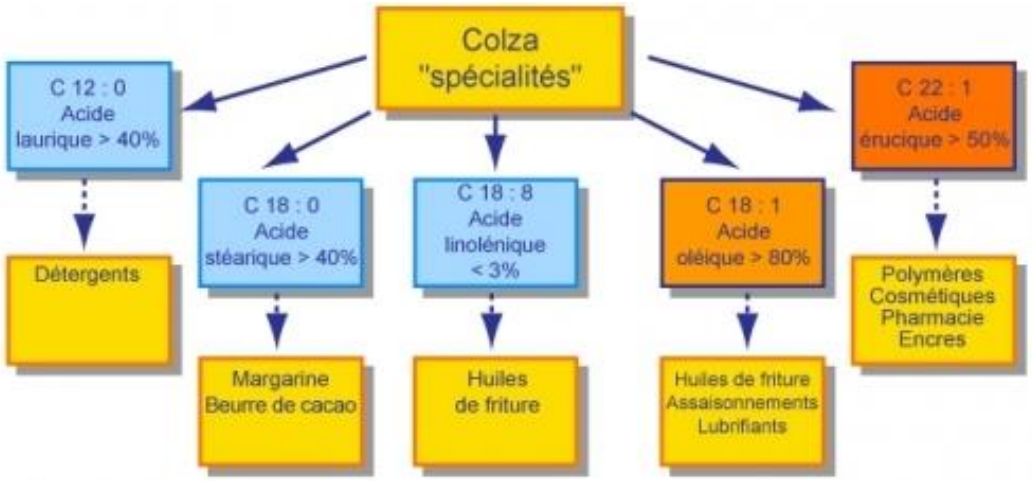


Figure 12 : Débouchés en fonction de la qualité des graines (Florilege.arcad-project.org).

Ceux-ci sont responsables de l'inappétence des tourteaux et de toxicité par un effet goitrigène (Bourdon, 1989 ; Gallais and Bannerot, 1992), entrainant un recul des surfaces cultivées au milieu des années 80. Une seconde vague de sélection variétale, établie à partir du cultivar polonais Bronowski a alors permis d'abaisser les taux de glucosinolates dans les graines. Les variétés résultantes de ces deux sélections sont appelées variétés double zéro « 00 » (INRA, 2006) permettant la reprise de l'expansion de la culture de colza en France pour atteindre une moyenne d'1,3 millions d'ha sur les 3 dernières années. La France occupe le premier rang européen pour la culture du colza malgré le recul des surfaces cultivées à 1,1 Mha depuis 2019 (Terres Univia, 2020b).

A-2. La culture du colza et ses débouchés

Le colza d'hiver a un cycle de culture d'environ 10 à 11 mois. Il est classiquement semé à la fin de l'été et récolté en juillet. Entre la levée et l'arrivée de l'hiver, une rosette d'une vingtaine de feuilles va se former (Figure 11). Au cours de l'hiver, le métabolisme de la plante va ralentir considérablement, correspondant à une phase de vernalisation. Celle-ci permet des modifications épigénétiques indispensables à la floraison de la plante, et a donc un impact fort sur le rendement. A la sortie d'hiver, le colza va reprendre sa croissance pour débuter sa phase reproductive, accroitre la taille de sa tige au cours de la montaison, puis se ramifier. Enfin, au cours de la floraison, les organes reproducteurs vont se mettre en place. Après pollinisation des fleurs, des siliques vont alors apparaitre puis les graines vont se développer, accumuler des réserves et maturer. Une fois leur maturation complète, les colzas sont moissonnés et les graines récoltées pourront par la suite être orientées vers diverses filières selon leur qualité (Agridea, 2009; Terres Inovia; UNIFA).

La graine de colza se compose principalement de matières grasses, riches en acides gras polyinsaturés, dont le ratio des teneurs en acide α-linolénique (ω 3) et en acide linoléique (ω 6) est intéressant pour la consommation d'huile comestible. En effet, ce ratio d'acides-gras est impliqué dans la prévention des risques cardiovasculaires (Simopoulos, 2010). Les huiles provenant de la trituration des graines de colza peuvent également être employées dans la fabrication de produits transformés pour l'alimentation humaine (margarines), mais aussi selon leur qualité lipidique, dans la fabrication de biocarburants, de lubrifiants, détergents etc. (Figures 9 et 12, Piazza and Foglia, 2001).

La part protéique représente également une proportion importante des graines de colza, qui en font un produit fortement valorisable post-trituration, et qui lui valent aujourd'hui la qualification de culture oléoprotéagineuse. En effet, les graines triturées génèrent un co-produit riche en protéines permettant la fabrication de tourteaux à destination de l'alimentation animale, mais également valorisables après extraction protéique dans divers secteurs industriels. En effet, ces protéines présentent des propriétés émulsifiantes, moussantes, ou texturantes intéressantes qui peuvent être utilisés entre autres dans les industries agroalimentaires (mayonnaise vegan par exemple), chimiques (fabrication de détergents par exemple) ou cosmétiques (Fetzer et al., 2020).

En parallèle, les pailles obtenues lors de la récolte peuvent être valorisées sous forme d'intrant par leur enfouissement dans les sols, mais également en tant que paillage pour les animaux d'élevage (CETIOM, 2015).

A-3. La nutrition azotée du colza

Le colza est à la fois exigeant et a de forts besoins en azote (Schjoerring et al., 1995). L'exigence signifie qu'une baisse des apports, même faible, entraine une forte perte de rendement. De plus, on considère aujourd'hui que la culture de colza a besoin de 7 unités (kh/ha) de N par quintal de graines produites. Cette caractéristique est mise à profit sur le plan agronomique dans le cadre des Cultures Intermédiaires Piège A Nitrates (CIPAN), permettant la limitation du lessivage de l'azote en hiver.

A-3 a) L'acquisition de N

L'azote minéral est absorbé sous forme de nitrate ou d'ammonium par les plantes via le système racinaire, grâce à deux familles de transporteurs constitutifs ou inductibles : les systèmes de transport à basse affinité appelé LATS (« Low Affinity Transport System ») qui interviennent lors de fortes concentrations externes en nitrate ou ammonium et les systèmes de transport à haute affinité appelé HATS (« High Affinity Transport System ») permettant l'absorption du N minéral lorsqu'il est présent en faible concentration. Pour le nitrate, la première famille de transporteurs de type LATS correspond aux transporteurs NRT1. Ils sont localisés au niveau des apex racinaires, permettant ainsi à la plante de prélever le nitrate de son environnement. Ils sont également présents au niveau des membranes plasmiques des cellules de l'endoderme qui délimite le cylindre central racinaire, et dans les pétioles des feuilles. Ainsi ces transporteurs sont responsables de la translocation du nitrate dans le xylème, jusque dans les feuilles (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

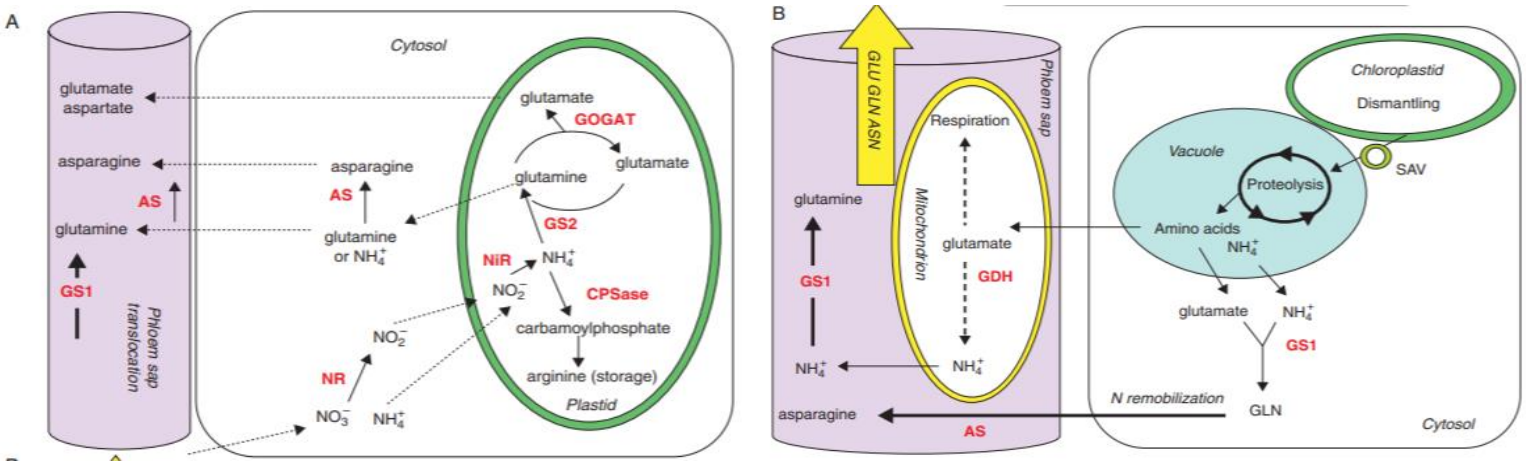


Figure 13 **:** Schéma simplifié du métabolisme N dans une feuille jeune (A) et une feuille en cours de sénescence (B). En rouge : les enzymes impliquées dans les processus d'incorporation et de transformation du N. AS : Asparagine Synthase, ASN : Asparagine, CPSase : CarbamoylPhosphate Synthétase, GDH : Glutamate Déshydrogénase, GLN : glutamine, GLU Glutamate, SAV : «senescence-associated vacuole» (d'après Masclaux-Daubresse et al., 2010).

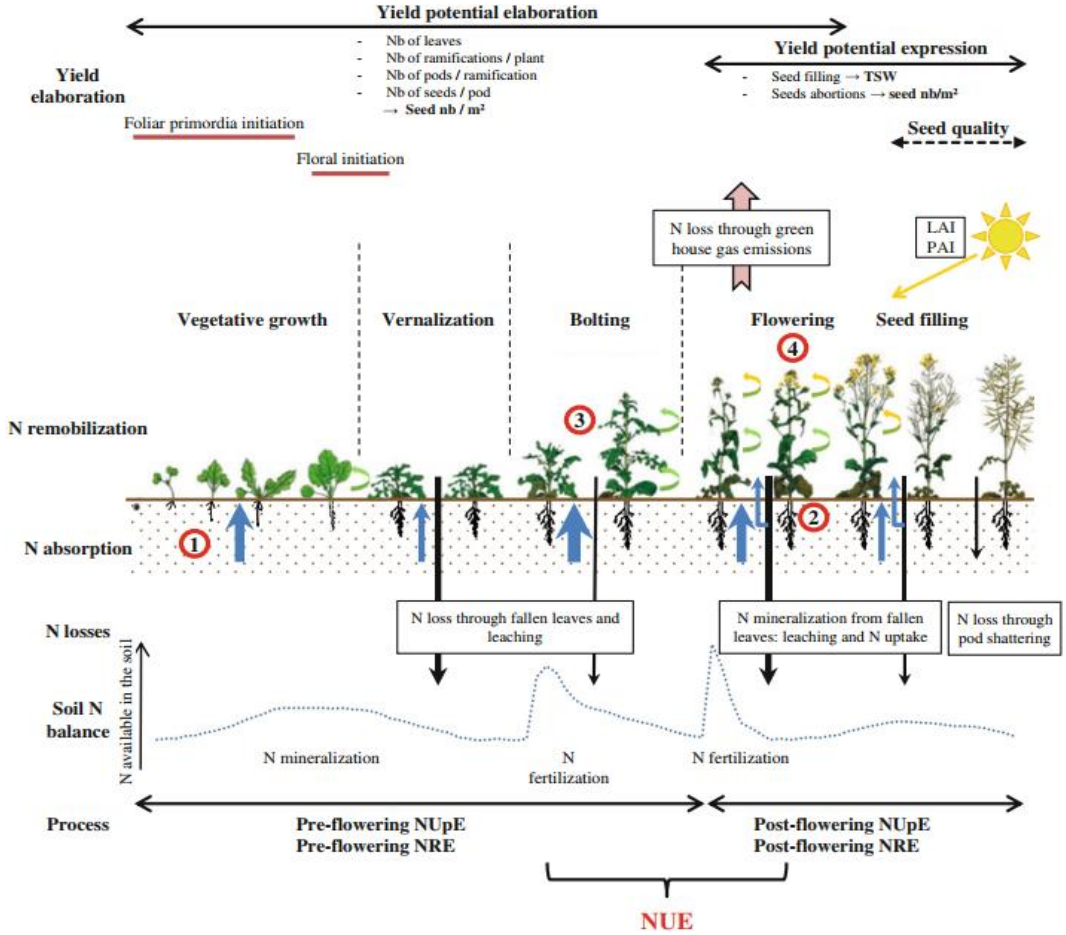


Figure 14 : Dynamiques de l'absorption, de la remobilisation du N chez le colza et apports de N au sol au cours du cycle de culture. Les flèches en bleu représentent l'absorption de N, et les flèches noires représentent les pertes de N, proportionnellement à leur épaisseur. Les chiffres représentent les stades critiques déterminant l'établissement de la NUE finale : (1) NAE avant floraison, (2) NAE post-floraison, (3) efficience des remobilisations liées à la sénescence séquentielle et monocarpique, (4) interactions entre NUE et les surfaces présentant une activité photosynthétique (feuilles et siliques). (Bouchet et al., 2016).

La seconde famille, NRT2, correspond aux HATS qui n'interviennent que lorsque la concentration en nitrate dans l'environnement est faible (< 500 µM) (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Pour l'ammonium, le transporteur AMT1 agirait quelle que soit la concentration en ammonium et le transporteur AMT2 serait de type HATS (Gazzarrini et al., 1999). L'urée peut aussi être absorbée de manière passive grâce à des aquaporines (PIPs, TIPs, NIPs) et par un transporteur actif (DUR3) (Kojima et al., 2007).

Après absorption, le nitrate est ensuite réduit en nitrite puis sous forme d'ammonium qui sera finalement assimilé dans les acides aminés. Chez le colza, ces réductions successives ont lieu à la fois dans le compartiment racinaire et au niveau foliaire, de manière couplée avec l'activité photosynthétique. Le nitrate est réduit en nitrite dans le cytosol par la nitrate réductase (NR), qui est alors transporté dans les plastes où il est pris en charge par la nitrite réductase (NiR) et ainsi réduit en ammonium. Celui-ci est ensuite pris en charge par le complexe Glutamine Synthétase / Glutamine OxoGlutarate AminoTransferase (GS / GOGAT, Figure 13) pour la synthèse de glutamine et de glutamate. Plusieurs voies métaboliques prennent alors le relai pour former les autres acides aminés nécessaires à la croissance de la plante (Figure 13). Lorsque la demande en N est inférieure à l'offre dans la solution du sol, l'azote est alors stocké principalement au niveau foliaire sous forme d'acides aminés et de protéines (Masclaux-Daubresse et al., 2010). .

Au cours du développement de la plante, l'azote est principalement absorbé aux stades rosette, puis à la reprise de croissance post-vernalisation, et ce jusqu'à la floraison (Figure 14, Bouchet et al., 2016). L'absorption post-floraison n'est pas négligeable mais elle est ralentie. Cette baisse de la capacité d'absorption du N minéral pourrait être liée à une réduction de l'activité photosynthétique des feuilles qui sont ombragées par les fleurs et siliques en croissance, à des régulations métaboliques et/ou hormonales, et/ou à une limitation de la disponibilité en N minéral dans le sol (accentuée par des épisodes de sécheresse) (Girondé et al., 2015). Toute la période végétative précédant la floraison constitue la phase d'élaboration du potentiel de rendement (Figure 14). En effet, ce dernier va être dépendant des réserves qui seront accumulées et stockées par la plante avant que ses capacités d'absorption soient inhibées (Figure 15).

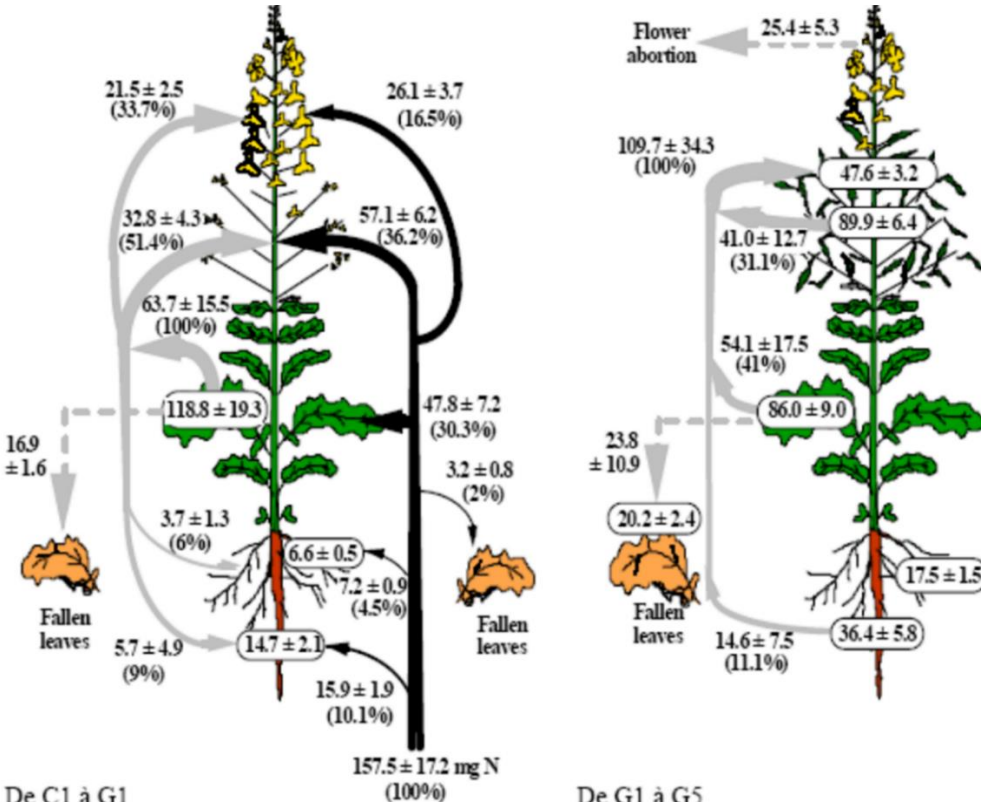


Figure 15 : Flux d'azote chez le colza (cv. Capitol) avant (A) et après (B) floraison. Les flux sont exprimés en mg de N par organe. Les flèches grises à gauche des plantes indiquent les flux de remobilisation et les flèches noires à droite des plantes indiquent les flux de N provenant de l'absorption (Rossato et al., 2001).

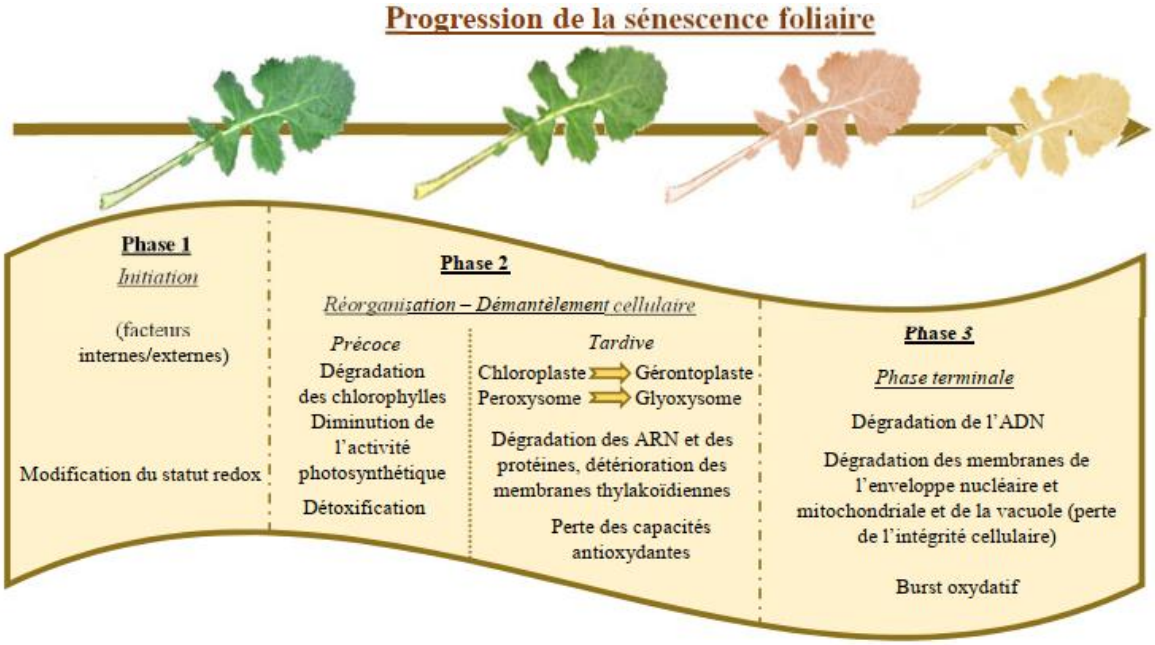


Figure 16 : Les trois phases de la sénescence foliaire (d'après Zimmermann and Zentgraf, 2005).

A-3 b) Les processus de remobilisation

Dans la mesure où le colza élabore son potentiel de rendement seulement pendant une période définie, l'azote stocké au sein des organes de réserves doit pouvoir être redistribué vers les organes reproducteurs pour permettre l'expression de ce potentiel (Figure 14). Cette remobilisation d'azote intervient au cours de la sénescence (Rossato et al., 2001). Celle-ci désigne un processus finement orchestré, qui s'étale de l'échelle de l'organite à celui de l'organe, conduisant à sa mort. De ce fait, les organes végétatifs constituent donc des organes de réserve temporaires (Guiboileau et al., 2010).

La sénescence se manifeste chez le colza sous deux formes : la sénescence séquentielle et la sénescence monocarpique en fin de cycle de vie de la plante. La sénescence séquentielle touche les feuilles de manière acropète le long de l'axe de la plante et intervient au cours de phase végétative jusqu'à la formation des siliques en permettant un recyclage des réserves foliaires vers les organes puits en croissance (Noodén et al., 2004). La sénescence monocarpique permet la remobilisation des nutriments de l'ensemble des organes sources (feuilles, tiges, péricarpes, tiges) vers les organes puits reproducteurs (les siliques et *in fine* les graines) (Figures 13-B, 15).

La sénescence foliaire se caractérise de la façon la plus évidente par une décoloration des limbes, signe de la dégradation des chloroplastes (Figure 16). L'activité protéasique est très importante au cours de la sénescence (Girondé et al., 2015). La Rubisco représente 50 % des protéines solubles et constitue la première source de N pour la remobilisation de l'azote au cours de la dégradation des chloroplastes, alors appelé gérontoplastes. En l'absence de photosynthèse, les cellules doivent puiser leur énergie dans la mise en place de nouvelles voies métaboliques dont la synthèse de glucides à partir d'Acétyl-CoA provenant de la dégradation des lipides membranaires, par néoglucogénèse. Ces réactions se font dans le peroxysome alors devenu glyoxysome (Cornah and Smith, 2002). Le N est ensuite exporté par la sève phloèmienne vers les tissus en croissance, majoritairement sous forme de glutamine, de glutamate et d'asparagine (Tilsner et al., 2005).

Dans une phase plus tardive de la sénescence (Figure 16), la dégradation des acides nucléiques signe l'irréversibilité du processus. En parallèle, la production d'éthylène au niveau du pétiole augmente et aboutit à l'abscision de la feuille sénescente (Guiboileau et al., 2010). Chez le colza, cette abscision intervient généralement alors que la remobilisation de l'azote est encore incomplète, ce qui conduit à des pertes de nutriments de l'ordre de 2 à 4 % (Malagoli, 2005).

A-3 c) Adaptations physiologiques à des conditions limitantes en N

L'azote étant généralement un élément limitant la croissance végétale, les plantes sont capables de mettre en place différentes stratégies d'adaptation pour augmenter l'absorption racinaire, limiter la demande, ou initier la remobilisation par la sénescence.

La limitation en azote va tout d'abord conduire à l'activation de la « Primary Nitrate Response ». Elle se caractérise par l'induction de l'expression des gènes de transporteurs de nitrate et de ceux codant les enzymes responsables de sa réduction (Zhao et al., 2018). Une limitation prolongée induit quant à elle l'activation de la « Nitrogen Starvation Response » (NSR). Celle-ci correspond entre autres à la régulation de gènes impliqués dans l'initiation et le développement des racines secondaires, de facteurs de réponse à l'auxine, la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species – ROS) (Safi et al., 2021; Zhao et al., 2018). La NSR aboutit alors à une modification de l'architecture racinaire, avec un nombre et une longueur de racines latérales plus importants. Ainsi la plante sera capable de prospecter un volume de sol plus grand pour essayer de satisfaire ses besoins en N (Qin et al., 2019). En parallèle, la sénescence séquentielle sera accélérée afin d'assurer un apport suffisant en N pour la croissance de nouveaux organes.

A-4. La nutrition phosphatée du colza

Tout comme pour l'azote, le colza est une culture exigeante en phosphore (Rashid and Bughio, 1993). Souvent placée en tête de rotation, la culture du colza nécessite en général des apports d'intrants phosphatés, en quantité permettant de répondre aux besoins de l'ensemble de la rotation. Cependant, les phosphates apportés restent peu disponibles dans les sols, du fait de leur forte et rapide adsorption aux particules argileuses du sol, ainsi qu'au fer et à l'aluminium qui y sont également présents (Helfenstein et al., 2018). Au final, seulement 20 à 30% des engrais P apportés sont finalement disponibles pour être absorbés par les cultures (Syers et al., 2009).

A-4 a) L'acquisition de P à partir du sol

L'acquisition de P par les plantes s'effectue au niveau racinaire, exclusivement sous forme d'orthophosphate (Pi), de formule HPO_4^{2-} ou H_2PO_4- en fonction du pH du sol (Morel et al., 2011). Dans la mesure où le P est en concentration plus faible dans la solution de sol que dans le cytosol, l'absorption de P, s'effectuant contre le gradient de concentration, est un processus hautement régulé au travers de la membrane plasmique par un double système de transporteurs de faible et de haute affinité (Raghothama and Karthikeyan, 2005).

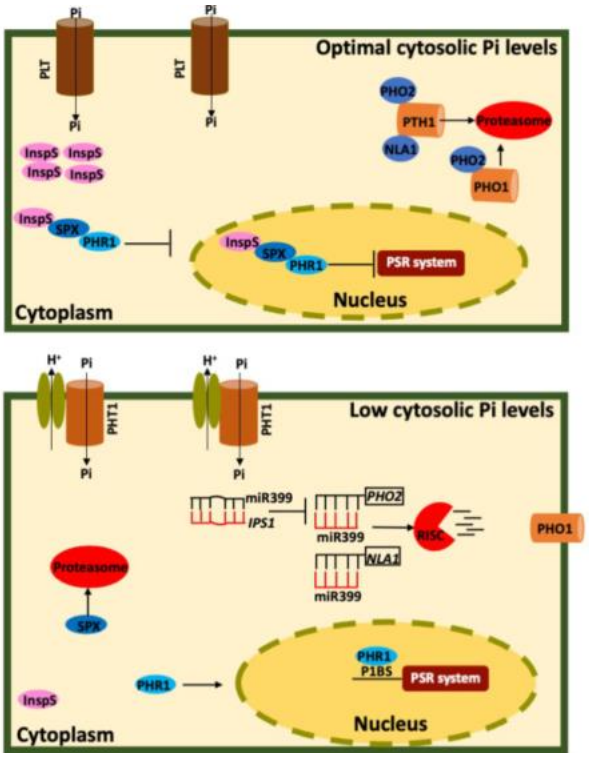


Figure 17 : Mécanismes de régulation de la P Starvation Response en conditions de nutrition P suffisantes (A) et en situation de carence en P (B). InsPS : inositol-P à différents degrés de saturation, interagissant avec des protéines à domaine SPX, se liant au facteur de transcription PHR1 permettant l'expression des gènes de la PSR. PLT : transporteurs de P de faible affinité, PHT1 : transporteurs de P de haute affinité, PHO1 et 2 : exporteurs de Pi (Isidra-Arellano et al., 2021).

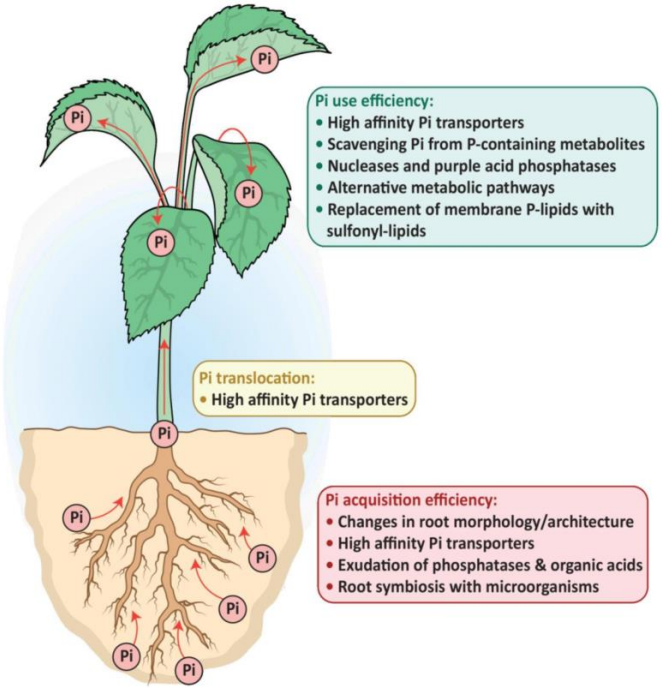


Figure 18 : Vue d'ensemble des adaptations métaboliques des plantes pour améliorer l'acquisition du P à partir de sols déficients pour cet élément, et augmenter la PUE (Dissanayaka et al., 2021).

De manière identique aux transporteurs de nitrate, un premier système de transport de faible affinité (PLT, Figure 17) est exprimé de manière constitutive, tandis que celui de haute affinité (PHT, Figure 17) est induit par des conditions de déficience en P. A titre d'exemple, il a été montré chez *Arabidopsis thaliana*, plante modèle de la famille des Brassicacées, l'existence de 9 gènes codant des transporteurs de phosphate de haute affinité. Ces gènes, regroupés dans la famille des gènes *pht1* codent des symports H+ : Pi (Hawkesford, 2011; Plassard et al., 2015).

Le P est ensuite transféré aux différents tissus de la plante par des transporteurs dédiés pour son incorporation dans différentes macromolécules, ou son stockage dans les vacuoles sous forme de phosphate ou d'inositol-polyphosphate (InsP) pouvant inclure jusqu'à 6 groupements phosphate pour former du InsP6 aussi appelé phytate. Ce stockage est crucial dans le maintien de l'homéostasie des niveaux de Pi cytosolique, afin de permettre l'absorption continue de Pi. Par la suite, le Pi pourra être incorporé dans diverses macromolécules. Il est principalement utilisé dans la formation des acides nucléiques (représentant 50 % du P organique) impliqués non seulement dans le stockage et l'expression du matériel génétique, mais également dans le métabolisme énergétique (ATP). Il est également retrouvé dans les phospholipides membranaires. Au stade reproducteur, le colza utilisera le P pour la production de phytate, molécule de réserve de P qui s'accumule dans la graine et qui sera utilisée pour soutenir la croissance d'une nouvelle plantule après la germination.

A-4 b) Adaptations physiologiques à des conditions limitantes en P

Dans la mesure où le Pi est un élément rare et peu mobile dans les sols (Sokolov, 1968), les plantes doivent mettre en place des stratégies d'adaptation afin de réguler leur demande en P et augmenter leurs capacités d'absorption. Ces adaptations dépendent de l'expression de groupes de gènes sous la régulation des domaines protéiques SPX (**S**uppressor of yeast *gpa1*, the yeast **P**hosphatase 81 and the human **X**enotropic and polytropic retrovirus receptor 1). Ce domaine est trouvé à l'extrémité N-terminale de protéines appartenant au régulon PHO, impliqué dans l'homéostasie du Pi (Secco et al., 2012). En conditions non limitantes en P, les InsP incluant le phytate, forme de réserve de P, vont agir en tant que senseurs en se liant aux domaines SPX de ces protéines, permettant ainsi leur activation. Les domaines SPX ainsi activés interagissent avec le facteur de transcription PHR1, réprimant l'expression des gènes du système de réponse à la carence en P (P starvation response, PSR, Figure 17). En conditions de carence, le pool d'InsP va diminuer, levant donc cette répression et permettant la translocation de PHR1 dans le noyau, et la dégradation par le protéasome des protéines à domaine SPX (Dissanayaka et al., 2021; Isidra-Arellano et al., 2021).

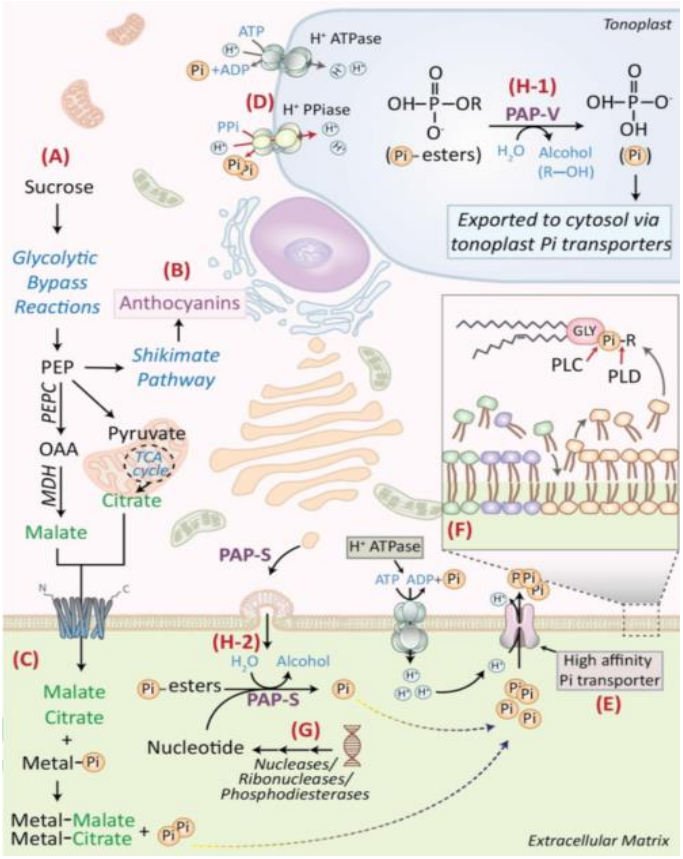


Figure 19: Processus métaboliques d'adaptation aux carences en P. (A) réactions alternatives à la glycolyse, (B) accumulation d'anthocyanes dans les feuilles, (C) exsudation d'acides organiques, (D) utilisation préférentielle des transporteurs H^+-PPiase par rapport aux transporteurs H^+-ATPase, (E) expression de transporteurs de P de haute affinité ; (F) remplacement des phospholipides membranaires par des sulfolipides ou des galactolipides, (G,H) sécrétion dans le milieu rhizosphérique de nucléases, et de phosphatases (Dissanayaka et al., 2021).

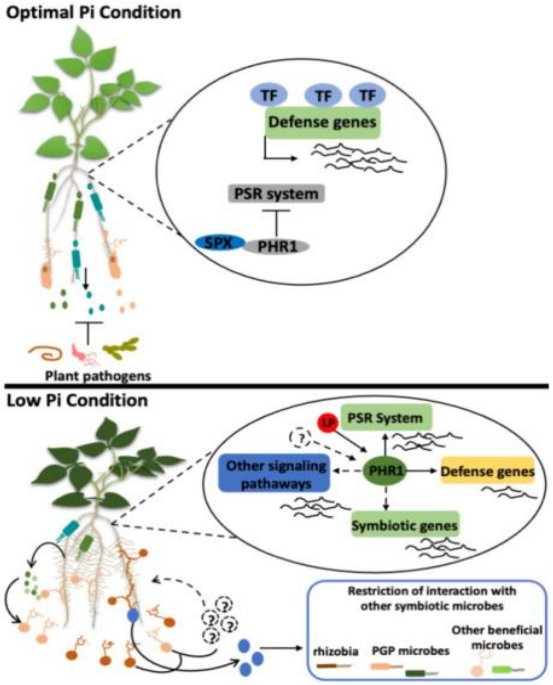


Figure 20 : Rôle de la PSR dans la modulation des relations plantes-microorganismes. PHR1 : facteur de transcription des gènes de la PSR (Isidra-Arellano et al., 2021).

La PSR va induire de nombreux changements métaboliques ainsi que des remaniements de grande ampleur chez la plante (Figures 18, 19 et 20) avec :

- des modifications de l'architecture, notamment une diminution de la croissance du pivot, une élongation des racines latérales ainsi qu'une diminution de leur diamètre. Ces changements permettent, comme pour l'azote, la prospection d'un volume de sol plus important, plutôt localisé en surface, lieu privilégié de minéralisation de la matière organique (Dissanayaka et al., 2021; Ge et al., 2012; Gregory, 2011; Rengel and Marschner, 2005).

- l'expression des gènes codant pour les transporteurs de haute affinité, permettant de capter le Pi en moindre concentration dans la solution de sol, et une translocation plus efficace dans les tissus.

- l'exsudation de composés chélateurs d'ions comme des sidérophores ou des acides organiques permettant une acidification locale du sol, permettant ainsi la solubilisation du P complexé. Le pool de P organique du sol peut également être mobilisé par l'exsudation de phosphatases ou de ribonucléases (Alori et al., 2017; Honvault et al., 2020)

- au niveau du métabolisme général de la plante, via l'activation de voies métaboliques alternatives requérant moins d'utilisation d'ATP.

- la synthèse de pigments tels que les anthocyanes, permettant de protéger les tissus foliaires des rayonnements, dans la mesure où la photosynthèse va être fortement ralentie au profit de la respiration cellulaire. Cette production est responsable de la coloration violacée caractéristique des plantes carencées en P.

- le remplacement des phospholipides membranaires par des sulfolipides ou des galactolipides afin de remobiliser leur P, de même que des phénomènes plus généraux d'autophagie (principalement de ribophagie) permettant de remobiliser le P des acides nucléiques, induisant la sénescence des organes sources.

Tableau 2 : Indices agronomiques liés à l'efficience d'usage de l'azote (Hawkesford and Barraclough, 2011).

abbréviation	dénomination	Formule	unité	notes
EUF	Efficience d'usage du Fertilisant	(Nabsorbé/Nappliqué)*100	%	% de fertilisant appliqué absorbé par la culture
EUA	Efficience d'usage de l'Azote	EAA x EUtA	kg.kg-1	EUA proche de rendement / azote dispo
EAA	Efficience d'absorption de l'Azote	Nabsorbé/N dispo (sol+engrais)	kg.kg-1	efficience physiologique
EUtA	Efficience d'utilisation de l'Azote	rendement / Nabsorbé	kg.kg-1	efficience agrophysiologique
IR	Indice de Récolte	Masse des grains récoltés / biomasse aérienne totale	fraction	
IRA	Indice de Récolte Azoté	Fraction de l'azote du grain / azote de la biomasse aérienne totale	fraction	
EAA	Eficience de l'Azote Agronomique	rendement avec fertilisation - rendement sans fertilisation	kg.kg-1	gain de rendement par fertilisation
ERA	Efficience de recouvrement apparent	Nabsorbé / N apporté par fertilisation	kg.kg-1	

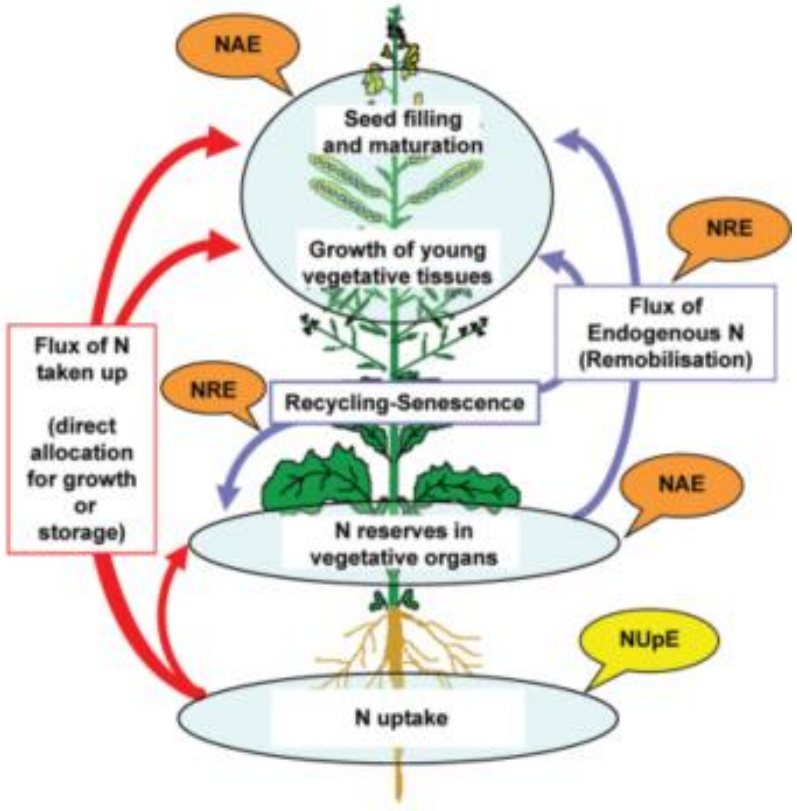


Figure 21 : Schéma simplifié des composantes de l'efficience d'usage de l'azote. NupE : efficience d'absorption de N, NAE : efficience d'assimilation du N ; NRE : efficience de remobilisation du N (Avice and Etienne, 2014).

- Enfin, des modifications des voies du système immunitaire de la plante permettant une modulation des relations avec les microorganismes rhizosphériques (Figure 20, Isidra-Arellano et al., 2021). Ces modulations vont en particulier contribuer au possible recrutement de microorganismes PGPR et PSB, mais vont également favoriser la mycorhization des racines, véritable relation symbiotique entre les champignons arbusculaires et les plantes. Toutefois, le colza, du fait entre autres de sa production en glucosinolates, comme la majorité des Brassicacés, n'établit pas de relation avec des champignons arbusculaires mycorhiziens (Reau et al., 2005).

A-5. Des indices agronomiques pour monitorer les performances du colza

Nous avons précédemment décrit les aspects physiologiques de l'absorption de N et de P, ainsi que de leur remobilisation. Afin d'étudier ces phénomènes aux champs, l'utilisation d'indices agronomiques se révèle particulièrement utile. Ces derniers permettent de monitorer le devenir des nutriments présents dans les sols, qu'ils soient naturellement présents ou apportés par fertilisation, dans la construction du rendement.

Ainsi, les performances agronomiques des grandes cultures peuvent être évaluées selon l'efficience d'usage des nutriments (Tableau 2 : exemple de l'azote, Hawkesford and Barraclough, 2011, Figure 21 : Avice and Etienne, 2014). Cette efficience d'usage (NUE, PUE : N / P Use Efficiency) prend en compte 2 composantes :

- l'efficience d'absorption des nutriments (NAE, PAE pour N / P Absorption Efficiency, souvent remplacée par NUpE, PUpE pour N / P Uptake Efficiency),
- l'efficience d'utilisation des nutriments (NUtE, PUtE : N / P Utilisation Efficiency). Cette efficience d'utilisation des nutriments peut aussi être subdivisée en efficience d'assimilation (non déployée dans le cadre de cette thèse) et efficience de remobilisation (NRE, PRE : N / P Remobilisation Efficiency).

A-5 a) L'efficience d'absorption des nutriments

L'efficience d'absorption est calculée comme étant la quantité d'un minéral absorbée divisée par la quantité disponible de ce minéral dans les sols, permettant ainsi de s'affranchir des problèmes de complexation ou d'indisponibilité des minéraux. Cette prise en compte est importante, spécialement en ce qui concerne la nutrition phosphatée, les ions phosphates étant peu disponibles et peu mobiles dans les sols (Rengel and Marschner, 2005).

Cette efficience d'absorption est ainsi dépendante à la fois des caractéristiques du sol, des apports de fertilisants, et des capacités d'absorption de la plante. Il s'agit d'un indice agronomique souvent utilisé en fin de culture, mais qui en réalité varie au cours du temps. A titre d'exemple, la quantité d'azote dans les sols connait une série de pics consécutifs à la minéralisation automnale, ainsi qu'aux apports d'engrais au printemps (Figure 14, Bouchet et al., 2016). Inversement, lorsque l'azote du sol se raréfie, l'expression de transporteurs de haute affinité, associée aux modifications de l'architecture racinaire, augmente le potentiel d'absorption de la plante aux stades végétatifs. Inversement, aux stades reproducteurs, l'expression des transporteurs de nitrate est fortement réprimée, et la floraison s'accompagne également du ralentissement de l'activité photosynthétique, et donc du métabolisme énergétique qui peut potentiellement diminuer les activités enzymatiques liées à l'assimilation de l'azote (Bouchet et al., 2016; Girondé et al., 2015).

A-5 b) L'efficience d'utilisation des nutriments

L'efficience d'utilisation des nutriments se définit comme étant le rapport du rendement par la quantité de nutriments absorbés (Hawkesford and Barraclough, 2011). Elle est donc indicatrice des capacités d'assimilation des nutriments dans les molécules organiques, de l'efficacité de remobilisation et de translocation au sein de la plante au service de l'élaboration du rendement. Ce dernier peut varier selon l'efficacité de pollinisation, du nombre de siliques formées et du nombre de graines par siliques, ainsi que du poids de mille grains (PMG).

L'efficience de remobilisation des nutriments est, quant à elle, principalement évaluée par la teneur résiduelle de l'élément considéré dans les feuilles mortes pour la sénescence séquentielle, ou dans l'ensemble des tissus au terme de la sénescence monocarpique. Il est également possible d'estimer l'efficience de remobilisation entre 2 stades de développement, par exemple entre la floraison et la récolte finale pour estimer les capacités de remobilisation des organes végétatifs vers les graines.

A-5 c) L'efficience d'usage des nutriments

Finalement, l'efficience d'usage des nutriments se révèle être la synthèse des indices agronomiques précédemment évoqués. Elle se calcule comme étant le rapport du rendement sur la quantité de nutriments à disposition dans l'environnement, ce qui correspond aussi au produit de l'efficience d'absorption et de l'efficience d'usage de l'élément en question (Hawkesford and Barraclough, 2011).

Dans l'exemple de l'azote, l'efficience d'usage se construit dès le stade végétatif par la capacité de la plante à acquérir le N provenant de la minéralisation (Figure 14), permettant une plus grande élaboration de biomasse. Cette vigueur est directement corrélée avec la capacité de réserve, et la taille du pool de N remobilisable. Le développement des rosettes est ensuite suivi d'un ralentissement de la croissance et de l'absorption au cours de l'hiver. La croissance reprend au printemps avec la montaison (vigueur de reprise de croissance et se poursuit jusqu'à la floraison. Toute cette période est désignée comme période d'élaboration du potentiel de rendement. En effet, l'absorption consécutive à la floraison étant souvent faible, l'utilisation de l'azote au profit de la formation et du remplissage des graines ne pourra alors se faire en très grande majorité que par la remobilisation du pool précédemment acquis. Cette phase reproductive est alors appelée phase d'expression du potentiel de rendement (Figure 14, Bouchet et al., 2016)

Bien que généralement évaluée en fin de culture, l'efficience d'usage des nutriments résume à elle-seule l'ensemble des phénomènes qui se sont déroulés pendant l'ensemble du cycle de culture. Or, comme nous l'avons vu dans les précédents chapitres, les phénomènes biochimiques et physiologiques des plantes est extrêmement variable entre les stades végétatifs et reproducteurs de la culture de colza.

L'acquisition de ces nutriments par l'intermédiaire des racines est cependant fortement dépendante de l'environnement abiotique mais également biotique de la plante. En effet, les microorganismes sont les acteurs majeurs de la mise à disposition des nutriments par leur implication dans les cycles biogéochimiques.

B. La rhizosphère, une interface d'acquisition des nutriments pour le colza et les microorganismes des sols

B-1. Comment définir la rhizosphère ?

La rhizosphère a été définie par Lorenz Hiltner comme étant la zone du sol étant sous l'influence directe du système racinaire (Hiltner, 1904; Hinsinger and Marschner, 2006). Ce compartiment est essentiel car finalement directement en lien avec la potentialité d'acquisition des nutriments par la plante. Non seulement cette rhizosphère constitue de fait une interface entre la plante et le sol, mais elle est surtout une interface entre les microorganismes et les racines ; ainsi qu'entre les microorganismes rhizosphériques et non-rhizosphériques.

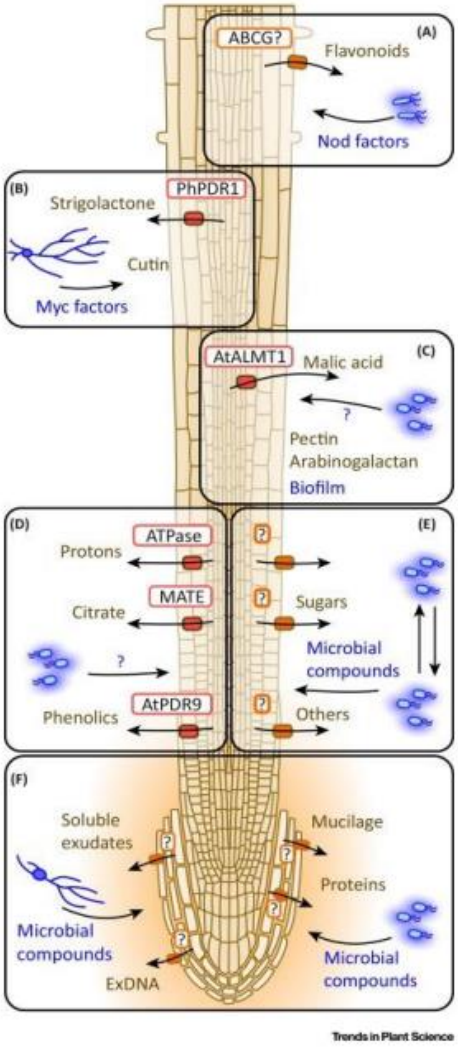


Figure 22 : Réseaux d'échange de métabolites dans la rhizosphère. (A) flavonoïdes, (B) strigolactones, (C) acide malique, (D) protons, citrate, composés phénoliques, (E) sucres et autres, (F) mucilage, protéines, et ADN extracellulaire. En bleu : composants microbiens ; en marron : composants végétaux ; en rouge : transporteurs connus ; en orange : transporteurs non caractérisés. (Sasse et al., 2018).

Bien qu'invisibles, les microorganismes représentent une biomasse considérable dans les sols. Elle a été évaluée comme étant de l'ordre de grandeur de 1,5 et 3,5 tonnes par hectare respectivement pour les bactéries et les champignons (Champomier-Vergès and Zagorec, 2015), pour une biodiversité variant de 10^4 à 10^6 espèces par gramme de sol (Schloss and Handelsman, 2006). Cette biodiversité est principalement modelée par les caractéristiques physicochimiques des sols telles que le pH (Fierer and Jackson, 2006), mais également le couvert végétal en place.

Ces microorganismes jouent un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes, notamment par la minéralisation de la matière organique, la structuration des sols par les hyphes fongiques, ou encore par les interactions trophiques dans lesquels ils sont impliqués (cycle des nutriments, lutte contre les pathogènes, régulation de la biodiversité). En particulier, la rhizosphère se caractérise par une plus forte activité des communautés microbiennes comparativement au sol nu (Gkarmiri et al., 2017). Ainsi, l'environnement rhizosphérique constitue un hotspot concentrant les activités microbiennes (Bakker et al., 2013). Toute cette biodiversité représente en effet un réservoir de fonctions, modelable et pouvant être recruté à façon par les plantes afin de subvenir à leurs besoins.

B-2 Mécanismes de recrutement des microorganismes rhizosphériques

Bien que l'ensemble du processus de recrutement des microorganismes par la plante soit encore loin d'être élucidé, les premières étapes semblent être la résultante du dialogue qui s'établit entre la plante et les microorganismes. Ce dialogue est sous la dépendance première de la rhizodéposition, en particulier les exsudats racinaires (Pang et al., 2021).

Les plantes sont ainsi les premières à communiquer dans ce dialogue. Par l'intermédiaire de leurs racines, elles vont émettre dans le sol une grande diversité de composés par diffusion libre ou par l'intermédiaire de transporteurs dédiés (Badri and Vivanco, 2009; Sasse et al., 2018). Ces composés constituent surtout des sources de carbone à destination des microorganismes avoisinants, et peuvent représenter jusqu'à 50% du carbone exporté vers les racines, soit 17% en moyenne des photosynthétats (Nguyen, 2003). Ces exsudats peuvent être des sucres, des acides aminés, des acides organiques, des flavonoïdes ou encore des composés volatils (Volatile Organic Carbon, VOC, Figure 22) (Pang et al., 2021).

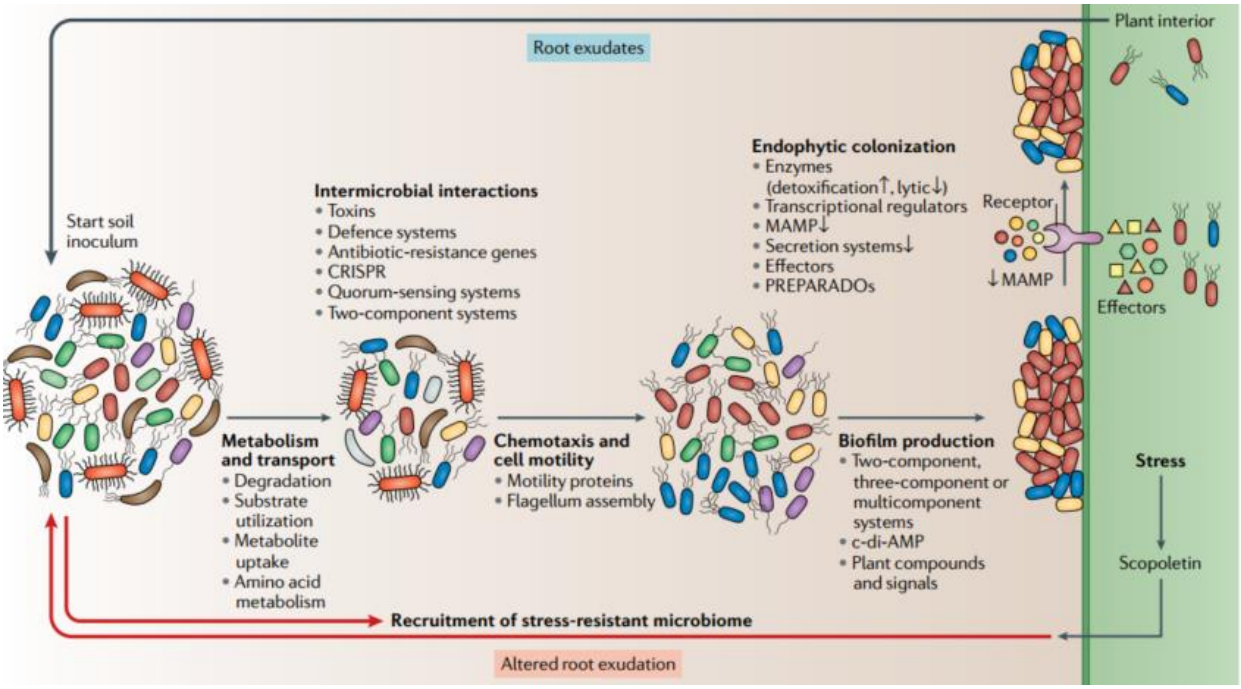


Figure 23 : Colonisation des racines et assemblage des communautés microbiennes de la rhizosphère. En réponse aux composés exsudés par la plante, les microorganismes sélectionnés vont se déplacer par chimiotactisme, et grâce au quorum-sensing produire du biofilm assurant la colonisation des racines. Le contournement du système immunitaire des plantes se fait par la synthèse à la surface bactérienne de structures mimant les surfaces des cellules végétales (PREPARADOs) et en réduisant l'expression des MAMPs (Microbial-Associated Molecular Patterns) (Trivedi et al., 2020).

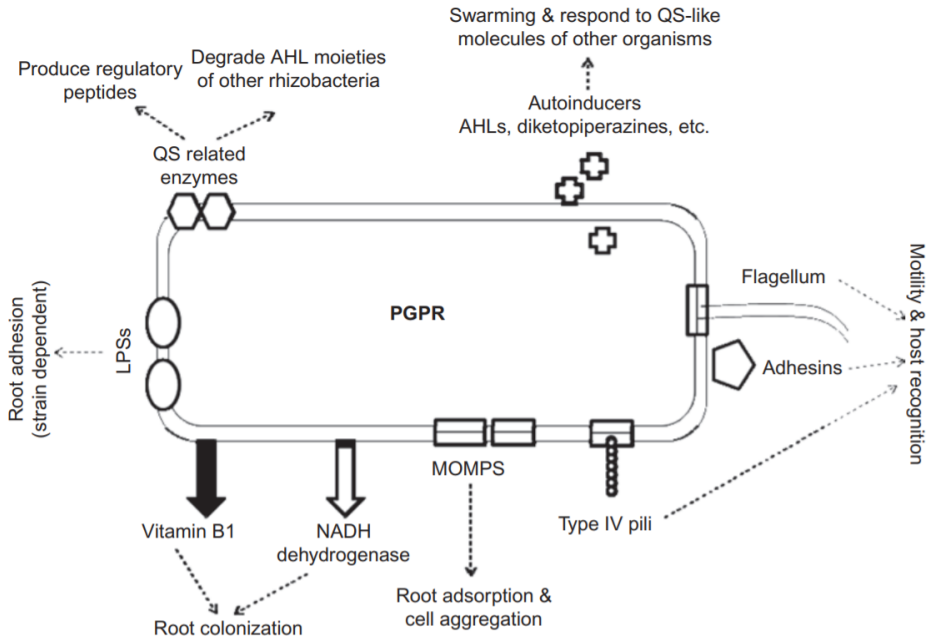


Figure 24 : Molécules produites par les souches PGPR impliquées dans la reconnaissance de l'hôte et sa colonisation. Les flagelles sont impliqués dans la reconnaissance et la motilité, les auto-inducteurs (AHLs) sont impliqués dans la communication entre microorganismes, les MOMPs (major outer membrane proteins) et les LPS (Lipopolysaccharides) facilitent l'adhésion aux racines et la vitamine B1 et la NADH deshydrogénase sont impliquées dans la colonisation.(Dutta and Podile, 2010).

Ces composés sont perçus par les microorganismes environnants et constituent des facteurs attractifs ou répulsifs. L'exposition à ces métabolites va engendrer chez les microorganismes de nombreux changements métaboliques, dont ceux liés à leur motilité (pili, flagelles). En effet, par chimiotactisme les microorganismes vont se déplacer contre le gradient d'exsudats d'intérêt pour atteindre les racines (Trivedi et al., 2020, Figure 23). Concernant la communauté bactérienne, la colonisation des racines va le plus souvent s'effectuer à travers la production d'un biofilm en surface. Le biofilm définit un mode de vie communautaire des microorganismes, contrairement à une forme de vie planctonique (sous forme cellulaire individuelle). Ces biofilms, composés d'une matrice extracellulaire complexe d'exopolysaccharides, entourant les bactéries qui s'y incluent, permettent une protection contre les agressions externes (antibiotiques, prédateurs, phages, etc, Costerton, 1999). L'élaboration des biofilms, et donc le succès de colonisation des racines est généralement sous la dépendance de signaux permettant un recensement de la densité bactérienne (ou quorum sensing) dans l'environnement proche, évaluant ainsi la probabilité de rencontre de partenaires potentiels.

Parallèlement à la colonisation des racines, les microorganismes ainsi recrutés doivent aussi pouvoir se maintenir et cohabiter dans la rhizosphère, et plus spécifiquement avec les défenses immunitaires de la plante-hôte. Par exemple, dans le cas des bactéries, celles si peuvent excréter des enzymes de détoxification des ROS (comme la superoxyde dismutase, la catalase ou la peroxidase), diminuer l'expression des Microbial-Assosiated Molecular Patterns (MAMPs) et exprimer à leur surface des molécules similaires à celles des plantes, appelées Plant-REsembling Plant-Associated and Root-Associated Domains (PREPARADOs), servant potentiellement de camouflage face aux défenses immunitaires de la plante (Trivedi et al., 2020).

Bien qu'une sélection des microorganismes puisse potentiellement diminuer la quantité de bactéries par rapport au pool de départ qu'est le sol, les exsudats, en tant que sources de nutriments vont permettre une multiplication importante des microorganismes et donc à une augmentation de la densité microbienne. Les racines sont donc abondamment peuplées d'une communauté complexe et spécifique appelée microbiome racinaire (Hacquard et al., 2015).

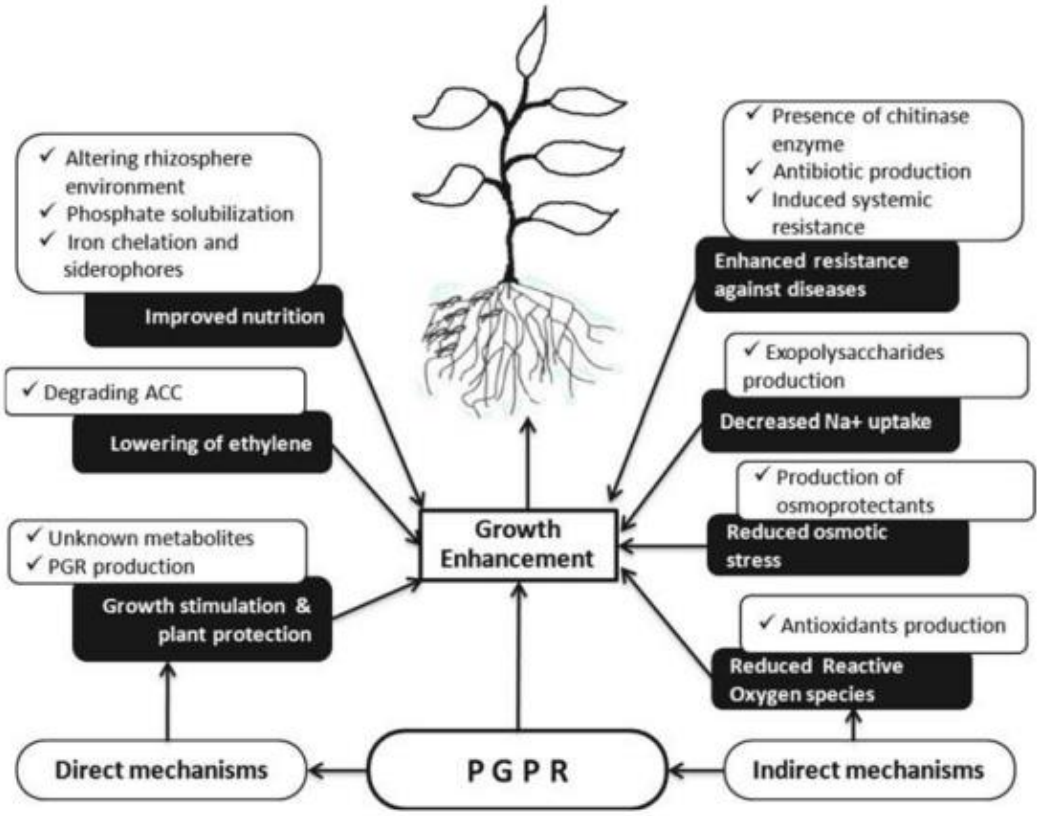


Figure 25 : Mécanismes utilisés par les PGPR pour l'amélioration de la croissance des plantes (Nadeem et al., 2013).

Dans le contexte particulier du colza, les microorganismes rhizosphériques (et particulièrement les champignons) sont de plus sous la contrainte forte de la présence de métabolites secondaires produits par la plante, appelés glucosinolates (Bressan et al., 2009). Il s'agit d'hétérosides soufrés dont la dégradation par une enzyme spécifique produit du glucose ainsi que des composés à propriétés biocides, comme les isothiocyanates (Grubb and Abel, 2006). L'exposition des communautés rhizosphériques à ces composés provoque une diminution de la diversité microbienne dans l'environnement du colza, mais aussi une augmentation de l'abondance de souches PGPR (Siebers et al., 2018). Dans cet environnement particulièrement contraint, nous avons choisi de centrer ce travail de thèse sur le potentiel des bactéries en tant que solution biointrant pour soutenir la croissance du colza.

B-3 Les fonctions du microbiome racinaire et rhizosphérique

Parmi l'ensemble de la population microbienne ayant répondu présent aux appels de la plante, une quantité considérable de fonctions peut ainsi également être sélectionnée. Dans la mesure où l'évitement des défenses immunitaires de l'hôte représente un facteur important de virulence, malheureusement, certains pathogènes peuvent aussi exister et prospérer dans la rhizosphère. Cependant, la stratégie de recrutement élaborée par la plante a plutôt vocation à recruter des microorganismes qui lui sont bénéfiques.

Ces microorganismes bénéfiques peuvent ainsi être impliqués dans les cycles biogéochimiques des nutriments d'intérêt pour la plante, mais aussi exercer un contrôle sur la population de pathogènes, ou encore limiter l'expression de leurs facteurs de virulence ou éliciter les défenses des plantes, ou d'autres peuvent simplement secréter des métabolites secondaires ou des enzymes qui vont agir comme signaux locaux pour augmenter la croissance de la plante. Les bactéries ayant ce type de fonction d'intérêt sont appelés « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » ou PGPR (Jacoby et al., 2017).

Différents traits PGPR peuvent coexister chez les microorganismes. Par exemple, la croissance racinaire peut être promue par la modification de l'équilibre entre l'acide Indole 3-Acétique (IAA – Indole 3-Acetic Acid, auxine) et l'éthylène (Chadwick and Burg, 1970). Ainsi, certaines PGPR ont la capacité de produire de l'auxine, mais aussi de dégrader les précurseurs de la synthèse d'éthylène, faisant pencher la balance de ce ratio en faveur de l'élongation racinaire (Goswami et al., 2016).

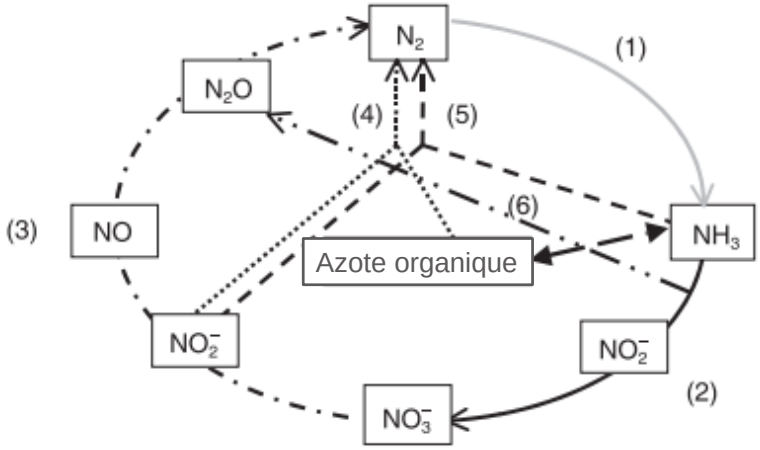


Figure 26 : Processus microbiens du cycle de l'azote ((1) fixation de l'azote atmosphérique, (2) nitrification, (3) dénitrification, (4) et (5) co-dénitrification,(5) voie anammox, (6) production d'oxyde nitreux conjointe à la nitrification (d'après Hayatsu et al., 2008).

Les bactéries productrices d'auxines représentent 80% des bactéries rhizosphériques. L'auxine favorise l'élongation racinaire en augmentant la division et la différenciation cellulaire, mais également l'élongation cellulaire (Goswami et al., 2016). Dans les cellules végétales, la présence d'auxine induit l'expression des gènes responsables de la synthèse d'éthylène (Glick et al., 2007). Celle-ci implique la synthèse d'un intermédiaire, le 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). Celui-ci est ensuite converti en éthylène par l'ACC oxidase. Certains microorganismes rhizosphériques PGPR peuvent dégrader cet ACC grâce à l'excrétion dans le milieu d'une enzyme, l'ACC déaminase. Cette enzyme convertit l'ACC en ammonium et en α-cétobutyrate. Le bénéfice est alors double, pour la plante et les microorganismes. La plante va ainsi pouvoir étendre sa surface d'exploration du sol grâce à l'élongation racinaire, et les microorganismes vont pouvoir utiliser l'ACC comme source de N (Glick et al., 2007).

D'autres molécules d'origine végétale peuvent également être synthétisées par les microorganismes telles que des hormones (cytokinines, gibbérellines, acide abscissique) mais sont nettement moins étudiées que la synthèse d'IAA ou la dégradation de l'ACC.

La stimulation de la croissance végétale peut également être appréhendée par des mécanismes indirects. L'amélioration de la mise à disposition d'éléments nutritifs pour la plante, bien que n'augmentant pas de manière directe la croissance, est néanmoins incontournable à l'augmentation de la biomasse. Le N et le P font parties des éléments nutritifs les plus limitants de la croissance végétale. Les microorganismes étant les acteurs principaux de la minéralisation de ces éléments, la présence de PGPR spécialisées dans ces fonctions semble alors primordiale pour soutenir la croissance végétale, dépendante de la présence dans l'environnement de ces formes minérales.

Concernant la mise à disposition de l'azote minéral, plusieurs voies microbiennes sont possibles (Figure 26, Hayatsu et al., 2008)), ainsi que plusieurs stratégies coopératives. Dans le cas de la fixation du diazote atmosphérique par exemple, celle-ci est réalisée par des bactéries du genre *Rhizobium*, mais est également possible chez d'autres genres bactériens. Certains *Rhizobium* peuvent fixer l'azote directement dans les sols, ou alors de manière symbiotique au sein d'une structure particulière mise en place chez les légumineuses : les nodules (Schneider and Huyghe, 2015).

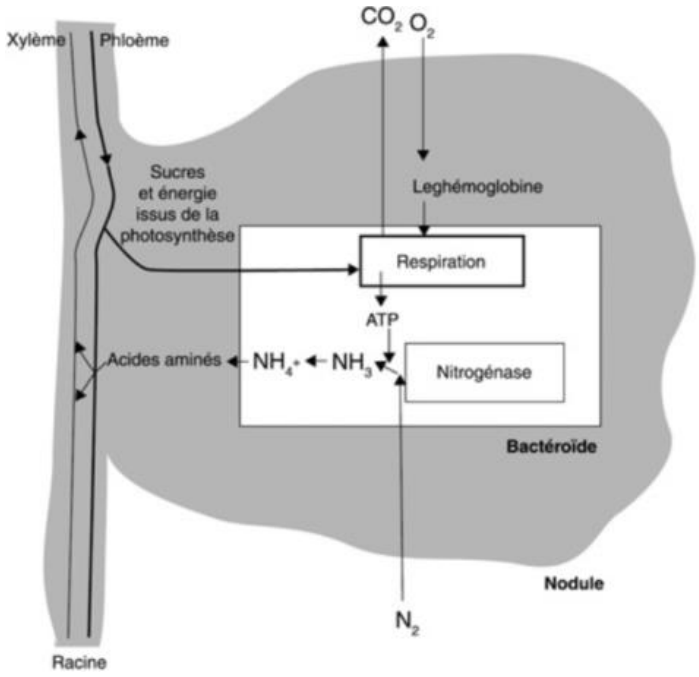


Figure 27 : Fonctionnement symbiotique des nodules chez les légumineuses. Après colonisation, la plante fournit une source de carbone par l'influx de sucres dans les nodules et synthétise localement de la leghémoglobine, créant une atmosphère microaérophile indispensable au fonctionnement de la nitrogénase des *Rhizobium* sous forme de bactéroïdes (Schneider and Huyghe, 2015).

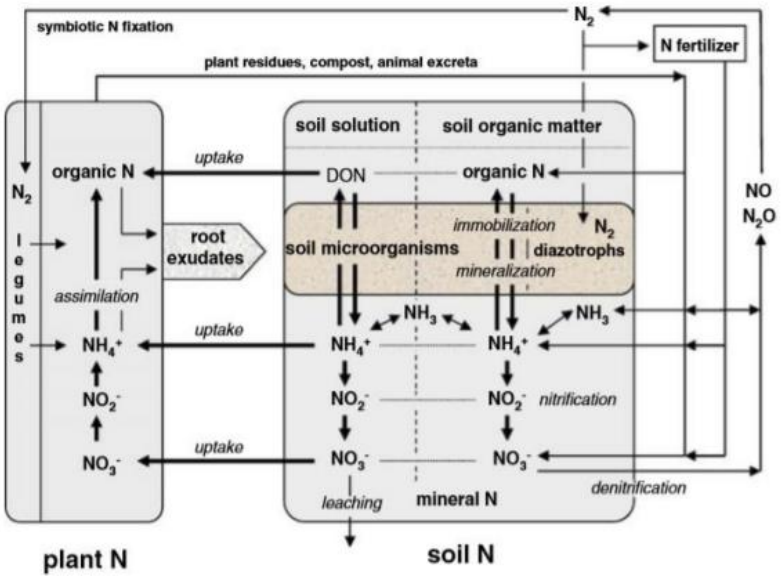


Figure 28 : Cycle de l'azote, voies de transformation régulées par des processus physiologiques microbiens, absorptions végétales et pertes dans l'environnement par lessivage et volatilisation (Richardson et al., 2009).

Au travers de cette association, la plante fournit une source de carbone pour les microorganismes, ainsi que les conditions physicochimiques favorables à la fixation de N_2 par la synthèse locale de leghémoglobine créant des conditions de microaérobie indispensable au processus de fixation du diazote (Figure 27). La coopération entre les plantes et les bactéries, de même, va s'opérer en plusieurs points des processus de minéralisation et de l'état d'oxydo-réduction de l'azote (Figure 28, Richardson et al., 2009). Ainsi selon les préférences nutritionnelles des plantes, celles-ci pourront acquérir le N sous forme nitrate ou ammonium

Parmi ces PGPR, certaines bactéries sont également capables d'oxyder le soufre présent dans le sol et le rendre ainsi disponible pour la plante. En effet, celui-ci n'est assimilable par la plante que sous forme sulfate (SO_4^{2-}), qui est le produit final de la minéralisation, tandis que 95% du soufre total du sol se présente sous forme organique (Banerjee and Yesmin, 2004; Zhao et al., 1997).

Enfin, les microorganismes peuvent également mettre à disposition le P pour la plante. Comme nous l'avons vu précédemment, le phosphate est souvent complexé aux particules d'argile, ou aux oxydes de fer et d'alumine présents dans les sols, et donc difficilement disponible voire même totalement indisponible pour la plante. Toutefois de nombreux microorganismes possèdent des mécanismes leur permettant de solubiliser ces formes complexées du P, fonctionnalités d'intérêt majeur dans un contexte de stimulation de la croissance des plantes. Les mécanismes permettant de mobiliser ce pool de P sont décrits dans le chapitre suivant.

B-4 Les PSB : des microorganismes à haut potentiel

Les PSB ont recours à tout un arsenal métabolique permettant de solubiliser le P et le rendre disponible dans la solution du sol. Dans la plupart de ces mécanismes, la solubilisation du P est souvent liée à l'acquisition ou l'utilisation d'autres éléments nutritifs, notamment liés aux cycles du carbone, du N et du fer. L'ensemble de ces mécanismes sera décrit dans ce paragraphe.

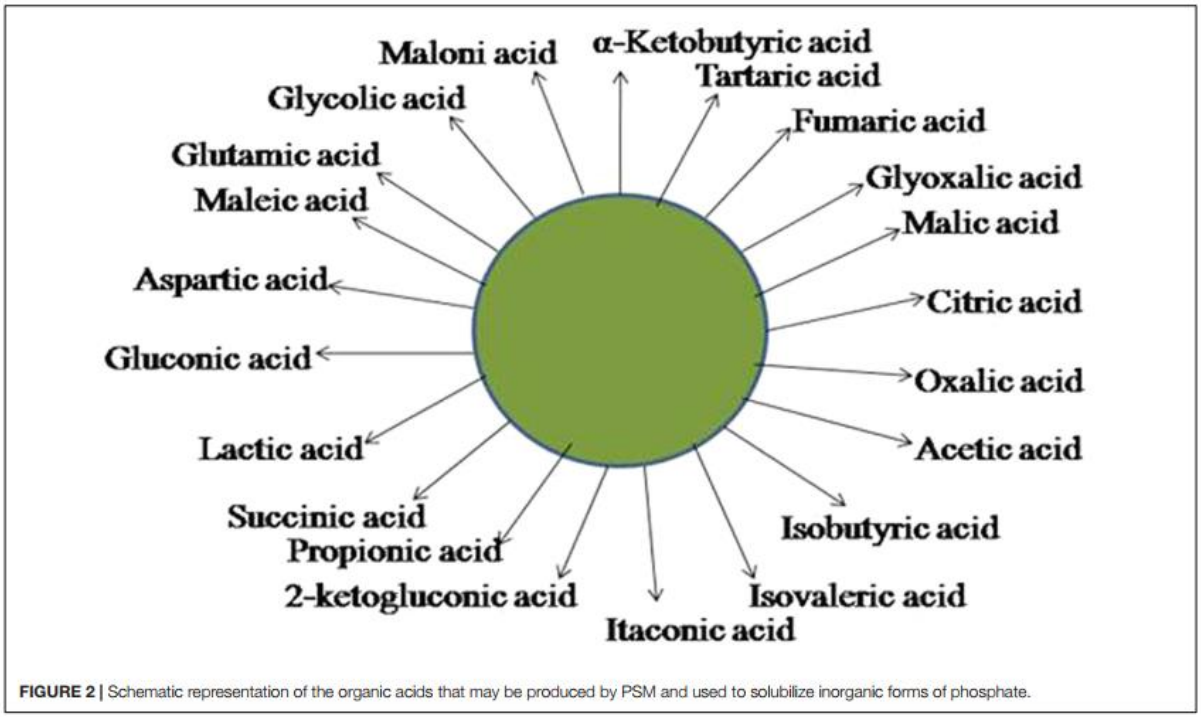


FIGURE 2 | Schematic representation of the organic acids that may be produced by PSM and used to solubilize inorganic forms of phosphate.

Figure 29 : Représentation schématique de la diversité des acides organiques produits par les PSB et utilisés pour la solubilisation du P inorganique (Alori et al., 2017).

L'un des mécanismes principaux de solubilisation repose sur l'excrétion dans le milieu extracellulaire d'acides organiques (Figure 30), principalement d'acide gluconique (Alori et al., 2017). Ces acides organiques sont issus de la dégradation de composés organiques, notamment des sucres, tel que le glucose à l'origine de l'acide gluconique. L'effet principal de la sécrétion d'acides organiques, tout comme ceux exsudés par les plantes réside dans l'acidification locale du sol, qui va entrainer des modifications des liaisons établies entre les ions phosphates et les particules d'argile chargées positivement.

Un autre moyen d'acidifier le milieu repose également sur la capacité des bactéries à émettre des protons, en règle générale grâce au fonctionnement d'antiports permettant l'acquisition du N. Les bactéries du genre *Pseudomonas*, principal genre bactérien décrit parmi les PSB connus avec *Bacillus* (Arkhipova et al., 2005; Babu-Khan et al., 1995; Lally et al., 2017; Park et al., 2009; Saxena et al., 2020), peuvent acquérir du N sous forme de NH_4^+ grâce à un antiport NH_4^+ / H^+ (Tian et al., 2021).

La remobilisation des ions phosphates complexés aux formes de fer s'effectue quant à elle à travers la production de sidérophores. L'acquisition de fer se fait exclusivement sous forme ferrique Fe^{3+}, extrêmement rare dans l'environnement et nécessite donc la sécrétion de composés ayant une très forte affinité pour le fer à cet état d'oxydation. Ainsi la libération du P est la résultante de la nécessité bactérienne d'acquérir un autre élément. A nouveau, la capacité de production de ces sidérophores est fréquemment rencontrée chez les PSB des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Gasser et al., 2015; Saxena et al., 2020).

La production de cyanure d'hydrogène (HCN) a été classiquement attribuée à un mécanisme de biocontrôle. Néanmoins cette classification est aujourd'hui remise en question. En effet, sa structure chimique présente un doublet électronique sur l'atome d'azote susceptible de réagir fortement avec le fer. Ce dernier est même inducteur de la production d'HCN (Rijavec and Lapanje, 2016). Contrairement aux sidérophores qui aident les bactéries à acquérir du fer ferrique dans le milieu, l'HCN aurait plutôt un rôle protecteur pour les bactéries en chélatant le fer, qui s'il se retrouve libre dans l'environnement est fortement toxique (Braun, 1997). La mise à disposition du P semble donc encore relever de l'externalité positive, tout comme pour les sidérophores. L'effet de biocontrôle serait obtenu (i) par une compétition défavorable pour les pathogènes pour l'acquisition de P, et donc une croissance bactérienne plus faible, et (ii) par la privation en fer, dont l'acquisition est essentielle à l'expression du potentiel de virulence (Payne, 1993).

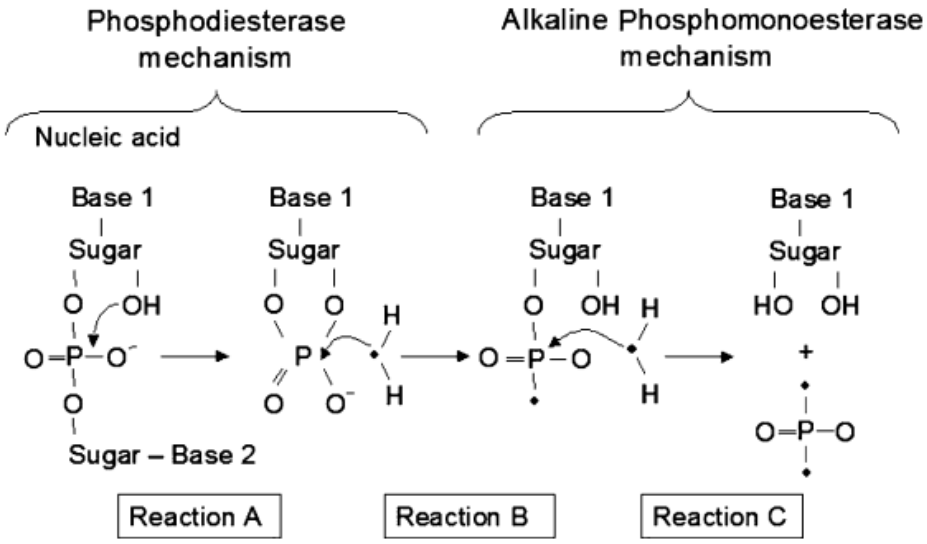


Figure 30 : Mécanismes consécutifs de la phosphodiestérase et de la phosphatase alcaline impliquant un réarrangement moléculaire (réaction A) et l'incorporation d'atomes d'oxygène (réactions B et C) permettant le dégagement du phosphate à partir des acides nucléiques (Nannipieri et al., 2011).

L'ensemble des mécanismes précités concerne la mise à disposition du P inorganique. Cependant, le pool organique de P représente aussi une réserve non négligeable dans les sols de grandes cultures, en proportions hautement variables (entre 20 et 50 % ; Hedley et al., 1982; Motavalli and Miles, 2002). Ainsi, la mise à disposition de phosphate par la minéralisation des sources organiques via l'activation d'enzymes spécifiques, pourrait donc constituer également un avantage stratégique important.

Les phosphatases sont une classe d'enzymes hydrolysant les liaisons phospho-esters et les liaisons phospho-anhydrides des molécules organiques. Ils appartiennent à plusieurs classes, comme par exemple les phosphomonoestérases (EC 3.1.3), les phosphodiestérases (EC 3.1.4), les hydrolases triphosphoriques monoesters (EC 3.1.5). Parmi les plus étudiées dans les sols, la phosphatase alcaline et la phosphatase acide appartiennent aux phosphomonoestérases (Figure 30). Ces deux enzymes hydrolysent notamment les liaisons monoesters des nucléotides et des sucres-phosphates (Figure 30, Nannipieri et al., 2011), permettant la libération de phosphate.

Le phytate (InsP6) représente la principale forme de P organique (Quiquampoix and Burns, 2007). Parmi les phosphomonoestérases, les phytases sont spécialisées dans la dégradation de l'InsP6, et sont donc de première importance dans la minéralisation du P. Les phytases sont classées en fonction de leur mode de fonctionnement (et donc de leur structure et spécificité de substrat – position de la liaison hydrolysée sur le centre inositol -) en quatre classes (Plassard et al., 2015):

- Les phosphatases acides à histidine
- Les phytases à hélice β
- Les phytases à cystéine
- Les phosphatases acides pourpres

L'ensemble des mécanismes décrits ici constituent de fait des caractéristiques d'intérêt particulièrement recherchés lors des criblages de microorganismes à potentialité de solubilisation du phosphore. De nombreuses études s'attachent aujourd'hui à mettre en évidence ce type de microorganismes dans l'objectif de développer des produits de type biointrants (Ahmad et al., 2006; Alori et al., 2017; Kumar et al., 2012). Il s'agit ici de pouvoir mettre en œuvre des PSB en tant qu'alternative possible à une minéralisation minérale, afin de soutenir la croissance des plantes.

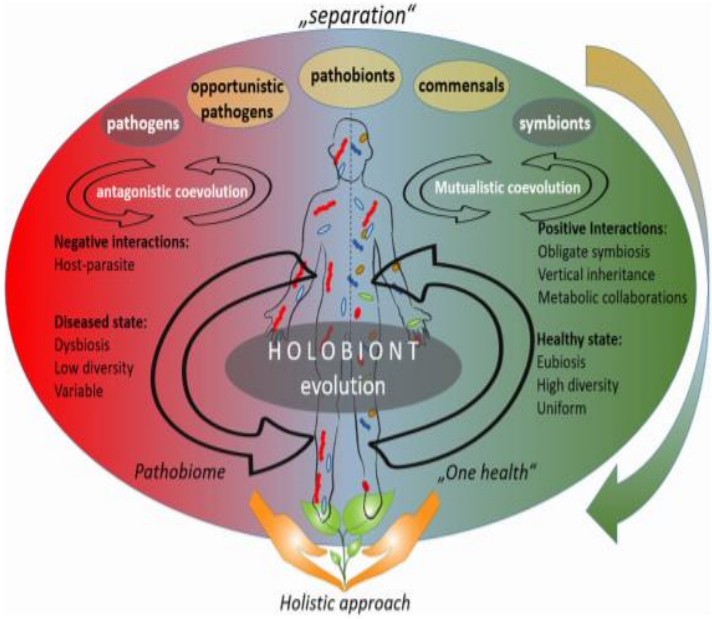


Figure 31 : Approche holistique de la compréhension des relations hôte-microorganismes. (Berg et al., 2020).

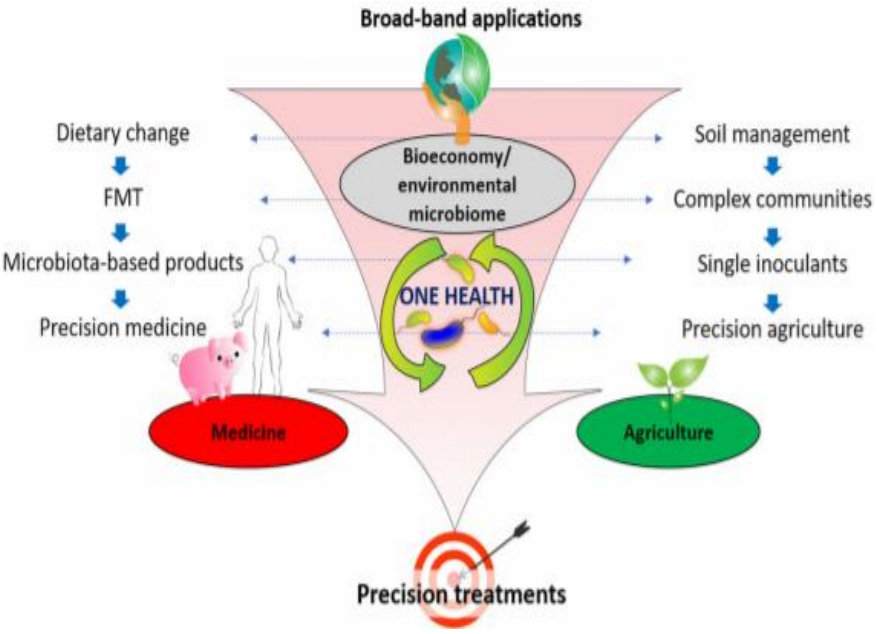


Figure 32 : Généralisation de l’approche par holobionte dans les domaines de la santé et de l’agriculture (Berg et al., 2020).

C. Intégrer les processus écologiques au sein des systèmes de culture pour une agriculture intégrée et durable

C-1. Cultiver l'holobionte

Le terme holobionte (« holo » signifiant « tout » et « bios » signifiant vie), apparu au tout début des années 1990, représente à cette époque la relation symbiotique d'un macroorganisme hôte et d'un microorganisme associé, leur coévolution et leur transmission au fil des générations.

Cette notion a évolué au fil des progrès scientifiques, et notamment pas la prise de conscience de l'abondance des microorganismes et de leurs rôles dans l'homéostasie de leur hôte. A titre d'exemple, l'holobionte humain est constitué d'à peu près autant de bactéries que de cellules humaines (Sender et al., 2016). De plus, si le génome humain comporte environ 20 000 gènes, une prise en compte plus holistique conduit à considérer l'hologénome en contenant, lui, plus de 33 millions (Lloyd-Price et al., 2016; The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

L'équilibre des relations hôte-microorganismes et des interactions microbiennes est au centre d'une rupture de paradigme dans la manière d'appréhender la santé des individus. En effet, des individus en bonne santé présenteraient ainsi un microbiote diversifié, stable et fonctionnel alors que des individus présentant des problèmes de santé auraient un microbiote associé peu diversifié, plus déséquilibré (Figure 31). On parle respectivement d'eubiose et de dysbiose (Berg et al., 2020). Ces notions peuvent être également étendues à l'environnement dans la mesure où la croissance végétale est elle-aussi conditionnée à la maitrise des agents pathogènes et à l'acquisition de nutriments dans l'environnement (Berg et al, 2020). Ainsi, modeler et maintenir un « phytobiome » adapté et performant pour soutenir la production végétale semble un « but à atteindre » pour une agriculture plus durable (Figure 32).

Le phytobiome se compose de trois compartiments principaux : rhizosphérique, endosphérique et phyllosphérique qui représentent autant de compartiments microbiens en interaction avec la plante à étudier (Figure 33), mais aussi de leviers à mobiliser pour soutenir une agriculture plus durable. Il apparait donc essentiel de s'attacher à mieux comprendre et valoriser les fonctionnalités des partenaires microbiens, et donc les interactions bénéfiques qui se mettent en place entre la plante et les microorganismes.

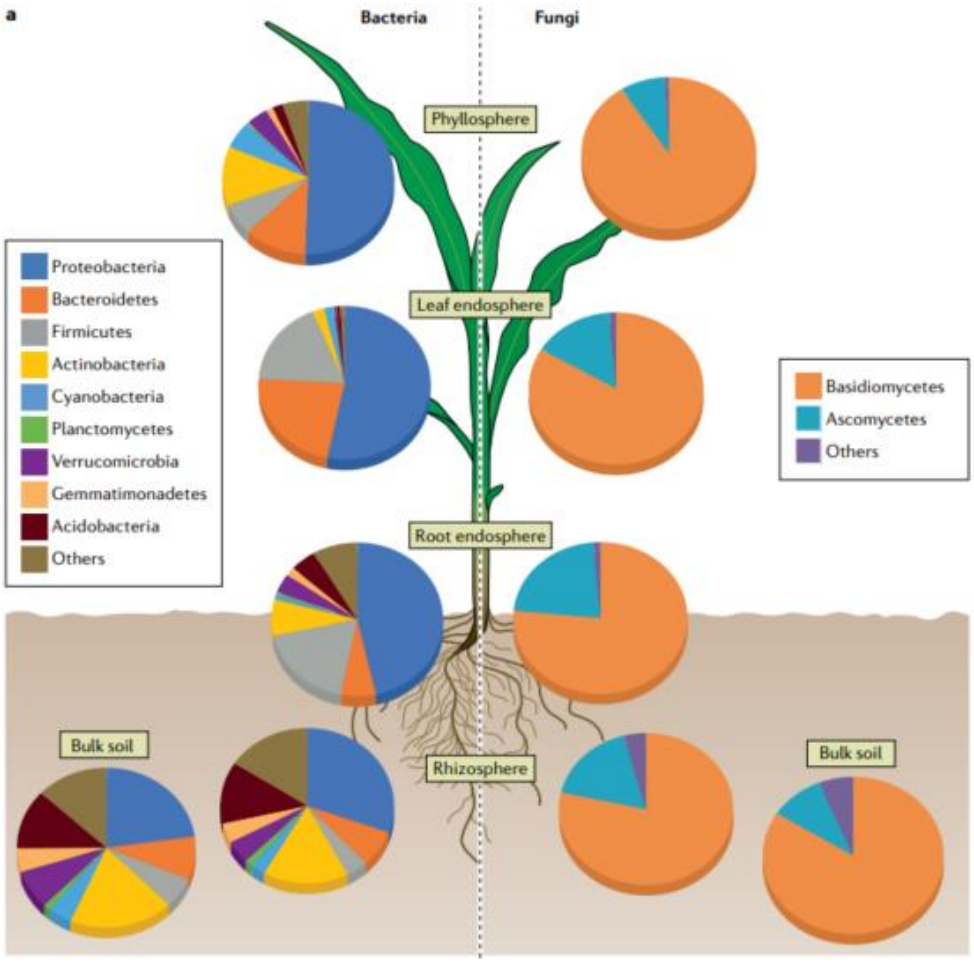


Figure 33 : Structures générales des communautés bactériennes et fongiques de diverses niches écologiques associées aux plantes. La composition du microbiome varie selon le compartiment de la plante. Les camemberts de gauche représentent les proportions relatives des phylums bactériens majeurs, à droite les phylums fongiques. (Trivedi et al., 2020).

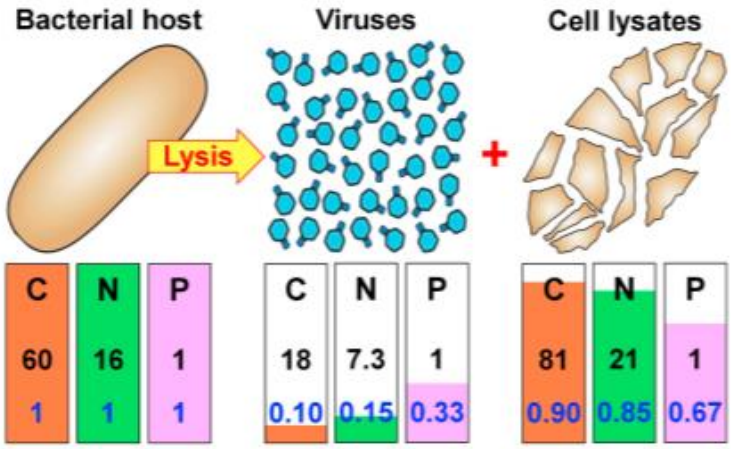


Figure 34 : Stœchiométries C : N : P des bactéries, bactériophages et nécromasse (cell lysates) normalisées en fonction de la bactérie hôte initiale (chiffres en bleu) ou bruts (chiffres en noir). Ces chiffres sont évalués pour un nombre hypothétique de virions fixé à 40 pour une bactérie infectée (Kuzyakov and Mason-Jones, 2018).

C-2. L'importance des chaines trophiques pour une meilleure efficience globale des nutriments.

Les nutriments ainsi mis à disposition sous l'action des microorganismes, peuvent-être disponibles à la fois pour les plantes, mais également pour les autres microorganismes environnants. Dans ce dernier cas, les nutriments consommés par les microorganismes deviennent à nouveau indisponibles (on parle par exemple d'immobilisation du N ou de P microbien). Toutefois, ils peuvent aussi constituer une réserve permettant leur redistribution progressive par le turnover de la biomasse microbienne (Jacoby et al., 2017; Richardson et al., 2009).

Ce turn-over microbien est dépendant de l'intensité des relations de prédation dans les sols et des changements de conditions abiotiques tels que des modifications des taux d'humidité des sols, ou des cycles de gels et de dégels, qui vont entrainer une augmentation de la lyse cellulaire, et par conséquent un recyclage des nutriments de la biomasse « morte » aussi appelée nécromasse (Plassard et al., 2015).

Parmi les facteurs biotiques régulant le turn-over de la biomasse microbienne, de nombreux acteurs entrent en jeu. En effet, les microorganismes peuvent subir des infections par des bactériophages. La production de nouveaux virus à partir du métabolisme bactérien, bien que consommatrice de ressources, permet le recyclage d'une grande majorité des nutriments de la nécromasse. Le ratio C / N / P des virus étant différent de celui des bactéries infectées, davantage de P microbien sera alloué au compartiment viral. On parle ainsi de shunt viral (Figure 34, Kuzyakov and Mason-Jones, 2018). Les bactéries peuvent également être les proies d'organismes plus grands tels que les protozoaires ou les nématodes bactérivores. Cette relation trophique particulière est connue sous le nom de « boucle microbienne » (Plassard et al., 2015). Les lysats cellulaires non digérés, ainsi que les excrétats pouvant être libérés à proximité des racines sont également à nouveau valorisables par les plantes et les microorganismes (Figure 35).

Ces informations illustrent l'importance de conserver un sol vivant, et donc fonctionnel pour soutenir la production végétale et pour améliorer l'efficience d'usage des nutriments pouvant être apportés sous forme d'engrais.

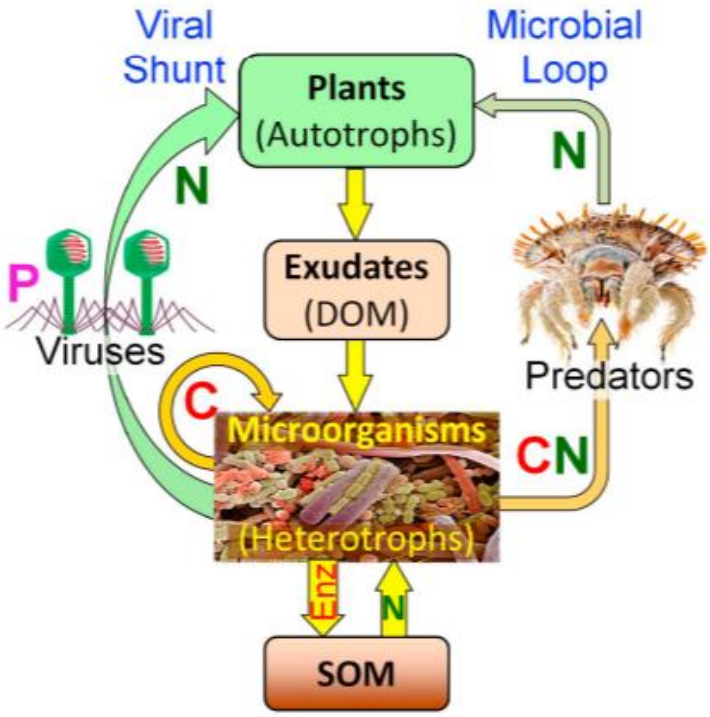


Figure 35 : Relations entre la plante, les microorganismes rhizosphériques et leurs relations trophiques, à droite la prédation (par des protozoaires, des nématodes bactérivores, etc) à gauche par les infections virales des bactéries dues à la présence de phages dans l'environnement. DOM : Dissolved Organic Matter, SOM : Soil organic Matter (Kuzyakov and Mason-Jones, 2018).

Chapitre III : Projet de recherche

A. Projet de recherche : Objectifs

A l'heure de l'émergence de l'agriculture de précision, et de l'amélioration des performances écologiques des grandes cultures (auxquelles les consommateurs sont de plus en plus attachés), il apparaît donc primordial de réduire les apports d'intrants, notamment sous forme chimique, limitant par la même occasion le risque de pertes dans l'environnement. Aux vues de l'exigence en nutriments de la culture de colza, réduire le niveau de fertilisation chez cette espèce nécessite de mieux comprendre les facteurs du déterminisme du rendement afin d'identifier les leviers potentiels de l'amélioration de ses performances agronomiques. Autrement dit, il s'agit de savoir comment préserver le rendement et la qualité des graines récoltées tout en fertilisant moins les cultures de colza. Une meilleure rationalisation ainsi qu'un meilleur équilibre entre les fertilisations N et P semblent être une voie intéressante à explorer afin d'améliorer les processus de remobilisation au cours de la sénescence de la plante, et ainsi améliorer l'efficience d'usage de l'azote, élément perfectible de sa croissance. De même, l'efficience d'usage des engrais phosphatés, dont le bilan est mitigé de par sa complexation rapide dans les sols, pourrait probablement être améliorée par la valorisation des compétences de souches microbiennes solubilisatrices de P. Néanmoins, bien que de nombreuses formulations soient disponibles sur le marché des biointrants, leurs résultats sont encore très variables et peu fiables. Aussi, une meilleure compréhension des facteurs régulant l'expression du potentiel de solubilisation *in situ* apparaît indispensable pour un usage pérenne de ces nouvelles solutions de biointrants.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse, réalisée en collaboration étroite entre l'UMR INRAe / Université de Caen-Normandie EVA et l'unité de recherche Aghyle de l'école polytechnique UniLaSalle Campus-Rouen. Elle est intégrée dans le projet Réseaux d'Intérêts Normands (RIN) EPURE (**E**hancing **P**lant n**U**t**R**ition and h**E**alth), financé par la région Normandie et a bénéficié de l'appui du Plan d'Investissement d'Avenir (PIA) RAPSODYN (optimiser le rendement du colza dans un contexte de réduction des intrants azotés) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Les objectifs généraux de cette thèse sont donc **(i)** d'optimiser les ratios de fertilisation N et P de la culture de colza et d'évaluer l'impact sur le rendement et la qualité des graines, **(ii)** de rechercher des souches PSB issues de sols Normands et de caractériser leur potentiel de solubilisation et de stimulation de la croissance végétale et enfin **(iii)**, d'évaluer leur potentiel de réintroduction dans l'environnement rhizosphérique du colza, et l'efficience *in planta* de leurs traits PSB et PGPR.

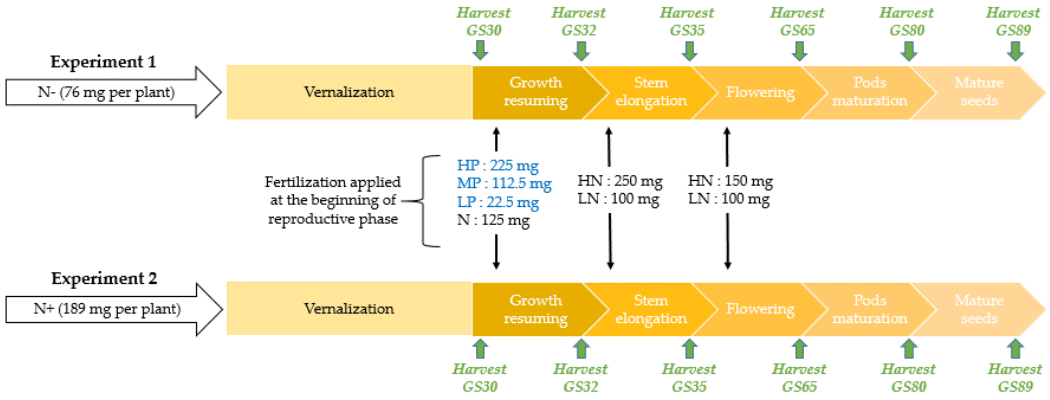


Figure 36 : Description des expériences en serre 1 (N-, plantes à faible statut N) et 2 (N+, plantes à fort statut N) avec les différentes fertilisations N et P apportées à la reprise de croissance, à la montaison, et au début de floraison. HN : high N, LN : low N, HP : high P, MP: medium P, LP: low P. Les quantités d'azote et de phosphore apportées sont exprimées en mg par plante.

B. Démarches expérimentales

B-1. Optimisation des ratios de fertilisation N :P du colza et impacts sur le rendement et la qualité des graines récoltées (Chapitre IV-A)

Afin de comparer différentes stratégies de fertilisation N et P, deux expérimentations en conditions contrôlées ont été réalisées sur le cycle complet de culture du colza. Au cours de ces deux expériences, 12 ratios de fertilisation N : P ont été générés (Figure 36). Les caractéristiques morphométriques (biomasses par organes, surface foliaire) ainsi que les analyses élémentaires N et P (par IR-MS et XRF respectivement) ont été déterminées à des stades clefs de la croissance du colza. Au stade final de la culture, la teneur en huile et en protéines, ainsi que le profil des acides gras ont été mesurés par NIRS. La teneur en phytate a été mesurée par Chromatographie Ionique Haute Performance.

B-2. Isoler et caractériser des PSB issus de sols Normands de grandes cultures sous des couverts végétaux ayant des préférences nutritionnelles variées (Chapitre IV-B)

Un criblage de souches PSB a été réalisé à partir de sols issus de deux parcelles agricoles présentant différents couverts. Dans le cadre du projet de recherche « VIVEPOIS » (nou**V**elle culture rég**I**onale au ser**V**ice de l'agro-**E**cologie : le **POIS** d'hiver), une première parcelle a bénéficié d'un dispositif cultural particulier. Cette parcelle, scindée en deux cultures séparées, était cultivée en colza ainsi qu'en pois d'hiver. Une seconde parcelle mise à disposition par la chambre d'agriculture de Seine-Maritime était cultivée en féverole. Des PSB ont été criblées sur deux milieux dédiés, à savoir les milieux Pikovskaya et NBRIP (Nautiyal, 1999; Pikovskaya, 1948). Des traits PGPR d'intérêts ont également été recherchés chez ces souches (productions de sidérophores, d'HCN, d'auxine, d'acide gluconique, activité ACC déaminase). Ces souches ont ensuite été identifiées par séquençage Sanger des portions V1-V2 de l'ADNr 16S. L'ensemble de ces résultats a ensuite été comparé en fonction du couvert végétal de départ.

B-3 Etude de l'effet de trois souches PSB provenant de sols prélevés sous trois couverts de grandes cultures différents, inoculées sur les plantules de colza et soumises à un gradient de fertilisation P (Chapitre IV-C1)

Parmi les souches obtenues précédemment, trois ont été testées *in planta*. Ces souches ont été sélectionnées en fonction des trois couverts d'origine, ainsi qu'en fonction de leur potentiel évalué *in vitro* lors du criblage.

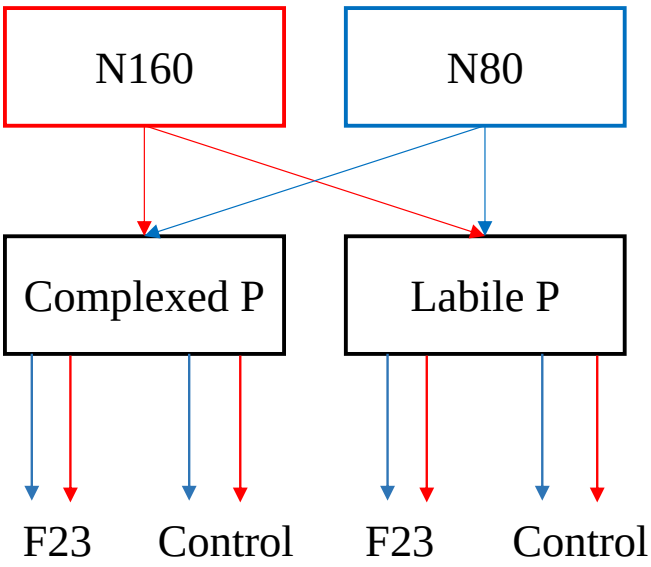


Figure 37 : Design expérimental de l'expérience en rhizotrons. Deux niveaux de fertilisation N ont été appliqués : un niveau élevé (N160 : 160 mg par plante) et un niveau faible (N80 : 80 mg par plante). Pour chaque niveau de fertilisation N, l'application de P a été réalisée sous forme complexée ou labile. Chaque combinaison N et P a été inoculé avec la souche F23 ou a reçu du NaCl 0.9 % en tant que témoin (Control).

Des tests complémentaires ont été réalisés de manière préliminaire, notamment en terme de quantification en milieu liquide de leurs capacités de solubilisation du tri-calcium P. Leurs profils métaboliques potentiels de dégradation de sources de carbone variées ont également été testés par l'utilisation du système Biolog® GEN III. Ces souches ont par la suite été inoculées à des jeunes plantules de colza au cours d'une expérimentation en serre, dans un sol de grande culture fortement déficient en P. Quatre niveaux de fertilisation P ont été appliqués. A l'issue de deux mois de cultures, les plantes ont été récoltées et des analyses élémentaires N et P ont été réalisées comme décrit précédemment.

En parallèle, les activités enzymatiques classiques liées aux cycles N et P ont été mesurées en laboratoire. Enfin, une analyse par métabarcoding de l'abondance et de la structure des communautés microbiennes associées à l'environnement racinaire du colza a été effectuée.

B-4 Etude de l'effet d'une souche présentant des caractéristiques PSB et PGPR sur la croissance et le statut N et P du colza ainsi que sur ses traits racinaires, en conditions axéniques et soumises à deux ratios de fertilisation N : P. (Chapitre IV-C2)

La souche F23 ayant démontré les meilleures performances au cours de l'expérimentation en serre précédente a de nouveau été testée sur la croissance des jeunes plantes de colza dans des conditions axéniques, en sable autoclavé, afin de confirmer son potentiel PGRP. Cette expérience a été conduite avec l'application de deux niveaux de fertilisation N et avec un apport de P soit sous forme labile, soit sous forme complexée (Figure 37). Une augmentation de la biomasse racinaire ayant été observée précédemment par l'application de cette souche, cette expérience a été menée en rhizotrons afin de mesurer la longueur racinaire totale, le diamètre racinaire moyen, et la surface racinaire totale par l'utilisation d'un scan racinaire couplé au logiciel de mesure automatique Winrhizo™. Une fois encore, les caractéristiques morphométriques et les statuts N et P des plantes ont été évalués comme décrit précédemment.

Chapitre IV :

Résultats

A. Optimisation des ratios de fertilisation N : P du colza et impacts sur le rendement et la qualité des graines récoltées

Hypothèse : Une amélioration de la mise à disposition du P favorise la remobilisation et l'absorption de l'azote au cours du cycle de culture du colza, permettant ainsi une réduction de la fertilisation azotée, sans modifier le rendement ni la qualité des graines.

Objectif : L'objectif est de comparer différentes stratégies de fertilisation N et P se différenciant par la dose apportée à la reprise de croissance post-vernalisation afin d'optimiser les ratios de ces deux éléments. Cette optimisation permettait alors une réduction des intrants N et P sans modifications du rendement et de la qualité des graines.

Méthodologie : Deux expérimentations en serre ont été réalisées en conditions de forte ou faible mise à disposition de l'azote aux stades rosette du colza. Après une période de 10 semaines de vernalisation, chacune des cultures a été fertilisée en N de manière fractionnée en trois fois (Figure 37) selon les pratiques recommandées aux champs selon deux doses (High N ou HN : recommandation de fertilisation N, et Low N ou LN . diminution d'un tiers des apports). Au cours du premier apport N, trois niveaux de fertilisation P ont également été mis en place (Low P ou LP : 10 % de la fertilisation apportée au champ, correspondant à la fraction potentiellement disponible dans les sols, Medium P ou MP, correspondant à 50 % de mise à disposition du P et enfin High P ou HP correspondant à une fertilisation P élevée). Des récoltes ont été effectuées à différents stades phénologiques (sortie de vernalisation, reprise de croissance, montaison, floraison, remplissage des siliques et à maturation complète) afin d'évaluer les contenus en éléments N et P des différents organes, les composantes de l'efficience d'usage du N et du P, ainsi que le rendement et la qualité des graines obtenues.

Principaux résultats : Ces cultures ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de l'azote apporté avant la vernalisation dans la détermination de la qualité de la graine, orientant la culture vers la filière huile ou protéines. Ces travaux ont démontré que des niveaux de fertilisation N et P réduits et équilibrés pouvaient ne pas impacter le rendement tout en garantissant des critères de qualité recherchés, soulignant la grande plasticité physiologique du colza.

Les résultats de ces travaux sont regroupés dans un article dont la soumission sera faite prochainement à Plants : *« Interactions of Nitrogen and Phosphate fertilizations on rapeseed agronomic performances and seed quality : a powerful lever to determine the products fate in a sustainable manner ? »*. Des résultats concernant les différents indices agronomiques (PAE, (PAE, NAE, NUtE, NHI, PHI et PUE) sont également présentés en annexe. Les résultats préliminaires de ce traivail ont également été présentés sous forme de communication affichée à la neuvième édition de l'International Phosphorus Workshop en 2019 à Zurich (Annexe 2)

Article

Interactions of Nitrogen and Phosphate fertilizations on rapeseed agronomic performances and seed quality: a powerful lever to determine the products fate in a sustainable manner?

Charlotte AMY [1,2], Mélanie BRESSAN [2], Karine LAVAL [2] and Jean-Christophe AVICE [1,*]

[1] Normandie Univ, UNICAEN, INRAE, UMR EVA, SFR Normandie Végétal FED4277, Esplanade de la Paix, 14032 Caen, France
[2] UniLaSalle, AGHYLE Research Unit UP 2018.C101, Rouen Team, 3 Rue du Tronquet, F-76134 Mont-Saint Aignan, France
* Correspondence: jean-christophe.avice@unicaen.fr

Abstract: Rapeseed is a major oleoproteaginous crop characterized by high N and P requirements. Meanwhile little is known regarding N : P interactions on growth, nutrient partitioning and use efficiency, seed yield and quality. To address these questions, two greenhouse experiments were carried out (i) with low and high N fertilization in order to obtain plants with contrasted N status before vernalization (N- and N+ plants), and (ii) with different levels of crossed fertilizations in N (High N , Low N) and P (High P, Medium P, Low P) applied at the growth resuming. Our results highlited the importance of the rosette vigor and their N nutritionnal status at the end of vernalisation to determine seeds quality and their industrial fate. Indeed, whatever the level of N and P fertilization applied at the beginning of reproductive phase (from bolting to early flowering), N- plants showed better oleic traits while N+ plants could be employed in the vegetal protein sector. In addition, our results suggest that N and P fertilizations could be reduced without significant decline of seed yield or quality in terms of fatty acids composition and phytate content. Taken together, these results highlight that rapeseed growth and environmental balance can be improved by sobriety in N and P fertilization while maintaining seed yield and quality.

Keywords: Rapeseed; N and P fertilization ; N Use Efficiency ; P Use Efficiency ; seed yield ; phytate ; oil content ; protein content.

1. Introduction

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is major crop at the global scale presenting valuable industrial characteristics. Indeed, rapeseed is the second global oleoproteaginous crop produced in 2021 (70 mT) after soybean (360 mT) [1]. Application extent comprises production of edible oil, bio-fuel and proteins, recovered in meal or in several industrial sectors for their texturing properties [2,3] Despite the high valuation of rapeseed products, ecological performances of this crop could be improved. Indeed, rapeseed requires high N (Nitrogen) and P (Phosphorus) fertilizations [4,5] that could be sources of pollutions such as water eutrophication and greenhouse gas emissions [6].

While rapeseed can be used as a catch crop due to its high ability to absorb nitrate, only 50% of N from fertilizers is finally present in seeds, leading to a low N Use Efficiency (NUE) [7]. NUE combines N Absorption Efficiency (NAE) and N Utilization Efficiency (NUtE) [8] which reflects the ability of the plant to assimilate inorganic N in organic matter, and to remobilize it from vegetative organs (i.e. from leaves) towards reproductive organs to sustain seed yield. In rapeseed, low apparent NUE is due to weak N remobilization during leaf senescence [9,10]. N losses in fallen leaves can represent 2 to 3.5 % of leaf dry biomass [11]. As a vast majority of nutrients is absorbed during vegetative stage, so called "yield potential elaboration", enhancing remobilization could represent a powerful lever to increase NUtE and therefore to optimize yield potential expression [7]. As for NUE, *Brassica* cultivars showed considerable genetic diversity in terms of biomass accumulation, contents of P in shoots and roots, and P use efficiency (PUE) [12,13]. In a study on 355 accessions and various commercial cultivars or doubled haploid lines of *Brassica oleracea* L., Hammond et al. (2009) [12], have reported that shoot yield drives PUE and that root development and architecture correlate with PUE in particular, lateral root number, length, and growth.

Several studies have shown a positive effect of N and P individual fertilization on seed yield [14–17]. However, a lack of information exists regarding the effects of N and P fertilization interactions and N : P ratios in plants on potential yield elaboration, and therefore on agronomic performances of rapeseed and seed yield and quality. Regarding interactions between N and P status on plants, P starvation has been demonstrated to decrease the synthesis of cytokinin and their receptor [18]. Cytokinin are proposed to regulate numerous enzyme activities, including a down-regulation of Nitrate Reductase (NR) and Glutamine Synthase / Glutamine oxoglutarate aminotransferase (GS/GOGAT). Thus, P deprivation may lead to a lack of N incorporation in amino acids, leading to nitrate accumulation in roots and finally to a decrease in N uptake, independently to plant N status. [19,20]. In a field experiment on canola, Ma and Zheng (2016) [21] have reported that P uptake under adequate P supply conditions was largely enhanced by N application. It has been proposed that unclear N effects on P utilization by plants were due to their use in separate macromolecules and metabolic pathways *(i.e.* in amino acids for N and in nucleotides or in phospholipids for P). Nevertheless, it has been demonstrated in wheat and rice that N nutrition status controlled transcription factors implied in the phosphate starvation response [22] but few is known about N effect on P use by plants in a non-starvation context.

In this context, it is of importance for farmers to meet adequate N and P fertilization ratio for sustainable performance of rapeseed crops with higher agronomic performances, preserved seed yield and high-quality products. The aim of our study was to assess the effects of various N and P fertilization conditions and contrasted yield potential on rapeseed growth, N and P fluxes, seed yield and quality. We hypothesized P fertilization

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Plants* **2021**, *10*, x. https://doi.org/10.3390/xxxxx

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Table 1. Seed yield, harvest index (mean ± SD) observed in plants subjected to (a) N- cultivation (experiment 1) or (**b**) N+ cultivation (experiment 2) during the vegetative stage and to different levels of N and P fertilization during the beginning of reproductive phase (LN, HN, LP, MP and HP). Seed yield is expressed as g of seeds per plants, HI: Harvest Index expressed as percentage.

		Seed yield				HI			
N-	HP HN	2.80	±	1.01	a	14.32	±	3.29	a
	HP LN	2.45	±	0.07	a	12.79	±	0.55	ab
	MP HN	2.68	±	0.42	a	13.70	±	2.23	a
	MP LN	2.29	±	0.23	a	13.59	±	0.41	a
	LP HN	2.62	±	0.25	a	14.58	±	0.3	a
	LP LN	2.35	±	0.24	a	13.89	±	0.41	a
N+	HP HN	2.02	±	0.38	a	8.82	±	1.71	b
	HP LN	2.48	±	1.18	a	11.23	±	5.19	ab
	MP HN	2.86	±	0.49	a	12.65	±	2.83	ab
	MP LN	2.37	±	0.67	a	10.92	±	3.10	ab
	LP HN	2.55	±	0.71	a	11.63	±	3.53	ab
	LP LN	2.58	±	0.08	a	11.04	±	0.8	ab

adjustment can improve PUE as well as NUE, thus allowing to reduce P and N fertilizations without modifying seed yield and quality.

2. Results

In the present study, two cultivations were conducted with 2 different levels of pre-vernalization N fertilization (Figure 1) in the aim to obtain plants with contrasted N status (low N (N-) versus high N (N+)) before the transition between vegetative and reproductive stages. Both received various levels of P and N fertilizers at the onset of reproductive stage to mimic field fertilization practices and to investigate the impacts N:P interactions on the dynamics of physiological and agronomics traits and on seed yield and grain quality.

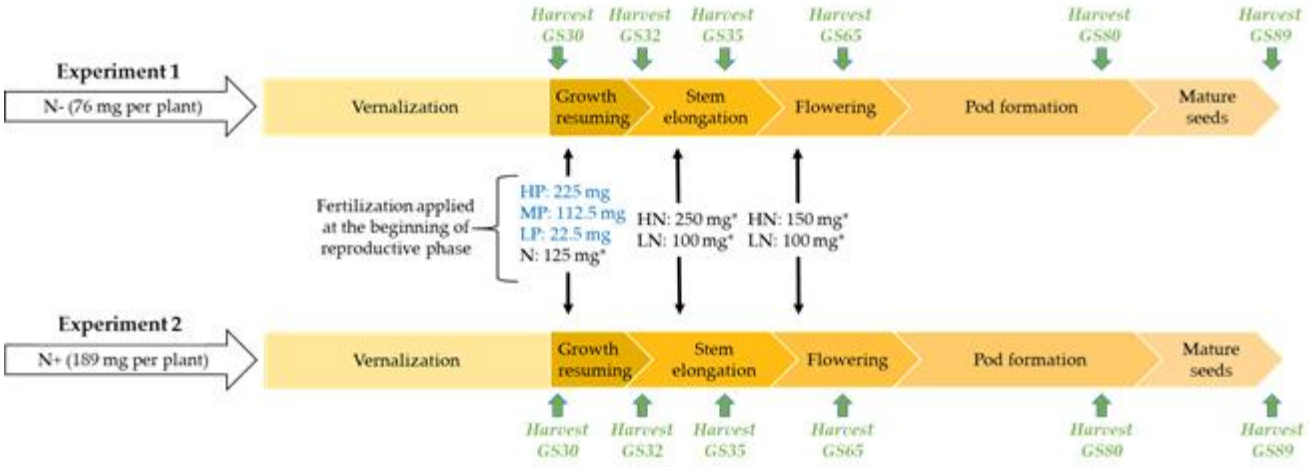


Figure 1. Description of experiment 1 (N- plants) and 2 (N+ plants) in combination with various N and P fertilizations supplied at the onset of reproductive stages. HN : High N, LN : Low N, HP : High Phosphate, MP : Medium Phosphate, LP : Low Phosphate. The amounts of N and P fertilization are given in mg per plant. Asterix indicated that ^{15}N tracer was incorporated in N fertilizers at the excess of 2.5 atom%. Plants were harvested at different growth stages (GS) determined on the basis of BBCH scale

2.1. Agronomic performances of rapeseed crop according to N status of plants at vegetative stage and in responses to various subsequent P and N fertilizations.

2.1.1. Seed yield, harvest index and components of N use efficiency

Whatever the level of N (HN, LN) and P (HP, MP, LP) fertilizations applied at the beginning of reproductive phase, seed yield was similar in N- and N+ experiments (in average 2.53 ± 0.44 g per plant and 2.48 ± 0.62 g per plant, respectively, Table 1). These similar seeds yields are linked to various agronomic performances. Harvest Index (HI) was not influenced by neither P nor N fertilization (Table S1), despite pre-vernalization N fertilization differences. Lowest HI was found in N+-HP-HN (Table 1) and was significantly lower compared to HI of N- cultivation, except for HP-LN.

Nitrogen Harvest Index (NHI) varied according to N- or N+ cultivations (Table 2). NHI was generally higher in N- plants, except for HP-LN and MP-HN which tended to show lower values (48.73 and 49.71 % respectively). NHI for N+ plants were generally lower, except for HP-LN and MP-HN (39.61 and 43.43 % respectively) which were higher and close from results obtained in N- plants. Two-ways ANOVA (Table S1) indicated a P: N interaction effect on NHI for N+ plants. Indeed, under MP fertilization, LN fertilization significantly decreased NHI when compared to HN fertilization (43.43 vs 26.56 %).

Table 2. N-linked agronomic indices (mean ± SD) observed in plants subjected to (a) N- cultivation (experiment 1) or (b) N+ cultivation (experiment 2) during the vegetative stage and to different levels of N and P fertilization during the beginning of reproductive phase (LN, HN, LP, MP and HP). HI: Harvest Index, NHI: N Harvest Index, NAE: N Absorption Efficiency, NUtE: N Utilization Efficiency, NUE: N Use Efficiency and 15NHI: 15N Harvest Index. Letters indicate significant differences in one index between all fertilization levels in both N- and N+ experiments.

		NHI		^{15}NHI		NAE		NUtE		NUE	
N-	HP HN	52.51 ± 8.35	a	58.84 ± 8.29	abc	26.65 ± 6.93	c	19.82 ± 2.74	a	5.34 ± 1.92	bcd
	HP LN	48.73 ± 7.32	abc	62.01 ± 18.60	a	42.01 ± 3.58	b	18.03 ± 1.28	a	7.55 ± 0.22	a
	MP HN	49.71 ± 3.51	ab	57.41 ± 3.37	abcd	26.29 ± 5.78	c	19.70 ± 2.72	a	5.10 ± 0.80	c
	MP LN	51.94 ± 1.29	a	58.52 ± 1.02	abc	38.15 ± 2.77	bc	18.42 ± 0.53	a	7.04 ± 0.71	ab
	LP HN	52.83 ± 3.39	a	60.55 ± 3.92	ab	25.78 ± 3.38	c	19.45 ± 0.83	a	5.00 ± 0.47	cd
	LP LN	51.97 ± 5.62	a	59.38 ± 7.36	ab	38.30 ± 1.32	bc	18.90 ± 1.74	a	7.24 ± 0.74	ab
N+	HP HN	30.98 ± 4.71	de	35.55 ± 4.73	ef	49.27 ± 1.48	b	7.84 ± 1.60	b	3.86 ± 0.72	d
	HP LN	39.61 ± 10.28	bcd	44.52 ± 10.04	cdef	67.82 ± 17.91	a	10.19 ± 3.39	b	7.10 ± 3.36	abcd
	MP HN	43.43 ± 3.88	abc	50.32 ± 2.09	abcd	49.10 ± 4.49	b	11.04 ± 1.05	b	5.45 ± 0.94	cd
	MP LN	26.56 ± 11.42	e	30.47 ± 12.42	f	68.74 ± 18.95	a	9.89 ± 0.95	b	6.78 ± 1.91	abc
	LP HN	37.84 ± 9.34	cde	43.82 ± 10.22	def	46.60 ± 1.42	b	10.53 ± 2.79	b	4.85 ± 1.35	cd
	LP LN	40.50 ± 3.32	bcd	46.77 ± 4.92	bcde	73.10 ± 2.05	a	10.08 ± 0.31	b	7.37 ± 0.23	ab

Table 3. P-linked agronomic indices (mean ± SD) observed in plants subjected to (a) N- cultivation (experiment 1) or (b) N+ cultivation (experiment 2) during the vegetative stage and to different levels of N and P fertilization during the beginning of reproductive phase (LN, HN, LP, MP and HP). PHI: P Harvest Index, PAE: P Absorption Efficiency, PUtE : P Utilization Efficiency and PUE: P Use Efficiency. Letters indicate significant differ

rences in one index between all fertilization levels in both N- and N+ experiments.

		PHI		PAE		PUtE		PUE	
N-	HP HN	45.40 ± 4.94	a	19.37 ± 4.57	d	62.90 ± 39.29	ab	10.99 ± 3.96	cde
	HP LN	41.71 ± 0.57	a	18.19 ± 1.54	d	53.23 ± 5.83	ab	6.62 ± 0.28	de
	MP HN	39.94 ± 6.39	a	25.25 ± 5.74	cd	77.50 ± 17.8	a	18.81 ± 2.94	bc
	MP LN	43.75 ± 4.47	a	26.77 ± 1.52	cd	60.29 ± 14.21	ab	16.05 ± 1.62	bcde
	LP HN	45.01 ± 2.67	a	63.56 ± 9.17	ab	80.33 ± 23.37	a	49.97 ± 4.68	a
	LP LN	38.63 ± 13.26	a	55.39 ± 11.5	b	82.10 ± 9.59	a	44.83 ± 4.58	a
N+	HP HN	22.15 ± 2.18	c	24.4 ± 1.53	cd	32.83 ± 8.09	b	9.00 ± 1.68	e
	HP LN	25.4 ± 11.07	c	23.82 ± 4.16	cd	39.78 ± 14.54	b	11.04 ± 5.23	de
	MP HN	37.67 ± 6.1	ab	32.20 ± 3.29	c	62.35 ± 9.61	ab	25.42 ± 4.39	b
	MP LN	27.27 ± 2.51	bc	30.24 ± 3.47	c	54.40 ± 10.36	ab	21.10 ± 5.93	bcd
	LP HN	23.56 ± 6.11	c	61.57 ± 1.28	ab	79.08 ± 23.51	a	113.2 ± 31.52	a
	LP LN	25.62 ± 0.72	c	69.66 ± 9.46	a	71.29 ± 8.97	a	114.6 ± 3.57	a

Labelled N Harvest Index (^{15}NHI, Table 2) tended to be higher in the N- plants (59.45 ± 7.79 %). Here, neither N nor P fertilizations were shown to significantly infuence ^{15}N allocation in seeds (Table S1). The average ^{15}NHI in N+ plants was 41.91 % and showed significant variations according to PxN interactions (Table S1). Indeed, under MP fertilization, ^{15}NHI in LN was significantly lower (30.47 %) than in HN fertilization (50.32 %), while ^{15}NHI tended to be higher for LN plants in other P fertilization treatments (Table 2).

N Absorption Efficiency (NAE) was generally higher in N+ plants (Table 2). A significant N effect was observed on NAE in both N- and N+ plants (Table S1). Under HP conditions (for N- and N+ plants) or under MP and LP conditions (for N+ plants), NAE was significantly higher in plants with LN fertilization when compared to HN fertilization.

N Utilization Efficiency (NUtE) significantly varied according to the N status observed in plants at the end of vegetative stage. Indeed, NUtE was significantly improved in N- plants (2-fold higher) when compared to N+ plants (Table 2). N Use Efficiency (NUE) was influenced in both N- and N+ plants by N fertilization levels. In N- plants, NUE was systematically higher in LN fertilization level (Table 2). In N+ plants, this difference was significant only for LP fertilization (HN: 4.85 and LN: 7.37), but NUE tended to be higher in LN conditions for other P fertilization levels (Table 2).

2.1.2. P harvest index and components of P use efficiency

Phosphorus Harvest Index (PHI, Table 3) was higher in N- plants (42.41 %). No difference of PHI was found according neither to N nor P fertilization treatments. PHI in N+ plants was 26.69 % and varied with P fertilization (Table S1). Indeed, MP treatments increased PHI (+ 8 %) compared to HP and LP (Table 3). Finally, in MP-HN fertilization showed the highest PHI (37.67 %) which was significantly different to all other fertilization treatments, except MP-LN (27.27 %).

P Absorption Efficiency (PAE) tended to decrease in N- plants compared to N+ plants (Table 3). PAE was clearly influenced by P fertilization (Table S1). In both N- and N+ plants, LP fertilization strongly enhanced PAE, representing an increase between +72 % and +283 % (Table 3).

P Utilization Efficiency (PUtE) showed the same range of results in both N- and N+ plants (Table 3). No difference were found in N- plants while a P fertilization effect was found in N+ plants (Table S1) but as expected, PUtE tended to decrease with the increase of P fertilization. This effect is significant in N+ plants. Indeed, LP fertilization led to an average PUtE at 75.18 while MP and HP were at 58.38 and 36.31 respectively (Table 3).

P Use Efficiency (PUE) were also similar between N- and N+ plants (Table 3). Once again, a significant P effect was observed in both N- and N+ plants (Table S1). In the same way as PUtE, PUE significantly decreased while P fertilization increased. In N- plants, PUE increased between 4 and 8 folds for LP fertilization in comparison with MP and HP, while in N+ plants, similarly, PUE increased between 10 and 13 folds (Table 3).

2.2. Components of seed quality

2.2.1. Oil, protein and phytate contents

Two-way ANOVA revealed an effect of N level of fertilization and of P:N interaction on oil content (Table S1) while no differences were found regarding protein content. Relative contents of oil and proteins in seeds differed largely between N- and N+

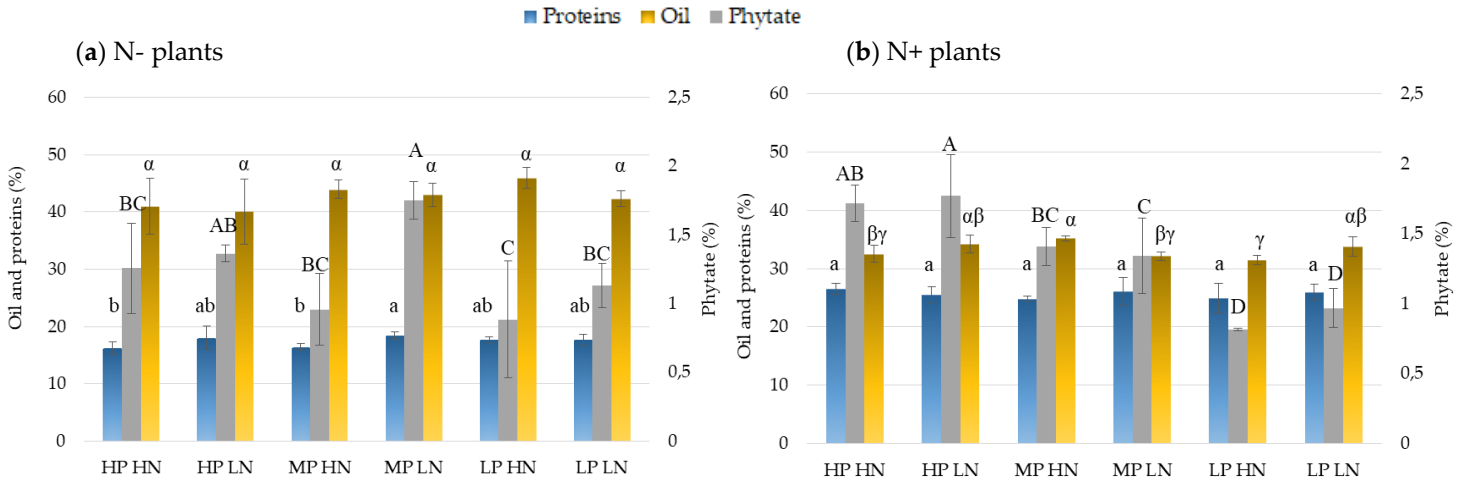


Figure 2. Relative content of oil, proteins (left Y axis) and phytate (right Y axis) expressed as mean ± SD in seeds of plants subjected to (**a**) N- cultivation (experiment 1) or (**b**) N+ cultivation (experiment 2) during the vegetative stage and to different levels of N and P fertilization during the beginning of reproductive phase (LN, HN, LP, MP and HP). Letters in lowercase indicate significant differences in protein amount, letters in capital indicate significant differences in phytate amount and greek characters indicate significant differences in oil amount according to Student t-test.

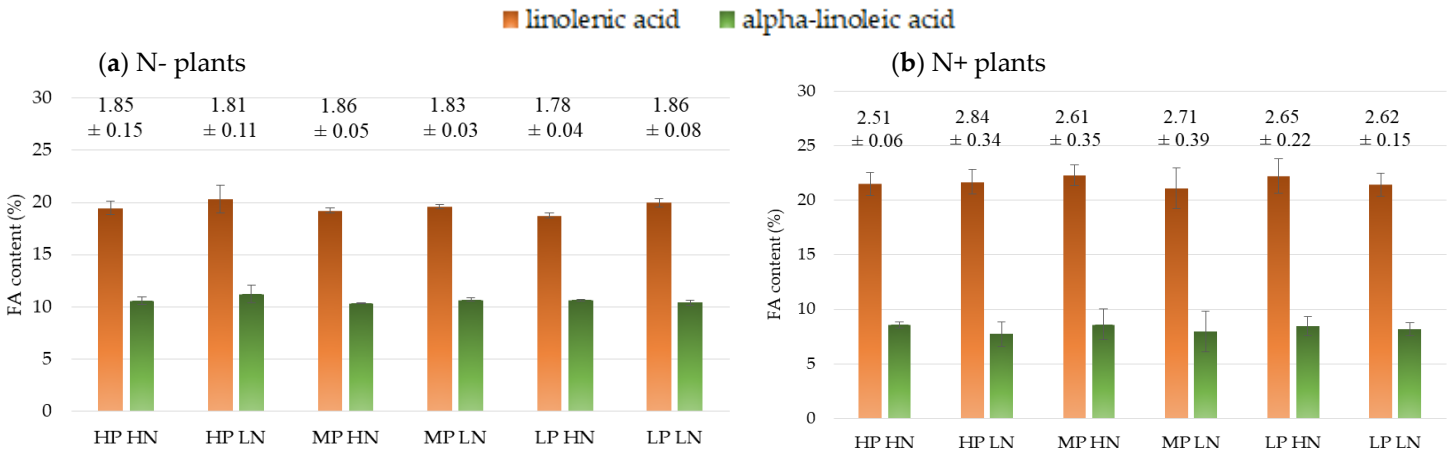


Figure 3. Fatty acids (FA) contents represented by linoleic (ω6) and α-linolenic acid (ω3) content of oil in seeds of plants submitted to (a) N- cultivation (experiment 1) or (b) N+ cultivation (experiment 2) during the vegetative stage and to different levels of N and P fertilization during the beginning of reproductive phase (LN, HN, LP, MP and HP). The average values of ω6 : ω3 ratio ± SD are indicated at the top of the bars.

cultivation (Figure 2). Indeed, seeds from N- plants contained in average 42.93 % of oil and 17.46 % of proteins while seeds from N+ plants contained 33.24 % of oil and 25.67 % of proteins. No difference in oil percentages were found between all N or P fertilization treatments in N- plants (Figure 2a). Nevertheless, protein content increased in MP fertilization with LN treatment (18.43 %) compared to MP-HN and HP-HN (around 16.3 %). In seeds of N+ plants (Figure 2b), oil content in MP-HN (35.2 %) was significantly higher than in HP-HN, MP-LN and LP-HN (around 32 %).

N- or N+ cultivation did not influence phytate content in seeds (Figure 2). Nevertheless, two-ways ANOVA (Table S1) indicates different fertilization effects according to N- or N+ plants. In seeds of N- plants (Figure 2a), the highest relative content of phytate was observed in MP-LN (1.75 %) and was significantly different when compared to HP-HN, MP-HN, LP-HN and LP-LN (between 1.26 and 0.9 %). In seeds of N+ plants, the highest phytate content was found with HP-LN fertilizations (1.77 %). Phytate content decreased with P fertilization and was not affected by N fertilization: MP-HN: 1.41 %; MP-LN: 1.34 %; LP-HN: 0.81 %; LP-LN: 0.97 % (Figure 2b).

Regarding the fatty acids (FA) compositions (Figure 3), the relative contents of linoleic acid (ω6) and α-linolenic acid (ω3) also differed between the N- and N+ plants while no differences were found regarding the level of N and P fertilization treatments during growth resuming (i.e. LN-HN and LP, MP, HP).

Thus, taking into account all the modalities of N (LN-HN) and P (LP, MP, HP) fertilizations, an average value of 19.50 % for ω6 and 10.65 % for ω3 was observed in seeds of N- plants, corresponding to a ω6 : ω3 ratio of 1.83 (Figure 3a). Seeds of N+ plants contained 21.72 % of ω6 and 8.26 % of ω3, leading to a ω6 : ω3 ratio of 2.66 (Figure 3b).

2.3. . Changes in biomass and P contents in plants during development cycle

2.3.1. Dynamics of total dry matter and total P amount between vegetative stage and flowering

At the end of vegetative stage (GS30, first harvest corresponding to initial status of plants), total dry matter (TDM) was not significantly different between N+ and N- plants (around 9 g per plant, Figures 4a,b). Nevertheless, the amount of total P was doubled in N+ plants (35 mg) compared to N- plants (17 mg) (Figures 4c,d).

Two-ways ANOVA performed on TDM showed neither N nor P effect (data not shown). Nevertheless, initial N- and N+ supplies, brought before vernalization, significantly impacted TDM from growth resuming to the final harvest.

At the end of vegetative stage (GS30, first harvest corresponding to initial status of plants), total dry matter (TDM) was not significantly different between N+ and N- plants (around 9 g per plant, Figures 4a,b). Nevertheless, the amount of total P was doubled in N+ plants (35 mg) compared to N- plants (17 mg) (Figures 4c,d).

Between growth resuming (GS30) and flowering (GS65) stages, TDM increased in both N- and N+ plants in response to P and N fertilizations. At flowering, TDM varied from 11.85 g (HP-LN) to 14.56 g (LP-HN) for N- plants (Figure 4a) and from 14.22 g (MP-LN) to 16.80 g (LP-HN) for N+ plants (Figure 4b).

Between GS30 and GS35, total P amount increased rapidly for both N+ and N- plants in response to HP (+110% for N+ plants and +76% for N- plants) or MP (+42% for both N+ and N- plants) whatever the level of N fertilization applied during this phase (Figures 4c,d). The increase of P uptake was particularly large for N+ plants under HP conditions: +40 mg per plant between GS30 and GS35 (Figure 4d). In contrast with HP and MP conditions, total P amount was not significantly increased or remained stable between GS30 and GS35 in response to LP fertilization and in both N+ and N- plants whatever the subsequent level of N fertilization (Figures 4c,d). Between GS35 and GS65 (flowering), the total amount of P remained to a stable level or slightly increased (not significant) in both N-and N+ plants (Figures 4c,d)

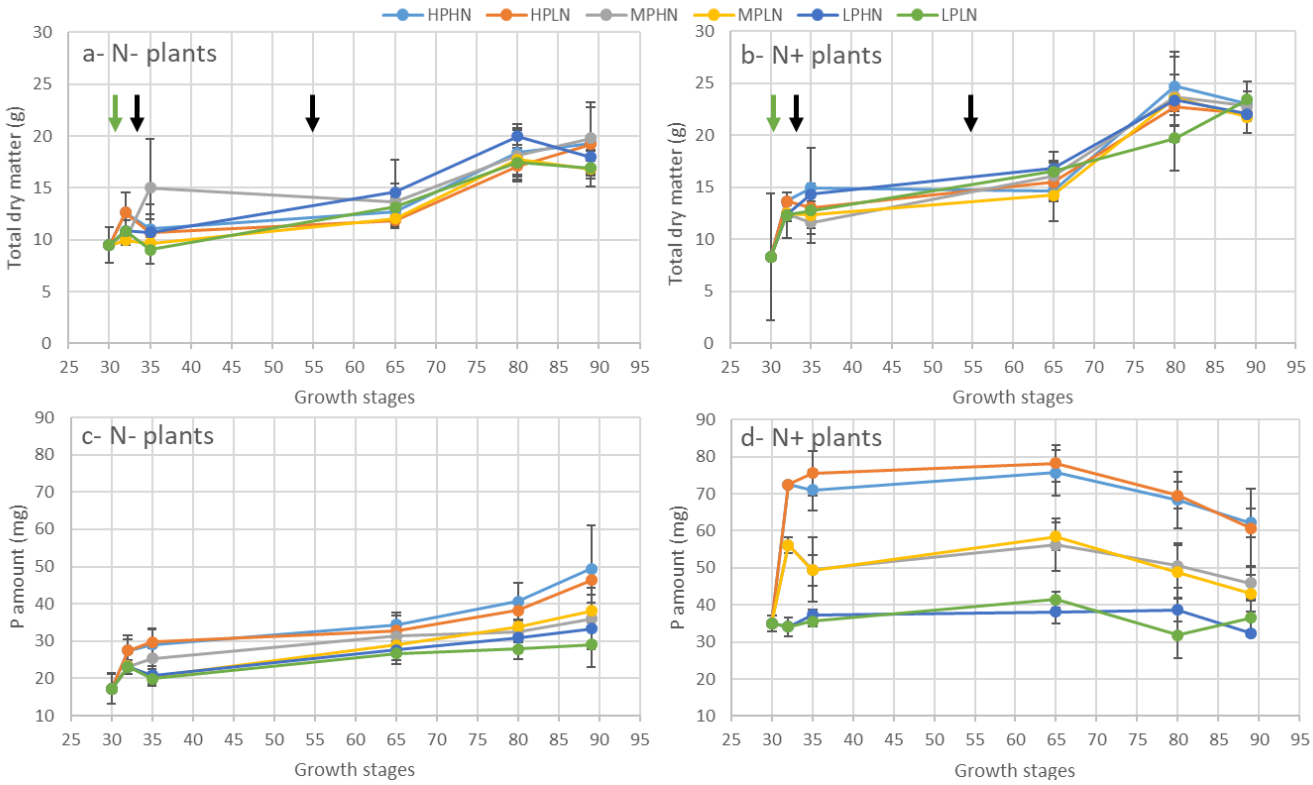


Figure 4. Dynamics of total dry matter (TDM ; a, b) and total P amount (c, d) in N- plants (a, c) and N+ plants (b, d) from the end of vernalization (GS30) to the final stage (GS89), according to various P and N fertilizations. Green arrow indicated the stage corresponding to the application of HP, MP and LP fertilization (and the first fertilization of N) and black arrows indicated the applications of HN and LN fertilizations (for details see Figure 1).

.

2.3.2. Dynamics of total dry matter and total P amount between flowering and final harvest (mature seeds)

After flowering (GS65), N+ plant (Figure 4b) showed an enhanced growth compared to N- plants (Figure 4a). Indeed, at the final stage the average biomass of N+ plants was in average 22.5 g, while it was 18.34 g in N- plants. Globally, TDM decreased between the stage of pod formation (GS80) and the final harvest (GS89). However, a stable TDM or a continuous increase of growth was observed in N- plants for HP and MP-LN fertilizations, and in N+ plants for the LP-LN fertilization.

Similarly, flowering represented a switching stage in phosphate absorption for N- and N+ plants as shown by the dynamic of total P between GS65 and GS89 (Figures 4c,d). First, in N- plants, total P amount remained stable or continued to be absorbeb leading to an increase of +14.5 mg of P between GS65 and GS89 in HP-HN and HP-LN conditions (Figure 4c). In contrast, total P amount in N+ plants declined between GS65 and GS89 suggesting of important lose of P during the reproductive stage.

2.4. Impacts of N, P and N x P fertilizations on P partitioning

2.4.1. Dynamics of P partitioning from vegetative stage to flowering

Between vegetative and flowering stages, two-ways ANOVA performed on P partitioning among the different organs of the plant indicated that the effects of P fertilization led to similarities for N- and N+ experiments (Table S2 and S3). In particular, the reduction of P fertilization impacted the partitioning of P, leading to (i) an increase in flowers during bolting stage (GS35, only for N+ plants) and flowering (GS65), and (ii) a decrease in stems during flowering in both N- and N+ plants (Figure 5). The level of N fertilization has no effect on P partitioning in N+ plants but impacted the P partitioning in flowers during bolting stage in N- plants ($p=0.004$, Table S2). NxP interactions were also significant on the P partitioning of stems in N+ plants during flowering (Table S3).

At the end of vegetative stage (GS30, initial stage), pattern of P partitioning in plants was totally different between N- and N+ plants (Figure 5). In N- plants (Figure 5a), roots accumulated about 46 % of total P at GS30 and decreased slowly to reach 14 % at final stage (GS89). In contrast with N- plants, leaves represented together the main pool of P in N+ plants with 67.58% of the total P at GS30 (Figure 5b). Compared to N- plants, P stored in roots for N+ plants represented only 30 % at GS30 and dramatically decreased to 11.26 % at growth resumption, remaining to this low level until the final harvest.

In N- plants, dynamics of P partitioning observed at the bolting stage (GS35, Figure 5a) revealed that stem and roots constituted the organs with the highest proportion of P. Under LN fertilization, a lower proportion of P in stems was observed in LP (28.73 %) compared to MP (34.86 %) and HP (34.37 %). In addition, the proportion of P in roots was lower in LP-HN plants (27.55 %) compared to other fertilization treatments in N- plants (Figure 5a). At the flowering stage (GS65), stem and roots were already the organs with the large proportion of P (Figure 5a). Nevertheless, the proportion of P in stems was reduced in LP (LN: 34.65 % and HN: 34.50 %) compared to MP-LN (41.88 %) and HP-HN (39.71 %). In addition, P amount in stems was lower in response of LP fertilization (Table S4, LP-LN: 9.22 mg and LP-HN: 9.47 mg) compared to all other fertilization treatments (between 12,13 and 13,30 mg). The proportion of P in fallen leaves was more important in LP-LN (10.25 %) compared to MP (LN: 5.64 % and HN: 5.75 %) and HP-HN (6.32 %).

In N+ plants, P partitioning at flowering stage (Figure 5b and Table S5) indicated that P content in stems was globally higher in HP (HP-LN: 36.43 % and HP-HN: 35.45 %) but also in MP-HN (38.11 %) compared to other fertilization treatments. Furthermore, in LP fertilization, stems had a higher proportion of P for LN than for HN fertilization (30 versus 25.23 %).

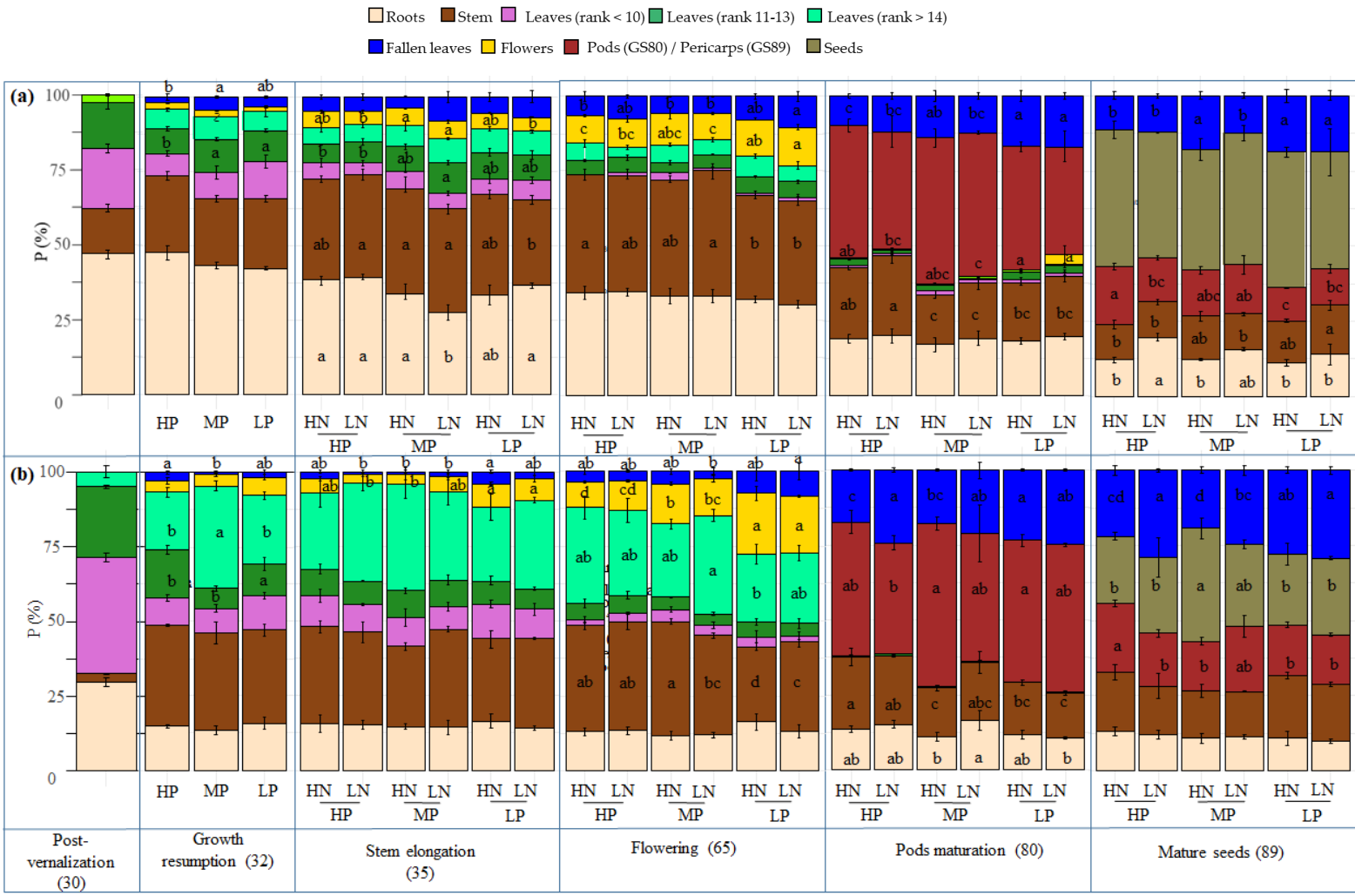


Figure 5. Dynamics of P partitioning in plants during reproductive stages (figures in brackets indicate harvest point in BBCH scale) : (**a**) in N- plants (experiment 1); (**b**) in N+ plants (experiment 2). Letters indicate significant differences in P repartition for each organ and each harvest separately in N- and N+ plants.

2.4.2. Dynamics of P partitioning from flowering to mature seeds

Two-ways ANOVA (Table S2 and S3) reported that P fertilization impacted the partitioning of P in stems during maturation of pods (GS80) and in fallen leaves until the final harvest (GS89). A significant effect of P fertilization was also observed on P repartition in siliques and pericarps only in N- plants from pod maturation to the final harvest and in stem at the final stage. In N+ plants, P fertilization impacted also P partitioning in seeds at final harvest. In N- plants, N fertilization influenced P proportion in roots at final harvest. In N+ plants, N fertilization only impacted P proportion represented by fallen leaves in both pod maturation and final stages. However, NxP interactions had a significant effect on P proportion of pericarps at final stage in N+ plants.

Between flowering and maturation of pods, the partitioning of P in roots (for N- plants), leaves and stems (for N- and N+ plants) strongly decreased at the benefit of pods for all the subsequent N and P fertilizations (Figures 5a,b). In N- plants, the proportion of P in stems was more reduced in MP (LN: 18.47 % and HN: 16.53 %) than in HP (Table S6 ; LN: 26.67 % and HN: 23.65 %). Fallen leaves presented a higher proportion of total plant P in LP-LN and LP-HN (around 17 %) compared to MP-LN (12.35 %) and HP (LN: 9.81 % and HN: 11.98 %). While siliques P represented the same proportions in all fertilization treatments, significant differences were found in P amounts for N- plants (Table S6): HP-HN showed higher values (18.05 mg) than LP fertilization treatments (LN: 10.25 mg and HN: 12.68 mg).

At final stage (GS89, Figure 5), the proportion of P in pericarps increased (1) with the level of P supply under LN conditions (from 11.03 % in LP-LN to 19.36 % in HP-LN) and (2) with the level of N fertilization in response to HP fertilization (HP-LN: 14.60 % and HP-HN: 19.36 %). Interestingly, seeds P represented a constant proportion whatever the level of N or P fertilization, comprised between 38.63 % and 45.40 %. Irrespective of N fertilization (HN or LN), the partitioning of P in fallen leaves decreased with the level of P fertilization : around 11-12.45 % for HP to 18-19 % for LP. Nevertheless, P amount in fallen leaves did not vary and was comprised in a narrow range (from 4.74 mg to 6.51 mg; Table S7).

2.5. Impacts of N, P and N x P fertilizations on N partitioning

N partitioning was realized for the five harvest point as for P partitioning, only for N- plants. Results showed no differences from growth resuming (GS35) to pods maturation (GS80). According to results obtained for N- plants, N partitioning for N+ plants was not investigated for stages from GS35 to GS65.

Two-ways ANOVA (Tables S2 and S3) revealed significant influence of fertilization treatments at stem elongation and at final harvest. In N- plants, at stem elongation stage, N proportion represented by flowers was influenced by P fertilization and N proportion of fallen leaves was influenced by N fertilization. At the final stage, N proportion represented by pericarps was impacted both by P and N fertilization and P x N interaction. In N+ plants, N partitioning in pericarps and seeds were both influenced by P x N interaction.

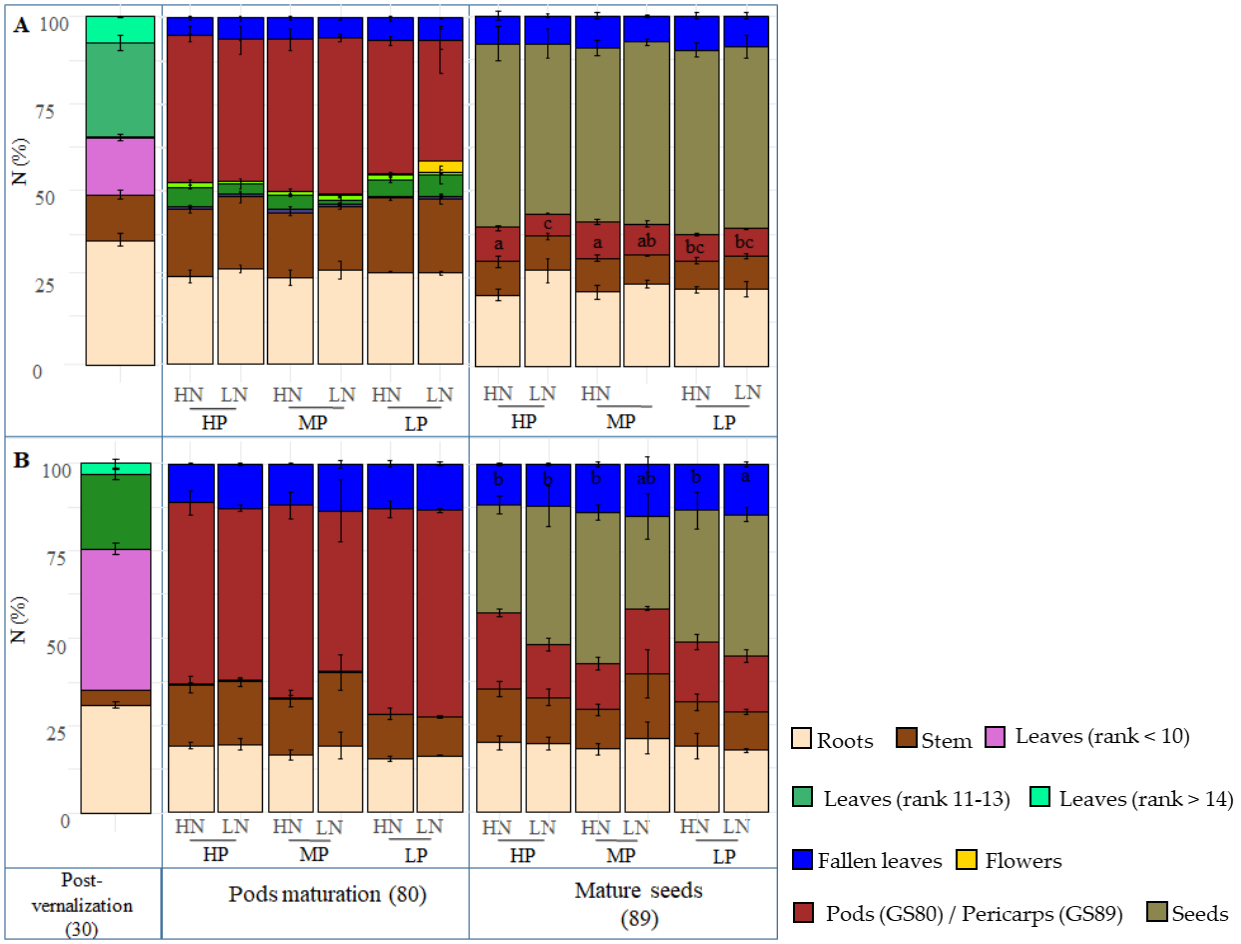
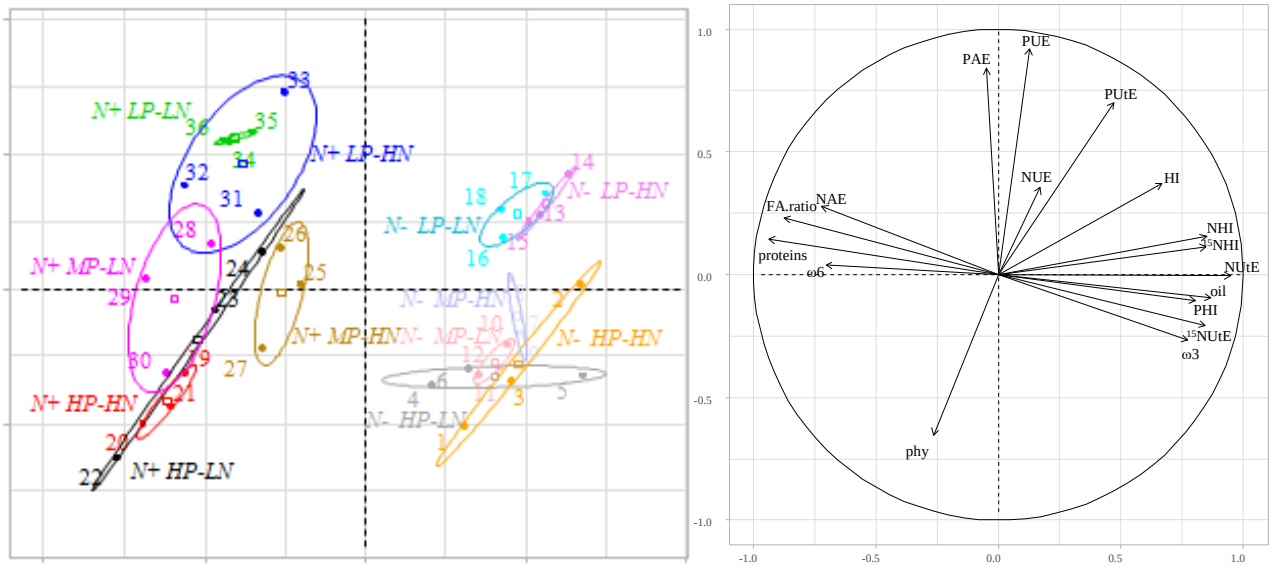


Figure 6. Dynamics of N partitioning in plants during reproductive stages (figures in brackets indicate the growth stage expressed as BBCH scale for each harvest point) : (**a**) in N- plants (experiment 1); (**b**) in N+ plants (experiment 2). Letters indicate significant differences in N repartition for each organ and each harvest separately in N- and N+ plants.



(**a**) (**b**)

Figure 7. Principal Component Analysis of agronomic performances according to N status at vegetative stage (N- vs N+ plants) and PxN fertilization supplied at the beginning of reproductive phase (Dimension 1: 49.96 % ; Dimension 2 : 18.01 %) : (**a**) Individual topology according to N (LN = 125 mg N and HN = 250 mg N) and P fertilization levels (LP Low Phosphate = 22.5 mg P, MP Medium P = 112.5 mg P and HP High P = 225 mg P) supplied at the onset of reproductive phase; (**b**) Correlation circle. HI : Harvest Index, NHI : N Harvest Index, ^{15}NHI : labelled N Harvest Index, PHI : P Harvest Index, NAE : N Absorption Efficiency, PAE : P Absorption Efficiency, NUE : N Use Efficiency, PUE : P Use Efficiency, NUte : N Utilization Efficiency, PUtE : P Utilization Efficiency, phy : phytate content, proteins, oil, ω6 and ω3 are expressed as contents, FA ratio : ω6 : ω3 ratio.

At initial state (GS30), 56.26 % of total N was presented in leaves of N- plants, mainly driven by the pool of medium leaves (22.73 % of total N, Figure 6a), while leaves represented 65 % of total N in N+ plants, mainly driven by senescing leaves (40.32 % of total N, Figure 6b). N- and N+ plants also differed at the stage of pod maturation (GS80, Figure 6) : N- plants showed a notable quantity of leaves while most of plants showed no more leaves in N+ plants. Finally, seeds represented a higher proportion of N in N- plants (51.28 %) than in N+ plants (36.49 %).

3. Discussion

3.1 N status at the end of the vegetative stage in interaction with the level of P fertilization are determinant for seeds industrial fate

In our study, two pot experiments have been performed in order to obtain plants with low or high N status at the end of vegetative stage. This experimental design allowed to determine the impact of this differential N status on rapeseed response to various subsequent levels of N (LN, HN) and P (HP, MP, LP) fertilizations applied during the early reproductive phase. Principal Component Analysis of seed quality traits and agronomic indices in both N- and N+ plants (Figure 7) showed a clear separation between the two experiments. N- plants are characterized by higher harvest indexes values, higher NUtE and a higher oil and ω3 contents. Also, fatty acids ratio was lower in grains of N- plants. N+ plants are characterized by higher values of NAE, fatty acids (ω6 : ω3) ratio, protein and ω6 contents. In both N- and N+ experiments, LP fertilization led to an enhancement of PUE, PAE and PUtE while HP fertilization led to a higher phytate amount in seeds.

While no differences were found in seed yield and Harvest Index (Table 1) between N- and N+ plants, contrasted results were found regarding seeds quality and thus allowing to attribute a specific optimal fertilization scheme to each industrial sector. Indeed, grains of rapeseed can be transformed into oils (for food consumption or industrial uses such as biofuels [2]) or proteins for livestock feeding or in diverse sectors for their foaming and emulsifying properties [3]. Plants with low N status at the end of vegetative stage led to the production of oil-rich seeds (Figure 3) with a lower linoleic acid (ω6) : α-linolenic acid (ω3) ratio. Since few years, studies have demonstrated that an increase in the ω6 : ω3 ratio in human alimentation increases the risk for obesity [23], cancer, diabetes and other health disorders [24]. According to these studies, a target ratio comprised between 2 : 1 and 1 :1 would significantly decrease risks for health. Here, N-fertilization not only increased oil content, but also led to an ω6 : ω3 ratio responding to this healthier target (Figure 5). On the contrary, high N fertilization during vegetative state enhanced protein content (Figure 4) of 47.02 % and decreased oil quality, with an ω6 : ω3 ratio exceeding 2.5 (Figure 5).

Development stages from vegetative growth to flowering are known as the yield potential elaboration [7]. Indeed, flowering induces a strong repression of nitrate transporters genes expression [25], turning rapeseed crop into its yield potential expression phase [7]. As seed yield did not vary with N fertilization in our study, yield potential did not express totally despite a higher potential. Khan et al.[26] proposed that a slight increase in N fertilization conducted to a higher plant biomass, including a higher stem development whose nutrients are poorly mobile in plants during senescence, thus creating a competition for resources between stem and reproductive organs. Nevertheless, in N- plants, N was successfully remobilized between GS80 and GS89.

N in rapeseed is mainly stored in leaves as amino acids and proteins, prior to stems. As a consequence, N fertilization frequently leads to an increase in seeds proteins [27]. Rathke et al. [28] proposed that at high N supply, carbohydrates were insufficiently available for fatty acids synthesis because of their appliance in amino acids synthesis. We found here that linoleic and α-linoleic acid production varied between N- and N+ plants. Polyunsaturated fatty acids are elaborated from oleic acid through the action of the Fatty Acid Desaturase (FAD)-2 and then through FAD-3 to generate linoleic and α-linoleic acids

respectively [29]. FAD-2 activity is ATP-dependent and utilizes cofactors produced during photosynthesis [30]. As N is a limiting factor of photosynthesis [31], FAD-2 activity is decreased, thus modifying the FAD-2 : FAD-3 balance. These modifications of FAD activities could have resulted in the increase of ω3 and a decrease of the ω6 pool observed in this study.

Another crucial quality item is phytate amount in seeds. Indeed, phytate has anti-nutritional properties and remains in the meal for livestock feeding [32]. Phytate amount was in the same range in both N- and N+ experiments, suggesting that N fertilization during vegetative stage did not impact the final phytate seed filling. Nevertheless, in N+ plants, P fertilization strongly influenced seed phytate content while in N- plants, N fertilization had a significant effect. As phytic acid is the major storage form of P [33,34], increasing phytate amount with P fertilization was expected. The N effect on phytate amount in N- plants was significant only in MP but similar tendencies were observed in both HP and LP. Indeed, phytate amount decreased with N fertilization. This phenomenon has already been observed [34–36]. Raboy [36] explained that this strong relationship was due to dilution of phytic acid because of enhanced protein storage in seed. Nevertheless in each experiments and in all fertilization treatments of the present study, phytate amounts were below the value of 2.50 % proposed by Lott [37] thus compatible for consumption.

Taken together, these results suggest that the industrial fate of rapeseed crop can be driven either in the sectors of oil or protein valorization by the modulation of N nutrition during the vegetative stage, *i.e.* during the elaboration of yield potential. Moreover, rapeseed plants oriented to the oil sector could present better nutritional properties regarding fatty acids composition and phytate content if the N and P fertilizations are well managed and adjusted. Plants oriented to the protein sector showed phytate amount suitable for their utilization in meals for livestock feeding. Another critical point that has to be highlighted concerning N+ cultivation is to assess the degradation rate of produced straws. Indeed, due to higher N content in stems and pericarps, the risk of pollution is increased during mineralization in the soil.

Our results suggest that plant N status at the end of vegetative stage is a determinant for the level of proteins in seeds. Therefore, in order to reconcile sustainable production with the objective of obtaining protein-enriched seeds, the selection of rapeseed with high vigor and/or high NUE during the autumn-winter phase will help to efficiently absorb the N available in soil (thus minimizing N leaching) and to obtain plant with high N status at the beginning of reproductive phase in spring (thus limiting the level of N inputs during spring). In addition, it could be interesting to use innovative cultural practices (such as application of biostimulants or biointrants) in order to improve the N availability from soil and/or the NUE during the autumn-winter vegetative phase. With this kind of ideotypes and/or "smart farming" solutions, protein-specialized rapeseed crop could meet production and ecological performance.

3.2 Contrasted agronomic performances according to fertilization scheme

Agronomic performances were showed to vary according to both N and P fertilization during vegetative stage and beginning of reproductive stages. N- plants were characterized by higher values in the NUE components, under the dependence of N fertilization during reproductive stages. During this experiment, N amount increased in roots and seeds in conjunction with P fertilization enhancement. These results suggest that P status has a significant impact on both N absorption and translocation from sources organs to sinks (seeds). Indeed, N uptake has already been shown to decrease in P limitation conditions, independently from N nutritional status of the plant [19]. Indeed, a P starvation induces a decrease in the nitrate reductase activity, thus limiting incorporation of N in amino acids by the GS/GOGAT [38]. As a consequence, N is accumulated in roots, causing a negative retro-control of N uptake [20].

Our results also suggest an N effect on P percentage represented by roots (Figure 6). Indeed, roots P tended to be higher in the lowest N fertilization, particularly in HP. As N limitation is known to repress phosphate transporter activity [22], P translocation could have been here reduced, leading to an accumulation in roots. Nevertheless, P proportion represented by seeds remained constant, probably because of a better drain from pericarps, especially in HP-LN.

N+ plants was characterized by a high proportion of plant N and P but which was not exported in seeds. Compared to N-, N+ presented a higher NAE, but a lower NUtE and ^{15}NHI. This indicates that plants absorbed a higher proportion of N from their environment but were not able to use it for seeds production because of a lack of remobilization from sources organs. Regarding P, N+ modality showed a lower PHI and overall similar PAE, PUE and PUtE compared to N-. This result means that the two cultures probably absorbed similar quantities of P, had similar yields and as a consequence had similar P Use Efficiencies. Nevertheless, less P was exported in seeds in N+ in term of proportions of total plant P and tended to show lower P amounts. This indicates also that lower apparent proportion of P in seeds is not due to a dilution effect but rather linked to a pattern of luxury consumption by plants, as most of nutrients did not serve seed yield and filling and are finally lost.

Such negative effects on rapeseed yield and NUE due to over N-fertilization has already been demonstrated. Indeed, an excess in N fertilizers leads to a delay in N remobilization from sources organs through uncomplete degradation of chlorophyll and N compounds [28,39]. As chlorophyll degradation occurs in early stages, this indicates that leaves abscission occurred before nuclear acids degradation which is a final stage of nutrient recycling [40]. Thus, nucleic acid pool representing 40 to 60 % of total P [41], early leaves abscission due to N luxury consumption conducted to an incomplete P remobilization as a negative externality. As a matter of fact, in our study, a highly significant N effect was observed on P partitioning represented by fallen leaves (Table S3).

Finally, in both N- and N+ experiments, N and P fertilizations applied at the onset of reproductive stages did not change seed yield or N and P contents. This seems to indicate that plants managed efficiently P and N starvation to achieve their crop cycle and maintaining yield and quality. This was possible through modulations of nutrient remobilization in different organs. Indeed, Aviso has already shown a particular N management strategy [42]. In response to low N fertilization, this genotype is characterized by a lower NAE and a higher N Remobilization Efficiency in reproductive stages when compared to other genotypes. As reported in Girondé et al., 2015, [42] we observed a great capacity of plants to efficiently translocate N from leaves to stems in both N- and N+ plants. This efficient N remobilization was related to an efficient N recycling in senescing leaves (with a large degradation of proteins and transport of amino acids). As N is not directly allocated to reproductive organs and as N partitioning of stems increased, those results confirm the role of stems as a transient storage organ. In the latest developmental stages, stem N is efficiently remobilized for seed filling in N- plants, maybe just leaving non-remobilizable structural N, while N+ plants were less able to use this pool.

In our study, P was mainly located to roots and stems until flowering stage (GS65) and then translocated to growing siliques. As P plays a critical role in remobilization process which are ATP-dependent, especially during monocarpic senescence [21], such a translocation could be related to the dependence of P demand in the strong sink organ represented by siliques. As relative P content of roots and stems showed a continuous decrease from flowering to the mature stage, these organs could represent the last mobilizable reservoir to achieve seed maturity.

4. Materials and Methods

4.1. Low N rapeseed cultivation (N-) in combination with 3 different levels of P fertilization

A first greenhouse experiment was conducted with rapeseed (*Brassica napus* L cv. Aviso) (figure 1). After surface sterilization, seeds were sown on sand with a photoperiod of 16 hours day (20°C) and 8 hours night (15°C). After germination and all along the cultivation, natural light was complemented if necessary by high-pressure sodium lamps in order to maintain a PAR (Photosynthetically Active Radiation) of 400 µmol s^{-1} m^{-2} at the canopy.

After emergence, plants were transplanted in pots containing 2 liters of sand (one plant per pot) and received 60 mL per day of a modified Hoagland solution (1 mM $Ca(NO_3)_2$, 1 mM KNO_3 , 0.2 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM $MgSO_4$, 0.2 mM EDTA+ 2 NaFe , 46.25 µM H_3BO_3 , 6.722 µM $MnSO_4$, 0.765 µM $ZnSO_4$, 0.316 µM $CuSO_4$ and 0.5 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$). This N supply given before the vernalization corresponds to 76 mg of N per plant. After one month, plants were vernalized during 10 weeks in a growth chamber (4°C, photoperiod 8h) for 10 weeks.

After vernalization, plants were placed in a heated greenhouse (16h light at 20°C, 8h dark at 18°C) and were supplied with 30 mL per day of a modified Hoagland solution without N and P. N and P were applied at three different stages corresponding to the fertilization design that is usually performed at the field. Thus, at the beginning of bolting stage (i.e. 10 days after vernalization), a first N input of 125 mg N ($K^{15}NO_3$ with 2.5 atom% excess of labelled ^{15}N) was applied in combination with three amounts of P fertilization (KH_2PO_4) : 22.5 mg per plant (Low P – LP), 112.5 mg per plant (Medium P – MP) and 225 mg per plant (High P – HP). A week later, i.e. during the bolting stage, a second N fertilization with labelled ^{15}N input was applied at two different levels: 250 mg (HN) and 125 mg (LN) per plant. Finally, N fertilization was completed at early flowering stage by a third input of 150 mg for HN and 100 mg for LN. Cultivation was carried out to the end of rapeseed's cycle, until production of mature grains.

4.2. High N rapeseed cultivation (N+) in combination with 3 different levels of P fertilization

This second cultivation was conducted following the same design as previously described, except that plants were supplied with N during pre-vernalization period of cultivation (figure 1). In the experiment plant were supplied with Hoagland solution enriched in N (2.5 mM $Ca(NO_3)_2$, 2.5 mM KNO_3). This N supply given before the vernalization corresponds to 189 mg of N per plant. After vernalization, N and P fertilizers were applied identically to the N- cultivation leading to HP, MP, LP plus LN and HN treatments.

4.3. Harvesting strategy

Five harvests were performed at the end of vernalization, growth resumption, stem elongation (bolting), flowering, pods formation and mature seeds stages, corresponding to growth stages (GS) 30, 32, 35, 65, 80 and 89 on the BBCH scale respectively. At each stage, 3 plants per treatment were harvested and separated as leaves, stem, roots, flowers, pericarps, and seeds. At GS30, leaves were separated in distinct pools representing old and senescing leaves (leak ranks from 1 to 10), matures leaves (leak ranks from 11 to 13) and growing leaves (leaf rank 14 and beyond). Each plant part was weighed after drying in an oven at 60 °C and then ground using the system Retsch MM200 (Eragny sur Oise, France) to fine powder for further analyses. The seed yield components (total seed weight per plant) and the harvest index (HI, fraction of the total DM allocated to the seed) were also determined.

4.4. Elementary analyses

4.4.1 Nitrogen and ^{15}N analysis

All powdered samples were placed in tin capsules and analyzed using a continuous flow isotope ratio mass spectrometer (IRMS, Horizon, NU Instruments, Wrexham, United Kingdom) linked to a C/N/S analyzer (EA3000, Euro Vector, Milan, Italy). Obtained concentrations were used to calculate amounts per organs and per plants, thus allowing to calculate N and ^{15}N repartition in the different plant organs by dividing N or ^{15}N amount of the organ by the total N or ^{15}N amount of the plant.

4.4.2 Phosphorus assay

Phosphorus content was also determined on powders using X-Ray Fluorescence (XRF). Calibration curves were determined on roots, stems, leaves, siliques, pericarps, seeds and flowers powders. Linear regression curves were calculated comparing XRF obtained P values of 5 samples per organ of N- cultivation with results obtained by high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HR ICP-MS, Thermo Scientific, Element 2™, Bremen, Germany). Briefly 40 mg of powder were suspended with 800 µL of HNO_3, 200µL H_2O_2 and 1 mL Milli-Q-water. Samples were then mineralized using microwave (Multiwave ECO, Anton Paar, les Ulis, France) and diluted by addition of 50 mL of Milli-Q water. Suspensions were then filtered on Teflon filtration system (Digifilter, SCP Science, Courtaboeuf, France) at 0.45 µm. Subsequent samples were directly assayed using an XRF analyzer (Portable XRF S1 TITAN 800, Bruker, Kalkar, Germany). P repartition has been calculated as for N and ^{15}N.

4.4.3. Components of N and P use efficiencies

Nitrogen Harvest Index (NHI), ^{15}N Harvest Index (^{15}NHI) or Phosphorus Harvest Index (PHI) are calculated as the level of N, ^{15}N or P in seeds expressed as percentage of total amount of N, ^{15}N or P observed at the final harvest. N and P Absorption Efficiency (NAE and PAE), were calculated as the percentage of total plant N (or P) among total applied N (or P). N and P Use Efficiencies (NUE and PUE) were calculated as the seed biomass divided by applied N or P fertilizers amounts. Finally, N and P Utilization Efficiencies (NUtE and PUtE) were calculated as seed biomass divided by total N or P amounts in plants [8].

554.5. Seeds quality analyses

4.5.1 Oil and protein content assayed by Infra-Red Spectroscopy

Seeds quality was assayed from 1 g sample of entire seeds using standard Near-Infra-Red Spectroscopy (NIRS; Unity SpectraStar 2500, Brookfield, WI, United States) technique [43]. This method allowed to estimate contents of oil, proteins and specific fatty acids such as linolenic acid (ω6) and α-linoleic acid (ω3).

4.5.2 Phytate content assayed by HPLC

Phytate was first extracted from seeds using HCl method [44]. Briefly, 40 mg of seed power were weighed and 2 mL HCl 0,2N were added. Suspension was mixed for 2 h. 50 µL of phytate suspension were added to 950 µL of Milli-Q water and analyzed by High Performance Ionic Chromatography ICS 6000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 25 µL are injected and eluted by an ultrapure water and KOH gradient which concentration increases from 0,5 mM to 60 mM. Eluent is delivered by an isocratic pump in an ion exchange column (Dionex IonPac AS11, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Anions are detected by conductimetry, identified according to their retention time and quantified by pic area measurement which were compared to standard's pic area comprised between 5 and 50 $mg.L^{-1}$.

4.6 Statistical analyses

All data were analyzed using R 64-bit version 4.0.2. One-way analysis of variance (ANOVA) of the "multcomp" package was performed, followed by a post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" Two-ways ANOVA were performed using the same function to assess N, P or combination effect on tested parameters. P values < 0.05 were considered as significant. Data are expressed as means ± SD (Standard Deviation. PCA analyses were performed using the package "Factoshiny".

5. Conclusions

In this study, several N and P fertilization level were applied in context of low and high N fertilization during vegetative stage of rapeseed. Early N fertilization had the strongest observed influence on seeds quality, allowing their orientation in oil or protein industrial sector. Monitoring the vigor and the nutritional status of rapeseed rosettes at the end of vernalization seems determinant to plan the fertilization scheme towards the proteic or the oil industrial sector. As nutrient use efficiency were increased in low N and P fertilization rates, ecological performances of rapeseed could be improved applying less inputs at growth resuming. We showed fertilization sobriety did not impact seed yield and quality and thus could limit environmental nuisance while targeting a defined quality profile. Indeed, high fertilization led to a luxury consumption behavior of plants and finally, a large part of both N and P were not exported in seeds and remained in straws. As steering crops towards an industrial fate (for oleic or protein valorization) is a promising opportunity, environmental cost of rapeseed growth must be taken into account. Finally, smart driving of fertilization practices for rapeseed culture could allow to meet pursued triple performance goals through enhancement of environmental and quality values.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, CA and JC.; methodology, CA and JCA ; software, CA; validation, CA; formal analysis, C.A. and JC.A.; investigation, C.A. and JC.A.; resources, JCA and KL.; data curation, CA.; writing—original draft preparation, CA.; writing—review and editing, CA, MB and JCA.; supervision, JCA, MB and KL.; project administration, JCA, MB and KL.; funding acquisition, JCA and KL. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by This research was funded by the Normandy region, the University of Caen-Normandy and the SFR Normandie Végétal (FED4277).

Data Availability Statement: In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Please refer to suggested Data Availability Statements in section "MDPI Research Data Policies" at https://www.mdpi.com/ethics. You might choose to exclude this statement if the study did not report any data.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the technical staff of the UMR UCN/INRAe EVA for their help with greenhouse experiments, harvests and analyses. Especially, the authors adress their acknowledgements to the Dr Jean-Bernard Cliquet and Aurelia Lornac for their help in phytate analysis development. The authors also acknowledge Laurence Cantrill for english revision.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. USDA Oilseeds: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service Available online: https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade (accessed on 3 September 2021).
2. Piazza, G.J.; Foglia, T.A. Rapeseed Oil for Oleochemical Usage. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2001**, *103*, 450–454, doi:10.1002/1438-9312(200107)103:73.0.CO;2-D.
3. Fetzer, A.; Müller, K.; Schmid, M.; Eisner, P. Rapeseed Proteins for Technical Applications: Processing, Isolation, Modification and Functional Properties – A Review. *Industrial Crops and Products* **2020**, *158*, 112986, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112986.
4. Schjoerring, J.K.; Bock, J.G.H.; Gammelvind, L.; Jensen, C.R.; Mogensen, V.O. Nitrogen Incorporation and Remobilization in Different Shoot Components of Field-Grown Winter Oilseed Rape (Brassica Napus L) as Affected by Rate of Nitrogen Application and Irrigation. *Plant Soil* **1995**, *177*, 255–264, doi:10.1007/BF00010132.
5. Rashid, A.; Bughio, N. Evaluating Internal Phosphorus Requirement of Rapeseed, Chickpea, Lentil, and Wheat by Seed Analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **1993**, *24*, 1359–1369, doi:10.1080/00103629309368882.
6. Grizzetti, B.; Billen, G.; Davidson, E.A.; Winiwarter, W.; de Vries, W.; Fowler, D.; Howard, C.M.; Bleeker, A.; Sutton, M.A.; Lassaletta, L.; et al. Global Nitrogen and Phosphorus Pollution. In *Just Enough Nitrogen*; Sutton, M.A., Mason, K.E., Bleeker, A., Hicks, W.K., Masso, C., Raghuram, N., Reis, S., Bekunda, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 421–431 ISBN 978-3-030-58064-3.
7. Bouchet, A.-S.; Laperche, A.; Bissuel-Belaygue, C.; Snowdon, R.; Nesi, N.; Stahl, A. Nitrogen Use Efficiency in Rapeseed. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* **2016**, *36*, 38, doi:10.1007/s13593-016-0371-0.
8. Hawkesford, M.J.; Barraclough, P. *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*; John Wiley & Sons, 2011; ISBN 978-0-470-96068-4.
9. Malagoli, P.; Laine, P.; Rossato, L.; Ourry, A. Dynamics of Nitrogen Uptake and Mobilization in Field-Grown Winter Oilseed Rape (Brassica Napus) From Stem Extension to Harvest. II. An 15N-Labelling-Based Simulation Model of N Partitioning Between Vegetative and Reproductive Tissues. *Annals of Botany* **2005**, *95*, 1187–1198, doi:10.1093/aob/mci131.
10. Gombert, J.; Etienne, P.; Ourry, A.; Le Dily, F. The Expression Patterns of SAG12/Cab Genes Reveal the Spatial and Temporal Progression of Leaf Senescence in Brassica Napus L. with Sensitivity to the Environment. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1949–1956, doi:10.1093/jxb/erj142.
11. Malagoli, P. Dynamics of Nitrogen Uptake and Mobilization in Field-Grown Winter Oilseed Rape (Brassica Napus) from Stem Extension to Harvest: I. Global N Flows between Vegetative and Reproductive Tissues in Relation to Leaf Fall and Their Residual N. *Annals of Botany* **2005**, *95*, 853–861, doi:10.1093/aob/mci091.
12. Hammond, J.P.; Broadley, M.R.; White, P.J.; King, G.J.; Bowen, H.C.; Hayden, R.; Meacham, M.C.; Mead, A.; Overs, T.; Spracklen, W.P.; et al. Shoot Yield Drives Phosphorus Use Efficiency in Brassica Oleracea and Correlates with Root Architecture Traits. *Journal of Experimental Botany* **2009**, *60*, 1953–1968, doi:10.1093/jxb/erp083.
13. Akhtar, M.S.; Oki, Y.; Adachi, T. Mobilization and Acquisition of Sparingly Soluble P-Sources by *Brassica* Cultivars under P-Starved Environment I. Differential Growth Response, P-Efficiency Characteristics and P-Remobilization. *Journal of Integrative Plant Biology* **2009**, *51*, 1008–1023, doi:10.1111/j.1744-7909.2009.00874.x.
14. Öztürk, Ö. Effects of Source and Rate of Nitrogen Fertilizer on Yield, Yield Components and Quality of Winter Rapeseed (Brassica Napus L.). *Chilean J. Agric. Res.* **2010**, *70*, doi:10.4067/S0718-58392010000100014.
15. Smith, C.J.; Wright, G.C.; Woodroofe, M.R. The Effect of Irrigation and Nitrogen Fertilizer on Rapeseed (Brassica Napus) Production in South-Eastern Australia: II. Nitrogen Accumulation and Oil Yield. *Irrig Sci* **1988**, *9*, 15–25, doi:10.1007/BF00292140.
16. Christensen, J.V.; Hennig, A.M.F.; McKENZIE, J.S.; Legge, W.G.; DePAUW, R.M.; Siemens, B.; Thomas, J.B. EFFECT OF SEEDING DATE, NITROGEN AND PHOSPHATE FERTILIZER ON GROWTH, YIELD AND QUALITY OF RAPESEED IN NORTHWEST ALBERTA. *Can. J. Plant Sci.* **1985**, *65*, 275–284, doi:10.4141/cjps85-040.

17. Gallet, A.; Flisch, R.; Ryser, J.-P.; Frossard, E.; Sinaj, S. Effect of Phosphate Fertilization on Crop Yield and Soil Phosphorus Status. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2003**, *166*, 568–578, doi:10.1002/jpln.200321081.
18. Franco-Zorrilla, J.M.; Martín, A.C.; Leyva, A.; Paz-Ares, J. Interaction between Phosphate-Starvation, Sugar, and Cytokinin Signaling in Arabidopsis and the Roles of Cytokinin Receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* **2005**, *138*, 847–857, doi:10.1104/pp.105.060517.
19. de Groot, C.C.; Marcelis, L.F.M.; Lambers, H. Interaction of Nitrogen and Phosphorus Nutrition in Determining Growth. **2003**, 12.
20. Gniazdowska, A.; Rychter, A.M. Nitrate Uptake by Bean (Phaseolus Vulgaris L.) Roots under Phosphate Deficiency. *Plant and Soil* **2000**, *226*, 79–85.
21. Ma, B.L.; Zheng, Z.M. Relationship between Plant Nitrogen and Phosphorus Accumulations in a Canola Crop as Affected by Nitrogen Management under Ample Phosphorus Supply Conditions. *Can. J. Plant Sci.* **2016**, *96*, 853–866, doi:10.1139/cjps-2015-0374.
22. Medici, A.; Szponarski, W.; Dangeville, P.; Safi, A.; Dissanayake, I.M.; Saenchai, C.; Emanuel, A.; Rubio, V.; Lacombe, B.; Ruffel, S.; et al. Identification of Molecular Integrators Shows That Nitrogen Actively Controls the Phosphate Starvation Response in Plants. *The Plant Cell* **2019**, *31*, 1171–1184, doi:10.1105/tpc.18.00656.
23. Simopoulos, A.P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients* **2016**, *8*, 128, doi:10.3390/nu8030128.
24. Simopoulos, A.P. The Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio: Health Implications. *OCL* **2010**, *17*, 267–275, doi:10.1051/ocl.2010.0325.
25. Malagoli, P.; Lainé, P.; Le Deunff, E.; Rossato, L.; Ney, B.; Ourry, A. Modeling Nitrogen Uptake in Oilseed Rape Cv Capitol during a Growth Cycle Using Influx Kinetics of Root Nitrate Transport Systems and Field Experimental Data. *Plant Physiology* **2004**, *134*, 388–400, doi:10.1104/pp.103.029538.
26. Khan, S.; Anwar, S.; Kuai, J.; Noman, A.; Shahid, M.; Din, M.; Ali, A.; Zhou, G. Alteration in Yield and Oil Quality Traits of Winter Rapeseed by Lodging at Different Planting Density and Nitrogen Rates. *Sci Rep* **2018**, *8*, 634, doi:10.1038/s41598-017-18734-8.
27. Aminpanah, H. Effect of Nitrogen Rate on Seed Yield, Protein and Oil Content of Two Canola (Brassica Napus L.) Cultivars / VPLIV GNOJENJA Z DUŠIKOM NA PRIDELEK SEMEN, VSEBNOST BELJAKOVIN IN OLJA PRI DVEH SORTAH OLJNE OGRŠČICE (Brassica Napus L.). *Acta agriculturae Slovenica* **2013**, *101*, 1–8, doi:10.2478/acas-2013-0014.
28. Rathke, G.-W.; Christen, O.; Diepenbrock, W. Effects of Nitrogen Source and Rate on Productivity and Quality of Winter Oilseed Rape (Brassica Napus L.) Grown in Different Crop Rotations. *Field Crops Research* **2005**, *94*, 103–113, doi:10.1016/j.fcr.2004.11.010.
29. Ohlrogge, J.; Browse, J. Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* **1995**, *7*, 957–970.
30. Suresha, G.S.; Kumar, S.; Santha, I.M. Functional Expression of Brassica Juncea Oleate Desaturase Gene (Bjfad2) in Escherichia Coli. *Biologia* **2013**, *68*, 599–605, doi:10.2478/s11756-013-0212-4.
31. Gao, L.; Caldwell, C.D.; Jiang, Y. Photosynthesis and Growth of Camelina and Canola in Response to Water Deficit and Applied Nitrogen. *Crop Science* **2018**, *58*, 393–401, doi:10.2135/cropsci2017.07.0406.
32. Liener, I.E. Implications of Antinutritional Components in Soybean Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1994**, *34*, 31–67, doi:10.1080/10408399409527649.
33. Kumar, V.; Sinha, A.K. General aspects of phytases. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition*; Elsevier, 2018; pp. 53–72 ISBN 978-0-12-805419-2.
34. Coelho, C.M.M.; Santos, J.C.P.; Tsai, S.M.; Vitorello, V.A. Seed Phytate Content and Phosphorus Uptake and Distribution in Dry Bean Genotypes. *Braz. J. Plant Physiol.* **2002**, *14*, 51–58, doi:10.1590/S1677-04202002000100007.
35. Kaya, M.; Küçükyumuk, Z.; Erdal, I. Phytase Activity, Phytic Acid, Zinc, Phosphorus and Protein Contents in Different Chickpea Genotypes in Relation to Nitrogen and Zinc Fertilization. 6.

36. Raboy, V.; Noaman, M.M.; Taylor, G.A.; Pickett, S.G. Grain Phytic Acid and Protein Are Highly Correlated in Winter Wheat. *Crop Sci.* **1991**, *31*, 631–635, doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100030017x.
37. Lott1, J.N.A.; Ockenden, I.; Raboy, V.; Batten, G.D. Phytic Acid and Phosphorus in Crop Seeds and Fruits: A Global Estimate. *Seed Sci. Res.* **2000**, *10*, 11–33, doi:10.1017/S0960258500000039.
38. Miflin, B.J.; Lea, P.J. The Pathway of Nitrogen Assimilation in Plants. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 873–885, doi:10.1016/S0031-9422(00)84362-9.
39. Brennan, R.F.; Mason, M.G.; Walton, G.H. Effect of Nitrogen Fertilizer on the Concentrations of Oil and Protein in Canola (*Brassica Napus)* Seed. *Journal of Plant Nutrition* **2000**, *23*, 339–348, doi:10.1080/01904160009382020.
40. Zimmermann, P.; Zentgraf, U. THE CORRELATION BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND LEAF SENESCENCE DURING PLANT DEVELOPMENT #. **2005**, *10*, 20.
41. Dissanayaka, D.M.S.B.; Plaxton, W.C.; Lambers, H.; Siebers, M.; Marambe, B.; Wasaki, J. Molecular Mechanisms Underpinning Phosphorus-Use Efficiency in Rice: Phosphorus Remobilization in Rice. *Plant Cell Environ* **2018**, *41*, 1483–1496, doi:10.1111/pce.13191.
42. Girondé, A.; Etienne, P.; Trouverie, J.; Bouchereau, A.; Le Cahérec, F.; Leport, L.; Orsel, M.; Niogret, M.-F.; Nesi, N.; Carole, D.; et al. The Contrasting N Management of Two Oilseed Rape Genotypes Reveals the Mechanisms of Proteolysis Associated with Leaf N Remobilization and the Respective Contributions of Leaves and Stems to N Storage and Remobilization during Seed Filling. *BMC Plant Biol* **2015**, *15*, 59, doi:10.1186/s12870-015-0437-1.
43. Tillmann, P.; Reinhardt, T.-C.; Paul, C. Networking of near Infrared Spectroscopy Instruments for Rapeseed Analysis: A Comparison of Different Procedures. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **2000**, *8*, 101–107, doi:10.1255/jnirs.269.
44. Haug, W.; Lantzsch, H.-J. Sensitive Method for the Rapid Determination of Phytate in Cereals and Cereal Products. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 1423–1426, doi:10.1002/jsfa.2740341217.

Supplemental data :

Table S1 : Two-ways ANOVA of N and P fertilizations and P:N interaction on agronomic indices and seeds' quality. Statistical tests were performed using the aov function of R (4.0.2) software.

	Low N culture			High N culture		
	P	N	P:N	P	N	P:N
NAE	0.615	3.32E-05	0.767	0.986	0.001	0.766
^{15}NAE	0.417	0.100	0.530	0.970	0.040	0.810
NHI	0.829	0.762	0.647	0.604	0.625	0.039
^{15}NHI	0.884	0.813	0.919	0.490	0.511	0.025
NUtE	0.974	0.192	0.846	0.415	0.795	0.311
HI	0.757	0.349	0.770	0.643	0.972	0.506
NUE	0.773	5.61E-04	0.954	0.770	0.014	0.644
PHI	0.877	0.521	0.420	0.047	0.552	0.127
PUtE	0.205	0.433	0.731	0.001	0.655	0.568
PAE	4.84E-07	0.430	0.464	6.57E-09	0.422	0.178
PUE	6.19E-10	0.079	0.637	3.70E-07	0.911	0.763
Oil	0.164	0.575	0.995	0.321	0.579	0.005
Proteins	0.665	0.032	0.132	0.776	0.583	0.451
ω3	0.570	0.359	0.923	0.962	0.304	0.896
ω6	0.536	0.436	0.502	0.955	0.357	0.668
Phytate	0.079	0.009	0.092	1.98E-05	0.614	0.062

p-values: 0.05 / 0.01 / 0.001

Table S2 : Two-ways ANOVA of N and P fertilizations and interactions on elemental composition of plants organs in N- plants. Statistical tests were performed using the aov function of R (4.0.2) software.

		Nitrogen repartition			P repartition		
		P	N	P : N	P	N	P : N
Stem elongation	roots	0.796	0.495	0.915	0.0114	0.632	0.0796
	stem	0.553	0.6	0.171	0.0925	0.1964	0.306
	lower leaves	0.885	0.754	0.66	0.657	0.799	0.519
	medium leaves	0.5008	0.0536	0.4419	0.0369	0.3769	0.6716
	upper leaves	0.153	0.997	0.505	0.11	0.657	0.887
	flowers	0.028	0.423	0.721	0.0199	0.04	0.384
	fallen leaves	0.9882	0.0475	0.4425	0.623	0.096	0.325
Flowering	roots	0.394	0.191	0.74	0.279	0.742	0.83
	stem	0.2421	0.0834	0.6825	0.0063	0.5276	0.512
	lower leaves	0.759	0.548	0.66	0.473	0.908	0.303
	medium leaves	0.0711	0.3965	0.1997	0.0724	0.4388	0.3843
	upper leaves	0.662	0.176	0.559	0.3927	0.0978	0.799
	flowers	0.633	0.523	0.6	0.0111	0.6879	0.5764
	fallen leaves	0.132	0.111	0.336	0.0302	0.1771	0.461
Siliques maturation	roots	0.974	0.342	0.701	0.741	0.348	0.96
	stem	0.0639	0.7321	0.5887	0.00181	0.19248	0.79915
	lower leaves	0.564	0.829	0.678	0.667	0.879	0.996
	medium leaves	0.0988	0.2244	0.2341	0.0284	0.0804	0.3707
	upper leaves	0.906	0.478	0.597	0.69	0.471	0.481
	flowers	0.421	0.309	0.466	0.389	0.326	0.457
	siliques	0.133	0.657	0.793	0.0423	0.2149	0.7975
	fallen leaves	0.0988	0.2244	0.2341	0.00188	0.84984	0.37436
Mature seeds	roots	0.6006	0.0698	0.2679	0.187	0.00745	0.362
	stem	0.699	0.876	0.362	0.0382	0.8967	0.1123
	siliques	0.0137	0.0151	0.0282	0.00953	0.5295	0.1222
	seeds	0.829	0.762	0.647	0.877	0.521	0.42
	fallen leaves	0.302	0.22	0.657	0.00116	0.21164	0.07761

p-values: 0.05 / 0.01 / 0.001

Table S3 : Two-ways ANOVA of N and P fertilizations and interactions on elemental composition of plants organs in N+ plants. Statistical tests were performed using the aov function of R (4.0.2) software.

		Nitrogen repartition			P repartition		
		P	N	P : N	P	N	P : N
Stem elongation	roots				0.902	0.559	0.861
	stem				0.391	0.225	0.294
	lower leaves				0.524	0.298	0.989
	medium leaves				0.428	0.539	0.935
	upper leaves				0.419	0.535	0.246
	flowers				0.012	0.707	0.338
	fallen leaves				0.0429	0.2728	0.1889
Flowering	roots				0.304	0.522	0.514
	stem				0.000178	0.787525	0.025988
	lower leaves				0.503	0.791	0.745
	medium leaves				0.27	0.735	0.79
	upper leaves				0.0837	0.4874	0.1955
	flowers				0.00000256	0.845	0.535
	fallen leaves				0.039	0.776	0.764
Siliques maturation	roots	0.178	0.428	0.813	0.242	0.185	0.209
	stem	0.0705	0.5603	0.5025	0.0133	0.9706	0.4383
	leaves	0.0764	0.5883	0.579	0.0813	0.6219	0.7232
	siliques	0.138	0.318	0.595	0.189	0.13	0.322
	fallen leaves	0.2757	0.0742	0.709	0.00538	0.00133	0.08058
Mature seeds	roots	0.862	0.828	0.71	0.34	0.652	0.878
	stem	0.595	0.658	0.327	0.177	0.335	0.823
	siliques	0.33093	0.56565	0.00954	0.156	0.819	0.034
	seeds	0.6044	0.625	0.0389	0.0473	0.5522	0.1268
	fallen leaves	0.101	0.324	0.927	0.000645	0.000705	0.097912

p-values

0.05

0.01

0.001

Table S4 : Elemental analysis at flowering for N- experiment. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package “agricolae” (p-value < 0.05).

	Fertilization modalities	Nitrogen repartition (%)				Nitrogen amount (mg)				Phosphorus repartition (%)				Phosphorus amount (mg)			
Roots	HP MN	32.97	±	3.88	a	45.49	±	7.85	a	34.15	±	3.80	a	11.81	±	2.43	a
	HP LN	23.95	±	17.40	a	27.86	±	20.96	a	34.46	±	2.06	a	11.29	±	0.84	a
	MP MN	35.50	±	3.37	a	47.19	±	12.30	a	33.19	±	4.72	a	10.53	±	2.86	a
	MP LN	32.76	±	2.26	a	36.74	±	2.51	a	33.18	±	3.66	a	9.56	±	0.78	a
	LP MN	35.31	±	3.02	a	46.48	±	8.64	a	32.10	±	2.08	a	8.87	±	1.57	a
	LP LN	32.02	±	3.16	a	43.17	±	8.64	a	30.27	±	2.19	a	8.05	±	0.59	a
Stem	HP MN	29.27	±	4.43	a	39.95	±	3.59	a	39.71	±	3.09	a	13.30	±	1.11	a
	HP LN	35.85	±	8.44	a	38.74	±	3.89	a	39.12	±	1.86	ab	12.86	±	1.65	a
	MP MN	29.87	±	2.26	a	39.00	±	3.72	a	38.94	±	1.99	ab	12.17	±	0.95	a
	MP LN	32.19	±	2.35	a	36.11	±	3.00	a	41.88	±	4.36	a	12.13	±	1.66	a
	LP MN	26.53	±	2.00	a	34.57	±	2.42	a	34.50	±	1.39	b	9.47	±	0.97	b
	LP LN	29.53	±	3.72	a	40.45	±	9.52	a	34.65	±	2.50	b	9.22	±	0.81	b
Leaves < 10	HP MN	0.00	±	0.00	a	0.00	±	0.00	a	0.00	±	0.00	a	0.00	±	0.00	a
	HP LN	0.01	±	0.00	a	0.99	±	1.72	a	0.01	±	0.01	a	0.31	±	0.54	a
	MP MN	0.01	±	0.01	a	0.95	±	0.88	a	0.02	±	0.03	a	0.70	±	0.01	a
	MP LN	0.01	±	0.01	a	0.73	±	1.27	a	0.02	±	0.00	a	0.21	±	0.37	a
	LP MN	0.01	±	0.01	a	0.46	±	0.80	a	0.01	±	0.01	a	0.26	±	0.45	a
	LP LN	0.01	±	0.01	a	0.49	±	0.84	a	0.01	±	0.02	a	0.29	±	0.49	a
Leaves 11 to 13	HP MN	8.18	±	1.12	a	11.16	±	0.71	a	4.72	±	0.67	a	1.61	±	0.10	a
	HP LN	9.96	±	2.84	a	10.85	±	2.65	a	4.88	±	1.46	a	1.59	±	0.44	a
	MP MN	5.02	±	0.62	a	6.65	±	1.60	a	3.50	±	0.93	a	1.11	±	0.34	a
	MP LN	7.33	±	3.06	a	8.20	±	3.34	a	4.72	±	0.20	a	1.36	±	0.05	a
	LP MN	8.52	±	0.87	a	11.08	±	0.49	a	5.65	±	0.71	a	1.54	±	0.14	a
	LP LN	6.85	±	1.69	a	8.26	±	2.22	a	5.35	±	1.12	a	1.43	±	0.37	a
Leaves >14	HP MN	13.21	±	3.47	a	18.38	±	6.14	a	5.73	±	2.43	a	1.98	±	0.84	a
	HP LN	9.12	±	1.07	a	10.06	±	1.76	a	3.45	±	1.36	a	1.11	±	0.37	a
	MP MN	13.04	±	2.93	a	17.58	±	6.85	a	5.88	±	0.80	a	1.86	±	0.46	a
	MP LN	9.12	±	1.07	a	13.69	±	5.06	a	4.92	±	1.52	a	1.42	±	0.45	a
	LP MN	12.84	±	2.44	a	17.02	±	5.04	a	6.68	±	1.42	a	1.85	±	0.53	a
	LP LN	11.90	±	1.69	a	16.12	±	2.42	a	5.41	±	2.49	a	1.45	±	0.73	a
Flowers	HP MN	13.63	±	0.73	a	18.72	±	1.59	a	9.35	±	0.56	c	3.21	±	0.37	a
	HP LN	16.68	±	6.57	a	17.91	±	5.08	a	9.54	±	2.10	bc	3.16	±	0.95	a
	MP MN	13.78	±	3.85	a	17.58	±	2.50	a	10.48	±	3.11	abc	3.21	±	0.64	a
	MP LN	12.91	±	1.41	a	14.51	±	1.96	a	8.91	±	0.68	c	2.58	±	0.26	a
	LP MN	14.14	±	0.50	a	18.50	±	1.99	a	12.45	±	0.56	ab	3.44	±	0.34	a
	LP LN	15.02	±	2.04	a	20.36	±	3.30	a	12.92	±	1.69	a	3.43	±	0.42	a
Fallen leaves	HP MN	2.73	±	1.12	a	3.68	±	1.22	ab	6.32	±	2.62	b	2.14	±	0.76	a
	HP LN	3.64	±	1.65	a	3.87	±	1.23	ab	7.55	±	1.16	ab	2.50	±	0.61	a
	MP MN	2.05	±	0.42	a	2.65	±	0.31	b	5.75	±	0.60	b	1.79	±	0.08	a
	MP LN	1.95	±	0.15	a	2.19	±	0.11	b	5.64	±	0.39	b	1.63	±	0.09	a
	LP MN	2.33	±	0.46	a	3.08	±	0.88	b	7.63	±	1.52	ab	2.12	±	0.63	a
	LP LN	4.28	±	1.84	a	5.99	±	3.08	a	10.25	±	3.04	a	2.76	±	0.93	a
plants	HP MN					137.39	±	10.30	a					34.34	±	3.33	a
	HP LN					110.28	±	14.61	b					32.83	±	3.08	ab
	MP MN					131.60	±	2.16	ab					31.36	±	3.84	abc
	MP LN					112.18	±	3.18	ab					28.90	±	0.95	bc
	LP MN					131.19	±	17.69	ab					27.55	±	3.83	bc
	LP LN					135.82	±	15.16	ab					26.63	±	1.70	c

Table S5 : Elemental analysis at flowering for N+ experiment Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package “agricolae” (p-value < 0.05).

	Fertilization modalities	Phosphorus repartition (%)				Phosphorus amount (mg)			
Roots	HP MN	12.96	±	2.28	a	9.71	±	1.07	a
	HP LN	13.34	±	2.34	a	10.36	±	1.18	a
	MP MN	11.74	±	2.37	a	6.57	±	1.37	b
	MP LN	11.86	±	1.54	a	6.92	±	0.84	b
	LP MN	16.30	±	4.56	a	6.16	±	1.38	b
	LP LN	12.97	±	3.92	a	5.42	±	1.86	b
Stem	HP MN	35.45	±	2.08	ab	26.74	±	1.37	a
	HP LN	36.43	±	4.46	ab	28.57	±	4.94	a
	MP MN	38.11	±	1.46	a	21.40	±	2.35	b
	MP LN	33.34	±	1.49	bc	19.53	±	2.07	b
	LP MN	25.23	±	1.94	d	9.67	±	1.45	c
	LP LN	30.06	±	3.06	c	12.45	±	1.12	c
Leaves < 10	HP MN	1.95	±	1.92	a	1.40	±	1.35	a
	HP LN	2.74	±	0.73	a	2.16	±	0.68	a
	MP MN	4.01	±	1.37	a	2.28	±	0.89	a
	MP LN	3.45	±	2.04	a	2.03	±	1.25	a
	LP MN	3.10	±	3.52	a	1.24	±	1.49	a
	LP LN	2.04	±	2.13	a	0.88	±	0.93	a
Leaves 11 to 13	HP MN	5.52	±	2.39	a	4.08	±	1.48	a
	HP LN	6.04	±	2.07	a	4.79	±	1.88	a
	MP MN	4.10	±	0.37	a	2.30	±	0.35	a
	MP LN	3.65	±	0.74	a	2.11	±	0.30	a
	LP MN	5.16	±	1.93	a	1.99	±	0.80	a
	LP LN	4.14	±	2.87	a	1.76	±	1.27	a
Leaves >14	HP MN	32.00	±	6.75	ab	24.46	±	6.98	a
	HP LN	28.45	±	7.24	ab	22.11	±	5.26	a
	MP MN	24.55	±	2.76	ab	13.91	±	3.09	bc
	MP LN	32.75	±	3.41	a	19.07	±	1.02	ab
	LP MN	22.62	±	5.75	b	8.75	±	2.99	c
	LP LN	23.35	±	4.44	ab	9.66	±	1.71	c
Flowers	HP MN	8.59	±	0.52	d	6.47	±	0.29	a
	HP LN	9.87	±	0.93	cd	7.71	±	0.91	a
	MP MN	13.36	±	1.16	b	7.46	±	0.34	a
	MP LN	12.59	±	1.72	bc	7.40	±	1.44	a
	LP MN	20.15	±	4.02	a	7.62	±	1.04	a
	LP LN	19.10	±	0.68	a	7.93	±	0.48	a
Fallen leaves	HP MN	3.52	±	2.03	ab	2.75	±	1.81	a
	HP LN	3.13	±	0.53	ab	2.47	±	0.56	a
	MP MN	4.14	±	1.78	ab	2.30	±	0.93	a
	MP LN	2.35	±	1.96	b	1.40	±	1.21	a
	LP MN	7.44	±	5.14	ab	2.75	±	1.86	a
	LP LN	8.34	±	4.62	a	3.41	±	1.73	a
plants	HP MN					75.61	±	6.16	a
	HP LN					78.17	±	5.00	a
	MP MN					56.23	±	7.06	b
	MP LN					58.45	±	3.71	b
	LP MN					38.19	±	3.16	c
	LP LN					41.50	±	2.17	c

Table S6 : Elemental analysis at pods' maturation for N- experiment. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

	Fertilization modalities	Nitrogen repartition (%)				Nitrogen amount (mg)				Phosphorus repartition (%)				Phosphorus amount (mg)			
Roots	HP MN	18.98	±	1.59	a	50.16	±	5.65	a	13.59	±	1.93	a	9.29	±	1.72	ab
	HP LN	19.39	±	2.66	a	48.70	±	6.56	a	15.11	±	2.22	a	10.53	±	1.84	a
	MP MN	16.41	±	2.49	a	45.86	±	3.27	a	11.01	±	2.50	a	5.52	±	0.99	cd
	MP LN	19.02	±	6.47	a	47.92	±	11.84	a	16.57	±	5.69	a	7.86	±	1.79	bc
	LP MN	15.32	±	1.35	a	43.89	±	5.58	a	11.80	±	2.39	a	4.60	±	1.30	d
	LP LN	16.00	±	0.37	a	38.00	±	5.19	a	10.55	±	0.48	a	3.37	±	0.80	d
Stem	HP MN	17.54	±	4.17	a	46.64	±	13.57	a	24.16	±	5.28	a	16.68	±	5.20	a
	HP LN	17.95	±	2.44	a	45.28	±	7.91	a	23.02	±	1.15	ab	15.99	±	0.80	a
	MP MN	16.19	±	3.94	a	44.82	±	5.03	a	16.29	±	1.57	c	8.19	±	0.39	b
	MP LN	20.97	±	8.68	a	53.50	±	19.45	a	19.32	±	6.46	abc	9.29	±	2.55	b
	LP MN	12.84	±	2.70	a	36.68	±	8.05	a	17.47	±	1.66	bc	6.79	±	1.22	b
	LP LN	11.26	±	0.60	a	26.91	±	5.70	a	15.13	±	0.93	c	4.79	±	0.63	b
Leaves	HP MN	0.29	±	0.35	a	0.74	±	0.86	a	0.29	±	0.32	a	0.19	±	0.20	a
	HP LN	0.60	±	0.48	a	1.49	±	1.23	a	0.53	±	0.38	a	0.37	±	0.27	a
	MP MN	0.40	±	0.39	a	1.10	±	1.10	a	0.48	±	0.46	a	0.23	±	0.23	a
	MP LN	0.36	±	0.32	a	0.95	±	0.90	a	0.43	±	0.38	a	0.22	±	0.22	a
	LP MN	0.02	±	0.03	a	0.05	±	0.10	a	0.03	±	0.02	a	0.01	±	0.01	a
	LP LN	0.00	±	0.00	a	0.00	±	0.00	a	0.05	±	0.07	a	0.02	±	0.03	a
Siliques	HP MN	52.05	±	6.08	a	137.21	±	15.09	a	44.60	±	6.71	a	30.26	±	3.67	a
	HP LN	49.33	±	1.66	a	124.05	±	7.56	a	37.02	±	4.08	a	25.71	±	2.82	abc
	MP MN	55.00	±	6.41	a	156.82	±	36.30	a	54.50	±	3.64	a	27.67	±	4.67	ab
	MP LN	46.16	±	15.73	a	120.89	±	47.86	a	42.70	±	16.15	a	21.25	±	9.38	bcd
	LP MN	58.81	±	4.19	a	168.38	±	17.28	a	47.23	±	3.29	a	18.17	±	0.56	cd
	LP LN	59.30	±	1.04	a	141.32	±	25.00	a	49.56	±	0.98	a	15.80	±	3.34	d
Fallen leaves	HP MN	11.14	±	0.49	a	29.40	±	2.06	a	17.36	±	0.73	c	11.87	±	1.57	b
	HP LN	12.73	±	0.72	a	31.99	±	1.97	a	24.32	±	1.20	a	16.94	±	1.66	a
	MP MN	12.00	±	0.14	a	33.91	±	4.45	a	17.72	±	0.73	bc	9.00	±	1.45	c
	MP LN	13.49	±	2.12	a	34.83	±	6.69	a	20.97	±	4.47	ab	10.16	±	2.09	bc
	LP MN	13.02	±	1.57	a	37.09	±	3.17	a	23.47	±	0.51	a	9.05	±	0.57	c
	LP LN	13.44	±	1.27	a	31.76	±	2.08	a	24.71	±	0.60	a	7.85	±	1.32	c
plants	HP MN		±			264.14	±	18.02	a		±			68.28	±	7.51	a
	HP LN		±			251.51	±	13.51	a		±			69.54	±	3.65	a
	MP MN		±			282.51	±	35.45	a		±			50.60	±	6.09	b
	MP LN		±			258.09	±	29.18	a		±			48.79	±	7.20	b
	LP MN		±			286.09	±	17.70	a		±			38.62	±	3.21	c
	LP LN		±			237.99	±	37.97	a		±			31.82	±	6.11	c

Table S7 : Elemental analysis at Final stage for N- experiment. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package “agricolae” (p-value < 0.05).

	Fertilization modalities	Dry biomass (g)			Nitrogen repartition (%)			Nitrogen amount (mg)			Phosphorus repartition (%)			Phosphorus amount (mg)		
Roots	HP MN	4.31 ±	1.20	a	20.29 ±	2.76	a	27.81 ±	4.79	a	12.25 ±	1.64	b	6.16 ±	2.03	b
	HP LN	5.12 ±	0.41	a	27.22 ±	5.78	a	36.87 ±	6.09	a	19.74 ±	2.49	a	9.20 ±	1.81	a
	MP MN	4.51 ±	1.20	a	20.93 ±	3.17	a	29.38 ±	9.80	a	12.37 ±	0.64	b	4.48 ±	1.24	b
	MP LN	4.09 ±	0.17	a	23.38 ±	1.67	a	28.89 ±	0.20	a	15.81 ±	0.81	ab	6.02 ±	0.07	b
	LP MN	4.17 ±	0.43	a	21.72 ±	1.52	a	29.43 ±	4.81	a	11.25 ±	1.94	b	3.78 ±	1.03	b
	LP LN	3.90 ±	0.34	a	21.98 ±	3.79	a	27.38 ±	4.94	a	13.95 ±	6.34	b	3.80 ±	1.03	b
Stem	HP MN	6.43 ±	0.73	a	9.49 ±	2.81	a	12.60 ±	0.88	ab	11.66 ±	2.51	b	5.58 ±	0.34	a
	HP LN	6.18 ±	0.25	ab	9.75 ±	1.50	a	13.21 ±	1.30	ab	11.65 ±	1.42	b	5.37 ±	0.22	ab
	MP MN	5.88 ±	0.97	abc	9.85 ±	1.45	a	13.41 ±	2.27	a	14.45 ±	2.82	ab	5.10 ±	0.84	abc
	MP LN	5.07 ±	0.57	c	8.18 ±	0.33	a	10.13 ±	0.33	c	11.52 ±	0.68	b	4.40 ±	0.49	abc
	LP MN	5.30 ±	0.48	bc	8.33 ±	1.61	a	11.12 ±	1.18	bc	13.87 ±	1.05	ab	4.60 ±	0.42	bc
	LP LN	5.37 ±	0.20	abc	9.38 ±	0.93	a	11.65 ±	0.80	abc	16.42 ±	2.81	a	4.66 ±	0.17	c
Pericarps	HP MN	2.81 ±	0.57	a	9.69 ±	1.26	a	13.49 ±	3.46	ab	19.36 ±	1.71	a	9.67 ±	2.87	a
	HP LN	2.39 ±	0.18	a	6.38 ±	0.52	c	8.68 ±	0.37	c	14.60 ±	1.37	bc	6.79 ±	1.00	ab
	MP MN	3.23 ±	0.41	a	10.28 ±	1.01	a	14.10 ±	2.69	a	15.18 ±	1.93	abc	5.52 ±	1.79	bc
	MP LN	2.84 ±	0.84	a	8.94 ±	1.74	ab	11.15 ±	2.62	abc	16.47 ±	5.25	ab	6.36 ±	2.30	bc
	LP MN	2.56 ±	0.40	a	7.34 ±	0.73	bc	9.87 ±	0.92	bc	11.03 ±	0.15	c	3.69 ±	0.58	c
	LP LN	2.39 ±	0.30	a	7.80 ±	0.36	bc	9.71 ±	0.46	bc	12.08 ±	2.38	bc	3.44 ±	0.42	c
Seeds	HP MN	2.80 ±	1.01	a	52.51 ±	8.35	a	75.22 ±	30.43	a	45.40 ±	4.94	a	22.45 ±	6.34	a
	HP LN	2.45 ±	0.07	a	48.73 ±	7.32	a	67.02 ±	15.45	a	41.71 ±	0.57	a	19.34 ±	1.45	ab
	MP MN	2.68 ±	0.42	a	49.71 ±	3.51	a	68.20 ±	13.26	a	39.94 ±	6.39	a	14.36 ±	3.76	bc
	MP LN	2.29 ±	0.23	a	51.94 ±	1.29	a	64.45 ±	6.20	a	43.75 ±	4.47	a	16.63 ±	0.81	bc
	LP MN	2.62 ±	0.25	a	52.83 ±	3.39	a	71.19 ±	13.21	a	45.01 ±	2.67	a	15.11 ±	3.10	c
	LP LN	2.35 ±	0.24	a	51.98 ±	5.62	a	64.74 ±	7.79	a	38.63 ±	13.26	a	11.77 ±	6.25	c
Fallen leaves	HP MN	2.96 ±	0.78	a	8.02 ±	2.22	a	10.77 ±	2.22	a	11.33 ±	2.26	b	5.53 ±	1.44	a
	HP LN	3.05 ±	0.32	a	7.92 ±	0.89	a	10.75 ±	0.36	a	12.30 ±	1.20	b	5.69 ±	0.59	a
	MP MN	3.49 ±	0.93	a	9.23 ±	1.41	a	12.91 ±	4.49	a	18.06 ±	2.32	a	6.51 ±	1.72	a
	MP LN	2.54 ±	0.32	a	7.55 ±	0.66	a	9.35 ±	0.88	a	12.45 ±	1.71	b	4.74 ±	0.60	a
	LP MN	3.33 ±	0.45	a	9.78 ±	1.78	a	13.08 ±	1.78	a	18.84 ±	3.65	a	6.20 ±	0.83	a
	LP LN	2.90 ±	0.37	a	8.86 ±	1.30	a	11.01 ±	1.34	a	18.92 ±	2.79	a	5.41 ±	0.69	a
plant	HP MN	19.31 ±	3.44	a				139.89 ±	36.38	a				49.39 ±	11.66	a
	HP LN	19.19 ±	0.52	a				136.53 ±	11.63	a				46.38 ±	3.92	ab
	MP MN	19.79 ±	3.42	a				138.00 ±	30.37	a				35.98 ±	8.18	bc
	MP LN	16.83 ±	1.72	a				123.98 ±	8.99	a				38.15 ±	2.17	abc
	LP MN	17.98 ±	1.78	a				135.37 ±	17.73	a				33.37 ±	4.81	c
	LP LN	16.91 ±	0.7	a				124.48 ±	4.29	a				29.08 ±	6.04	c

Annexe : Corrélations entre les statuts N : P et les indices agronomiques liés à l'azote et au phosphore

Tableau 3 : Coefficients de corrélation et p.values obtenus entre les indices agronomiques liés à l'usage de l'azote et du phosphore et les ratios N : P des plantes obtenues au cours des expériences N- et N+ (XAE : Efficiences d'Absorption, XHI : indices de récoltes, XUtE : Efficience d'Utilisation, XUE : Efficiences d'Usage). Les p.values et coefficients de corrélation ont été obtenus en utilisant la fonction "cor.test" du logiciel R (version 4.0.2) associée au test de corrélation de Pearson.

agronomic indices	correlation coefficient	p.value
NAE	0.5387	0.0008389
^{15}NAE	0.0705	0.6818
NHI	-0.5261	0.001154
NUtE	-0.6044	0.0001298
HI	-0.3236	0.05474
NUE	-0.1441	0.4002
PHI	-0.6471	3.099E-05
PUtE	0.2713	0.1095
PAE	0.6682	1.427E-05
PUE	0.553	0.0004695

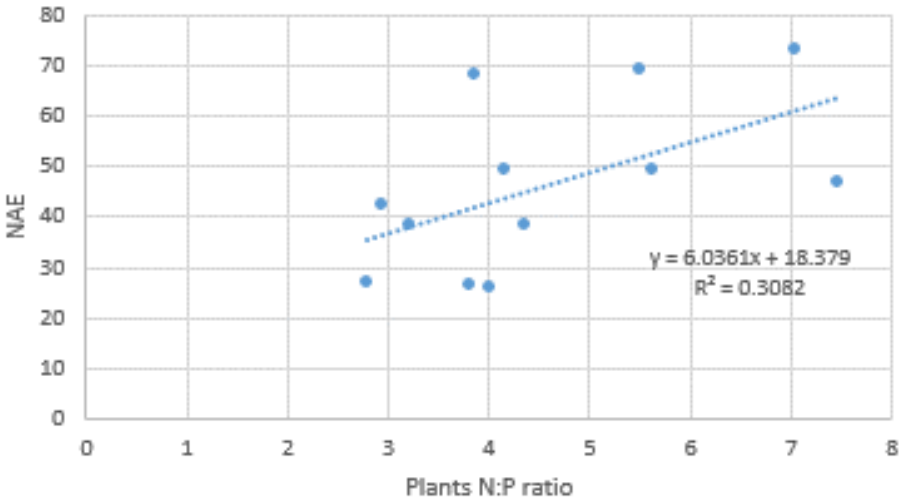


Figure38 : Régression linéaire entre l'efficience d'absorption de l'azote et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+.

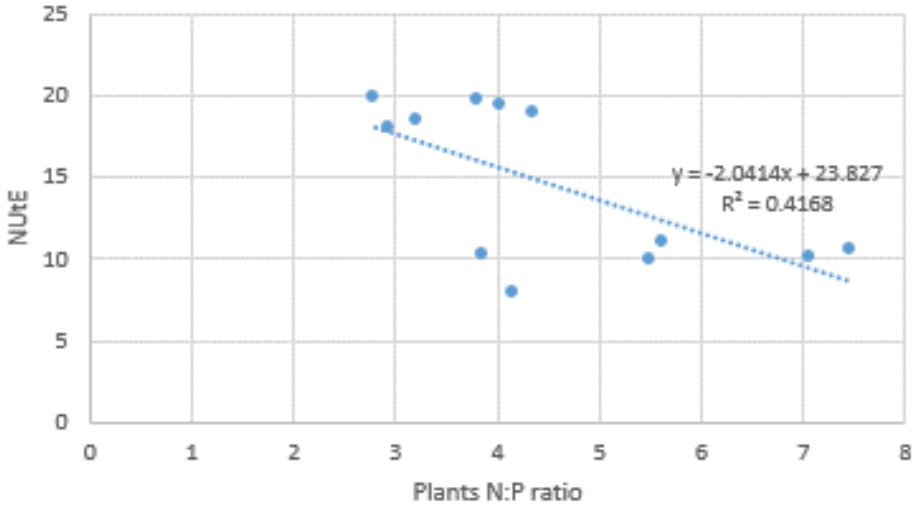


Figure 39 : Régression linéaire entre l'efficience d'utilisation de l'azote et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+.

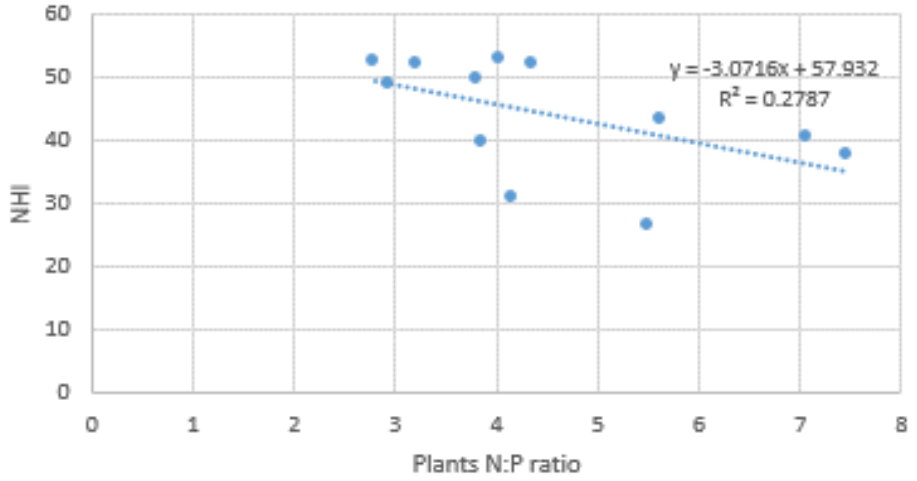


Figure 40 : Régression linéaire entre les indices de récoltes de l'azote et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+.

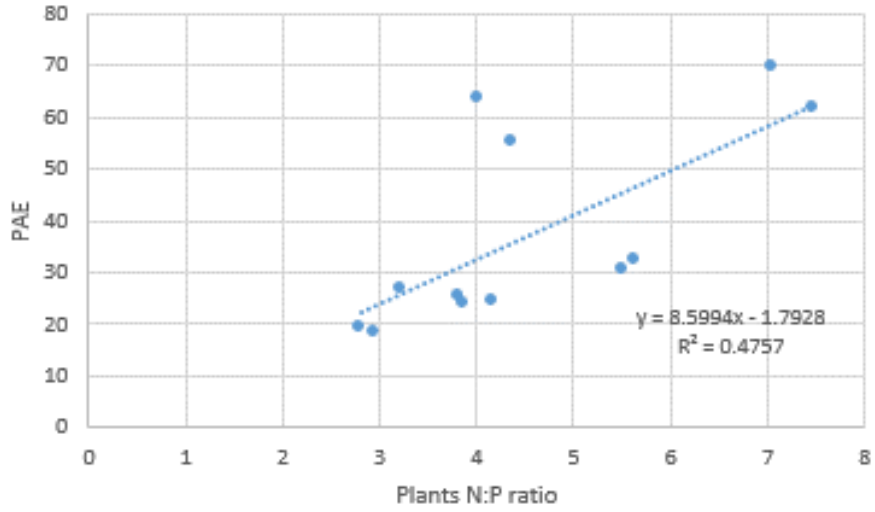


Figure 41 : Régression linéaire entre l'efficience d'absorption du phosphore et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+.

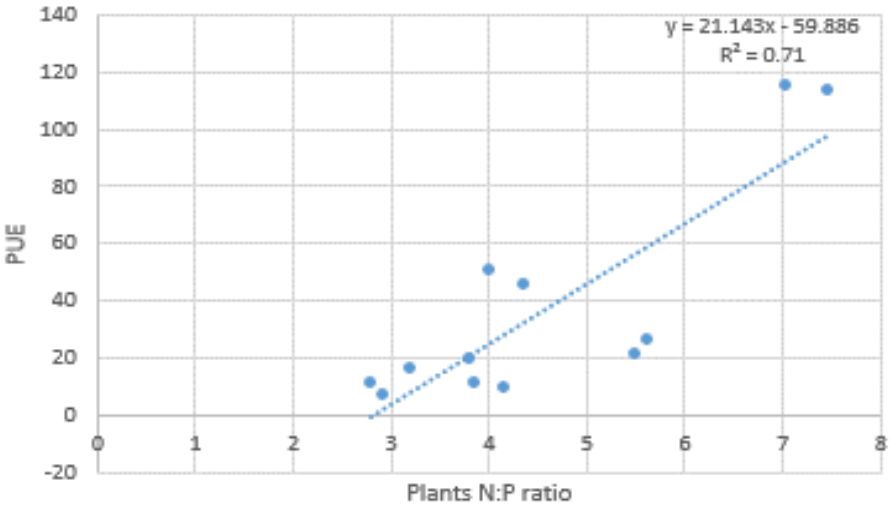


Figure 42 : Régression linéaire entre l'efficience d'usage du phosphore et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+.

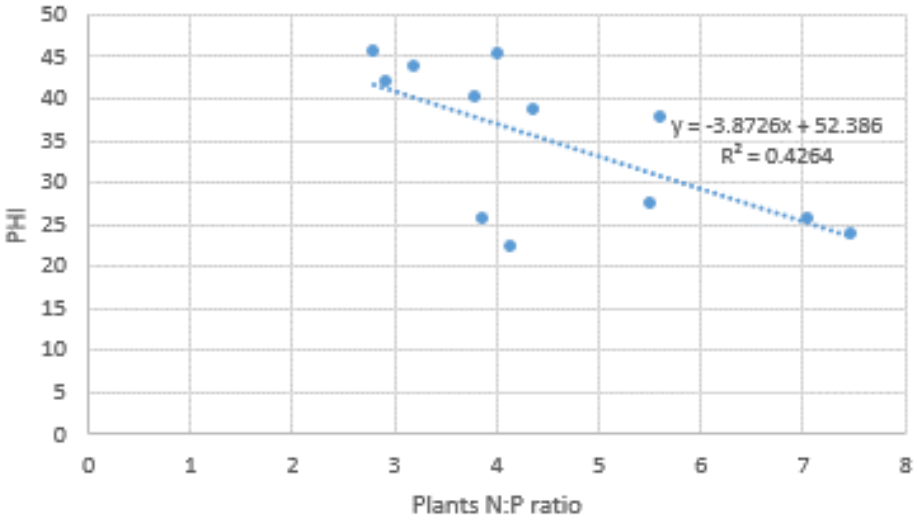


Figure 43 : Régression linéaire entre les indices de récolte du phosphore et le ratio N : P des plants obtenus au cours des expérimentations N- et N+.

B. Isoler et caractériser des PSB issus de sols Normands de grandes cultures sous des couverts végétaux de préférences nutritionnelles variées.

Hypothèse : Les souches PSB sont présentes de manière ubiquitaire dans les sols, et leurs diversités et profils sont modelés par le recrutement du couvert végétal, afin de satisfaire leur exigence en P et leurs préférences nutritives.

Objectifs : L'objectif de cette étude est de réaliser un criblage de souches PSB à partir de sols issus de parcelles agricoles présentant différents couverts (colza, pois d'hiver et féverole), et d'évaluer leur potentiel en caractérisant différents mécanismes de solubilisation et traits PGPR d'intérêt, en fonction de leur sol d'origine.

Méthodologie : Des sols ont été prélevés aux pieds des végétaux en pleine floraison afin de cribler des souches solubilisatrices de P sur deux milieux spécifiques composés de tricalcium-phosphate: Pikovskaya et NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate medium). Différents traits en lien avec la solubilisation du P ou encore des traits PGPR plus classiques ont été caractérisés. Plus précisément, les productions d'HCN et de sidérophores, la production et la quantification d'IAA, la présence d'une activité ACC déaminase ont été évaluées. Parallèlement, la diversité des souches obtenues a été identifiée par séquençage Sanger des régions V1-V2 des gènes d'ADNr 16S. L'ensemble de ces résultats a ensuite été mis en relation avec le couvert végétal de départ, puis comparé entre eux.

Principaux résultats : Des souches PSB ont été isolées avec succès des trois sols d'étude. L'évaluation des capacités de solubilisation et des traits PGPR a permis de mettre en évidence deux profils-types distincts (directs ou indirects). Les besoins en P des plantes du couvert d'origine ont eu un impact sur la structuration des communautés PSB isolées.

Les résultats de ces travaux sont regroupés sous forme d'article soumis au journal Rhizosphere le 18 octobre 2021 sous le titre *« Are native soil-borne Phosphate-Solubilizing Bacteria a relevant alternative to classical mineral fertilization in order to sustain plant growth ? Part I : When screened PSB profiles met plant requirements »*. Les résultats préliminaires de ce travail ont également été présentés sous forme de communication affichée au quatrième congrès international Biostimulants en 2019 à Barcelone (Annexe 3).

Number of Tables: 4

Number of Figures: 3

Title: Are native soil-borne Phosphate-Solubilizing Bacteria a relevant alternative to sustain plant growth ? Part I : When screened PSB profiles met plant requirements

Charlotte Amy [ab], 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

*** Corresponding author:** E-mail address: melanie.bressan@unilasalle.fr

Abstract: Phosphate management is critical in cropping systems, making fertilizer applications necessary for the success of P requiring crops. Unfortunately, this essential element for plant growth is rapidly complexed in the soil into forms that are unavailable to plants. Deployment of Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) can represent a solution for enhancing plant P uptake through remobilization of these recalcitrant forms of P. In this study, bacterial strains were isolated from soils sampled in Normandy (France), in the rhizosphere of three crops presenting various P requirements (rapeseed, winter pea and faba bean). These isolates were then screened for their PSB potential through the characterization of several interesting traits linked to P solubilization, phytate utilization, siderophore, gluconic acid and HCN productions. In parallel, other Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) traits of interest (indole-3-acetic acid (IAA) production or 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase activity) were also determined for each isolate. Numerous PSB strains were successfully emphasized, mainly belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus* genera. Isolated PSB generally presented also other interesting production IAA or ACC deaminase activity. Interestingly, PSB isolated from rapeseed soil showed higher solubilization efficiency compared to those isolated from faba bean and winter pea rhizosphere. These results highlighted the great influence of plant to shape their associated microbiome, and particularly the recruitment of PSB populations, in order to fit specific P requirement. Two distinct profiles of PSB isolates could be highlighted, with functional characteristics for P solubilization either through the deployment of direct or indirect processes. Moreover, plants with specific mechanisms to favor P nutrition seemed to preferentially recruit PSB presenting complementary characteristics to their own arsenal. Valuing PSB potential, either through artificial addition in soil of adapted isolates or through the legacy of previous crop for the further culture could represent a promising solution to sustain plant growth in P-deprived situation.

Keywords: Phosphate, Phosphate Solubilizing Bacteria, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, crop requirements

1. Introduction

Phosphorus (P), an essential element for plant growth (Vance, 2001), is unfortunately generally deficient as orthophosphate ions, the only available forms for plants. Despite many soils present important content of total P, only a 0,1 % is actually available in the soil solution (Bünemann, 2015; Illmer and Schinner, 1995). Indeed, the ionized form of P is generally rapidly bound to clay-humic complexes. Up to 80 % of total phosphorus are complexed by sorption or precipitation with mineral matter (principally with calcium) or metals (iron and aluminium oxides and hydroxydes) (Kochian et al., 2004; Menezes-Blackburn et al., 2017), or even through microbial immobilization (Roberts and Johnston, 2015). As a result, crop production has to be sustained by the application of large amounts of phosphate fertilizers. While these inputs are recognized to have deleterious effects on the environment (Grizzetti et al., 2020), they are also rapidly and strongly adsorbed onto soil particles, thus becoming unavailable in soil solution for plant uptake (Helfenstein et al., 2018). Only 10-30% of phosphate mineral fertilization can be really recovered by plants after input (Holford, 1997; Syers et al., 2009). Remobilization from a proportion of the insoluble P pool would be an interesting alternative for reducing the amount of P added to the soil via fertilizer.

P is also essential for the growth and survival of microorganisms. To undertake such challenging P acquisition, microbes have developed a wider range of more efficient strategies than plants, allowing them to use P from organic (through phosphatase activities) and inorganic forms (Illmer and Schinner, 1995). Indeed, some microorganisms can mobilize P complexed with clay particles and metals such as iron and aluminum via several processes. These mechanisms include local soil acidification through direct proton release, linkages to ammonium assimilation, or production of organic acids derived from direct carbon oxidation pathways (Alori et al., 2017; Tian et al., 2021). Another interesting indirect process implicated the production of siderophore production, a common bacterial strategy for iron acquisition. The

indirect P solubilization from metal particles represents then a positive externality for plants and microbial nutrition (Ikhajiagbe et al., 2020). Production of HCN, so far rather considered as a biocontrol metabolite in various studies and implied to promote general plant health (Babalola et al., 2021; Chandra et al., 2007; P. Kumar et al., 2012), has been recently proposed to act as a metal chelator and so represents a desirable trait that could play a crucial role in indirect P solubilization (Rijavec and Lapanje, 2016). Valorization of microorganisms presenting such interesting functional characteristics linked to potentialities of P solubilization, identified as Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB), could represent an promising alternative approach to reduce the need of P mineral fertilization, to sustain ecologically responsible intensification of agriculture (Alori et al., 2017; Calvo et al., 2014).

The rhizosphere, hotspot of interaction and exchange between plants and its associated microbiome (Philippot et al., 2013), constitute an environment of great interest to study and better understand the issue of P availability. In the rhizosphere, the abundant microbial communities are highly shaped by plant root exudation (Olanrewaju et al., 2019). To maintain their health, plants attempt to recruit beneficial microorganisms in their rhizosphere, for example in order to fulfill their need in nutrients (Jacoby et al., 2017). So, the plant's rhizosphere could constitute a relevant reservoir to search for beneficial PSM, probably more abundant in this environment.

The aim of this study was (1) to isolate and identify PSB strains from soils sampled from the rhizosphere of three different crops (rapeseed, with high P requirements; faba bean and winter pea, both with medium P requirements), and (2) to assess PSB potential and PGPR traits according to soil origin, plant influence or their environment. We hypothesize that due to their recruitment of adapted beneficial microorganisms, plants with high P requirements are promising reservoirs of more efficient PGPR that possess highly interesting P solubilization traits.

2. Materials and methods

2.1 Site description and soil sampling

Samples were collected from two arable soils located in the Pays de Bray in Normandy (France). One plot (49°47'11.364''N, 01°27'5.076''E) was split between two crops: winter pea (*Pisum sativum*, Balltrap cultivar) and rapeseed (*Brassica napus*, DK Exkio cultivar). The second plot (49°46'52.716''N, 01°40'49.116''E), 16.5 km away, was planted with faba bean (*Vicia faba*, Nebraska cultivar). The two plots showed similar textures (Figure S1) and were loamy soils according to the USDA soil classification. Soils were sampled during the flowering stage of the three crops on the 15th of May 2018. For each investigated crop, three independent soil samples were randomly collected using a manual auger from 0 to 15 cm in depth. Each replicate was constituted of a bulk composite of 5 independent and mixed soil samplings. Sampling of soil occurred near the crown of each plant and the samples were named winter pea soil (WPS), rapeseed soil (RS) and faba bean soil (FBS) for soil harvested under the winter pea, rapeseed and faba bean crops, respectively. For the plot with adjacent cultures of rapeseed and winter pea, soil samples assigned to each crop were 10 m distant from each other to avoid at most possible crossed influence of each crop rhizosphere. The soils were then sieved at 2 mm and stored at + 4 °C for bacterial cultures and – 80 °C for molecular biology assays. Physicochemical properties were assayed by standard methods: soil pH was determined using the water-pH method (NF ISO 10390), and soil total and organic carbon were assayed using a Total Organic Carbon (TOC) Analyzer (Shimadzu SSM-5000A/TOC-VCSH Carbon, Shimadzu, Kyoto, Japan). Soil total nitrogen was determined by the Kjeldahl method (Kjeldahl, 1883). Active Calcium Carbonate content was assayed following methods described in standard NF-X31-106 (2002). Phosphorus content was determined using the Olsen method (NF ISO 11263) to estimate directly available P.

2.2 Soil bacteria isolation

Soil bacteria were isolated as follows: 5 g of each sieved soil sample were suspended in 45 mL of NaCl (0.9%) and homogenized by vortexing for 5 min. Serial dilutions of this suspension were then prepared in NaCl (0.9 %). In parallel, initial soil suspensions were also centrifuged for 5 minutes at 1000 rpm and serial dilutions were performed in NaCl (0.9 %). Dilutions of 10^{-3} and 10^{-4} for the non-centrifuged suspension and 10^{-2} and 10^{-3} for the centrifuged suspension were plated on Luria Broth (LB) agar and Reasoner's 2A (R2A) media and incubated for 48 hours at ambient temperature. These multiple procedures were deployed to maximize diversity of culturable strains. About 300 strains from both the LB and R2A media were taken and re-isolated on LB agar medium. To maximize the probability of obtaining different strains, isolates were selected based on their maximal phenotypic differences. Strains were stored in a 15 % glycerol solution at – 80 °C.

2.3 Screening and characterization of bacterial isolates

2.3.1 PSB abilities

2.3.1.1 Determination of the solubilization index

In vitro abilities of phosphate solubilization were determined for all strains by plating on solid Pikovskaya medium (0.5 $g.L^{-1}$ yeast extract; 10 $g.L^{-1}$dextrose; 5 $g.L^{-1}$ $Ca_3(PO_4)_2$; 0.5 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$; 0.2 $g.L^{-1}$ KCl; 0.1 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$; 0.1 $mg.L^{-1}$ $FeSO_4$; 1.5% agar) (Pikovskaya, 1948) and NBRIP medium (10 $g.L^{-1}$ dextrose; 2.5 $g.L^{-1}$ $Ca_3(PO_4)_2$; 5 $g.L^{-1}$ $MgCl_2$; 0.25 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$; 0.2 $g.L^{-1}$ KCl; 0.1 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$; 1.5% agar) as described by (Nautiyal, 1999) and incubated at 30 °C for 4 days. The solubilization index (SI) was calculated as follows:

$$SI = \frac{colony\ diameter}{solubilization\ halo\ diameter}$$

Every strain presenting an SI >1 in at least one of the two media was considered as a PSB.

2.3.1.2 Phytate utilization assay

The abilities of the bacteria to use phytate, an organic source of P, were tested by plating strains on specific Phytate Screening Medium (PSM medium) (Howson and Davis, 1983) (5 $g.L^{-1}$ sodium phytate; 10 $g.L^{-1}$ sucrose; 2 $g.L^{-1}$ $(NH_4)_2SO_4$; 3 $g.L^{-1}$ tryptone; 2 $g.L^{-1}$ yeast extract; 0.5 $g.L^{-1}$ KCl; 0.5 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$; 0.01 $g.L^{-1}$ $MnSO_4$; 0.01 $g.L^{-1}$ $FeSO_4$; 1.5 % agar). Plates were incubated for 4 days at 30°C and the SI was calculated as previously described.

2.3.1.3 Siderophore production

Siderophore production was tested on modified CAS medium as described by (Lakshmanan et al., 2015). Briefly, 60.5 mg of CAS were dissolved in 50 mL of water. Then 270 mg of $FeCl_3.6H_2O$ were dissolved in a 10 mM HCl solution and added to the CAS solution. Then an HDTMA solution was prepared by dissolution of 72.9 mg of HDTMA in 40 mL of water in a beaker under agitation. CAS-Iron (III) solution was then slowly added to the HDTMA, and the mixture was autoclaved. Finally, this sterile solution was added to LB agar medium. Bacteria were cultured for 5 days at 28 °C. Colonies presenting an orange halo were considered as siderophore-producing strains.

2.3.1.4 Gluconic acid production assay

Production of gluconic acid were assessed for all strains through culture in 50 mL of liquid Pikovskaya medium for 5 days at 30 °C. Bacterial suspensions were then centrifuged for 10 min at 4000 rpm and 4 °C. Supernatant were collected for spectrophotometric assay with a D-Gluconate Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA) following the manufacturer's recommendations.

2.3.2 Other PGPR traits of interest

2.3.2.1 IAA production assay

IAA production was measured with the method described by Kumar et al. (2012). Strains were pre-cultured in liquid LB medium for 24 h. Then 50 mL of liquid NB medium were

supplemented with 0.1 % D-L-tryptophan and inoculated with 500 µL of pre-culture and incubated at 30 °C under orbital agitation (120 rpm) in the dark for 48 h. The quantities of IAA were estimated by colorimetric reaction. Cultures were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm and 4 °C. One mL of supernatant was added to 4 mL of Salkowski reagent and the absorbance of the pink coloration was read at 535 nm in a UV/visible spectrophotometer.

2.3.2.2 ACC deaminase activity

ACC deaminase activity was assessed according to the method of Glick et al. (2011). Bacterial strains were precultured overnight on Tryptone Soja Agar. The isolated colonies were then transferred onto nitrogen-free medium (5 g D,L-malic acid; 0.5 g K_2HPO_4; 0.2 g $MgSO_4$; 0.1 g NaCl; 15 g agar; 4 mL of 1.64 % Fe(III) EDTA; 1 mL of biotin 0.01 % + pyridoxine 0.02 %; 1 L distilled water; adjusted to pH 6.8) with the addition of 120 µL of filter sterilized 0.5 % ACC. Plates were incubated at 30 °C for 4 days. As ACC is the sole nitrogen source contained in this medium, bacterial strains that were able to grow were considered as ACC deaminase producers.

2.3.2.3 HCN production

Hydrogen cyanide (HCN) production was assessed with the method outlined by Bakker and Schippers (1987). PSB strains were plated on Nutrient Agar. Whatman n°1 filter disks were soaked in 0.5% picric acid prepared in 2% sodium carbonate. The disks were then placed in Petri dish lids and the Petri dishes were sealed and incubated upside down for 4 days at 30 °C. A change in disk color from yellow to brown indicated HCN production by bacterial strains.

2.3.3 PSB identification

PSB strains were cultivated in LB broth for 24 h and then centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet containing bacterial cells was stored at –20 °C. Before analysis, frozen pellets were incubated for a few minutes in a water bath at 60 °C. Amplification of ribosomal 16S DNA was performed by PCR using 1 µL of 63f primer (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') (Marchesi et al., 1998) and a primer derived from

341f (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3') (Muyzer et al., 1993), 2 µL of bacterial culture, and 1X of GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) in a final volume of 50µL. PCR reaction was performed in a GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, USA). The amplification program was 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1 at min 72 °C. A final extension step was performed for 7 min at 72 °C. PCR product quality was verified by electrophoresis on agarose gels stained with ethidium bromide. Amplicons were then sequenced using the Sanger method by Genoscreen (Lille, France) and aligned using the sequence match tool from the Ribosome Database Project (RDP, Cole et al., 2014). Sequences obtained by 16S Sanger sequencing were then aligned using the ClustalW algorithm implemented in MEGA X. A phylogenetic tree was then constructed following the maximum likelihood method, and bootstrapping (100 replicates) was used to investigate robustness.

2.4 Statistical analyses

All data were analyzed using R 64-bit version 4.0.2. One-way analysis of variance (ANOVA) of the "multcomp" package was performed, followed by a post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" for comparison between the 3 crops. For proportion differences, chi-square tests were performed on contingency tables using the chisq.test function. P values < 0.05 were considered as significant. Data are expressed as means ± SEM (Standard Error of the Mean). PCA analysis was performed using the package "Factoshiny" to compare physico chemical properties of native soils and global traits of isolated PSB strains.

Table 1: Physicochemical properties of soils sampled from rapeseed, winter pea and faba bean (mean ± SD). Letters indicate significant differences between the 3 different soils for each chemical parameter.

	Origin of the sampled soil					
	Rapeseed		Winter pea		Faba bean	
pH	7,84 ± 0,05	*ab*	7,90 ± 0,04	*b*	7,98 ± 0,04	*a*
Total Carbon (g / kg)	19,62 ± 0,17	*b*	20,69 ± 0,44	*a*	10,64 ± 0,26	*c*
Total Organic Carbon (g / kg)	18,74 ± 0,26	*b*	19,78 ± 0,40	*a*	10,46 ± 0,28	*c*
Organic matter (%)	3,37 ± 0,03	*b*	3,56 ± 0,07	*a*	1,83 ± 0,04	*c*
Calcium (ppm)	6,52 ± 0,17	*a*	6,56 ± 0,16	*a*	3,94 ± 0,09	*b*
Total Nitrogen (mg / g)	2,55 ± 0,03	*a*	2,43 ± 0,05	*a*	1,59 ± 0,06	*b*
Olsen Phosphorus (mg / kg)	2,50 ± 0,10	*a*	1,18 ± 1,79	*a*	22,12 ± 0,29	*b*

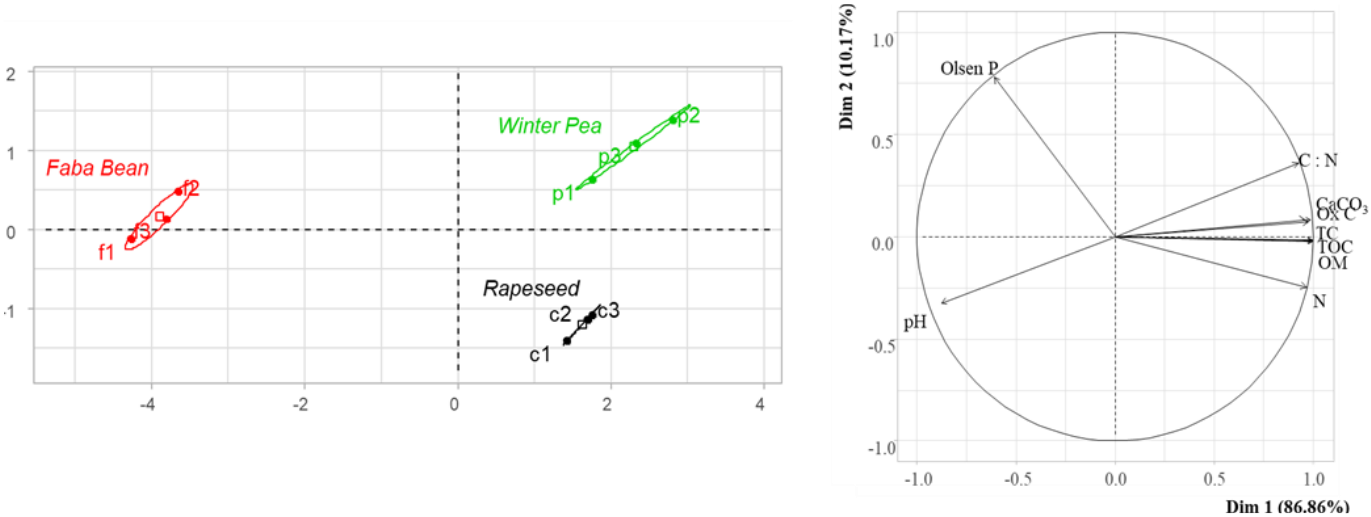


Figure 1: Principal Component Analysis of physicochemical properties of native rhizospheric soils. N, nitrogen; OM, organic matter content; CaCO3, calcium carbonate content; TC, total carbon; TOC, total organic carbon; Ox C, oxidizable carbon; C : N, carbon to nitrogen ratio; Olsen P, directly available phosphorus

Table 2: PSM identification by 16S rDNA sequencing in the soil sampled under rapeseed, winter pea and faba bean crops.

	Origin of the sampled soil		
	Rapeseed	Winter pea	Faba bean
Pseudomonas sp	28	24	32
Bacillus mycoides	5	3	3
Bacillus pseudomycoides	7	2	2
Bacillus simplex	11	2	6
Bacillus sp	4	3	2
Paenibacillus	2	3	0
Others	9	1	6
total PSM strains	66	38	51
Pseudomonas proportion	42%	63%	63%
Bacillus proportion	41%	26%	25%
PSM proportion in all isolated bacteria	62,9 %	42,7 %	48,6 %

3. Results

3.1 Physico-chemical profiles of native soils

Both soils were sandy-clay-loam, which is classical for Normandy. All measured physico-chemical properties are summarized in Table 1. FBS was significantly different from WPS and RS (Figure 1). FBS showed lower carbon (C), organic matter, nitrogen (N), calcium carbonate contents and C:N ratio, but higher P availability. The lowest P availability was observed for RS.

3.2 Screening and evaluation of phosphate solubilization efficiency.

Phosphate-solubilizing potential and efficiency were screened on both Pikovskaya and NBRIP media. Among 300 culturable bacteria isolated (100 per soil), a total of 155 strains showed a SI > 1 on at least one medium (Pikovskaya or NBRIP), and so were classified here as PSB (Table 2). When considering each medium apart, a total of 117 strains showed solubilization properties (with a SI > 1) on Pikovskaya medium (54 strains from RS, 31 strains from WPS and 32 strains from FBS) and 121 strains on NBRIP medium (46 strains from RS, 29 from WPS, 46 from FBS). Only 79 strains presented a SI >1 when considering both media (33 from RS, 22 from WPS and 24 from FBS). The highest proportion of PSB were observed in RS (66 strains, i.e. 62.9 % of isolated RS bacteria), followed by 51 PSB strains found in FBS, representing 48.3 % of our initial bacterial bank for FBS. The lowest proportion of PSB strains was observed in WPS with 38 strains (42.7 % of isolated WPS bacteria).

SI of PSB screened from RS on Pikovskaya medium (Table 3) reached a significantly higher mean value of 1.61 (± 0.04) compared to 1.34 (± 0.04) from WPS and 1.28 (±0.06) from FBS. The average SI values obtained on NBRIP medium were higher than those obtained on Pikovskaya medium: 1.77 (± 0.11) from RS, 1.44 (± 0.04) from WPS and 1.55 (± 0.06) from

Table 3 : Phosphate solubilization abilities of PSM strains from rapeseed, winter pea and faba bean soils. The solubilization index (SI) was observed on the two tested media for inorganic P and the phytate solubilization abilities of phytate-solubilizing PSM strains. Letters indicate significant differences between soils for each medium.

		Origin of the sampled soil		
		Rapeseed	Winter pea	Faba bean
SI on NBRIP medium	Mean ± SE	1,77 ± 0,11 *a*	1,44 ± 0,04 *a*	1,55 ± 0,06 *a*
	Median	1,54	1,46	1,53
	SI max	4,81	2,23	2,69
SI on Pikovskaya medium	Mean ± SE	1,61 ± 0,04 *a*	1,34 ± 0,04 *b*	1,39 ± 0,06 *b*
	Median	1,53	1,31	1,28
	SI max	3,14	2,64	3,67
SI on phytate medium	Mean ± SE	2,17 ± 0,15 *a*	1,9 ± 0,12 *a*	1,21 ± 0,05 *b*
	Median	1,29	1,87	1,44
	SI max	4,9	2,62	2,23

Table 4 : Various PGPR traits and solubilization mechanisms of isolated PSM from rapeseed, winter pea and faba bean soil. Data are expressed as a percentage of all isolated PSM and as a proportion (in parentheses). Letters indicate significant differences based on chi-square tests between soils for each tested PGPR trait.

	Origin of the sampled soil								
	Rapeseed			Winter pea			Faba bean		
Siderophore producing strains	62,1	(41/66)	*b*	84,2	(32/38)	*a*	72,4	(38/51)	*ab*
ACC deaminase producing strains	59,7	(40/66)	*a*	73,7	(28/38)	*a*	63	(34/51)	*a*
HCN producing strains	13,6	(9/66)	*a*	10,5	(4/38)	*a*	23,5	(12/51)	*a*
IAA producing strains	24,2	(16/66)	*b*	34,2	(13/38)	*ab*	49	(25/51)	*a*
Gluconic acid producing strains	62,1	(41/66)	*a*	*60,5*	*(23/38)*	*a*	*70,6*	*(36/51)*	*a*

FBS (Table 3). However, no significant differences were found when comparing these SI for PSB isolated from RS, WPS and FBS. Among the original 155 PSB, 68 presented an ability to solubilize phytate, with 39.4% from RS, 28.9% from WPS and 60.8% from FBS (26, 11 and 31 strains, respectively). The proportion of isolated PSB that degraded phytate was significantly higher from FBS. Conversely, the SI for phytate utilization (Table 3) was highest for PSB from RS, followed by PSB from WPS, and finally PSB from FBS, with values of 2.17 (± 0.15), 1.90 (± 0.12) and 1.21 (± 0.05), respectively.

3.3 Molecular identification of phosphate solubilizing bacteria.

Ribosomal DNA sequencing allowed genus identification for all strains, up to species identification for several of them. *Pseudomonas* was the main genus found in the PSB pool, represented 42 % of all PSB isolated from RS, and 63 % from both FBS and WPS. The second dominant genera identified was *Bacillus*, representing 41% for RS, 26 % for WPS and 25 % for FBS. *Paenibacillus* strains were found only in RS and WPS, representing respectively, 3 % and 8 % of isolated PSB. Some other anecdotal PSB genera or species were identified, including *Buttiauxella izardii*, *Microbacterium oleivorans*, *Microbacterium phyllospherae, Sanguibacter inulinus* and *Plantibacter flavus* from RS. *Erwinia rhapontici* was the only strain found in WPS other than *Pseudomonas, Paenibacillus* and *Bacillus*. Other PSB strains in FBS were affiliated to the species *Acinetobacter calcoaceticus, Stenotrophomonas rhizophila, Erwinia billingiae, Pectobacterium wasabiae* and *Serratia sp.*

No specific clusterization related to soil origin was observed according to phylogenetic tree construction for any of the PSB isolates (Figure S2).

3.3 Characterization of other functional PSB and PGPR traits of interest

Several traits of interest linked with P solubilization were explored. A large proportion of PSB isolates were able to produce siderophores on CAS medium (Table 4), representing

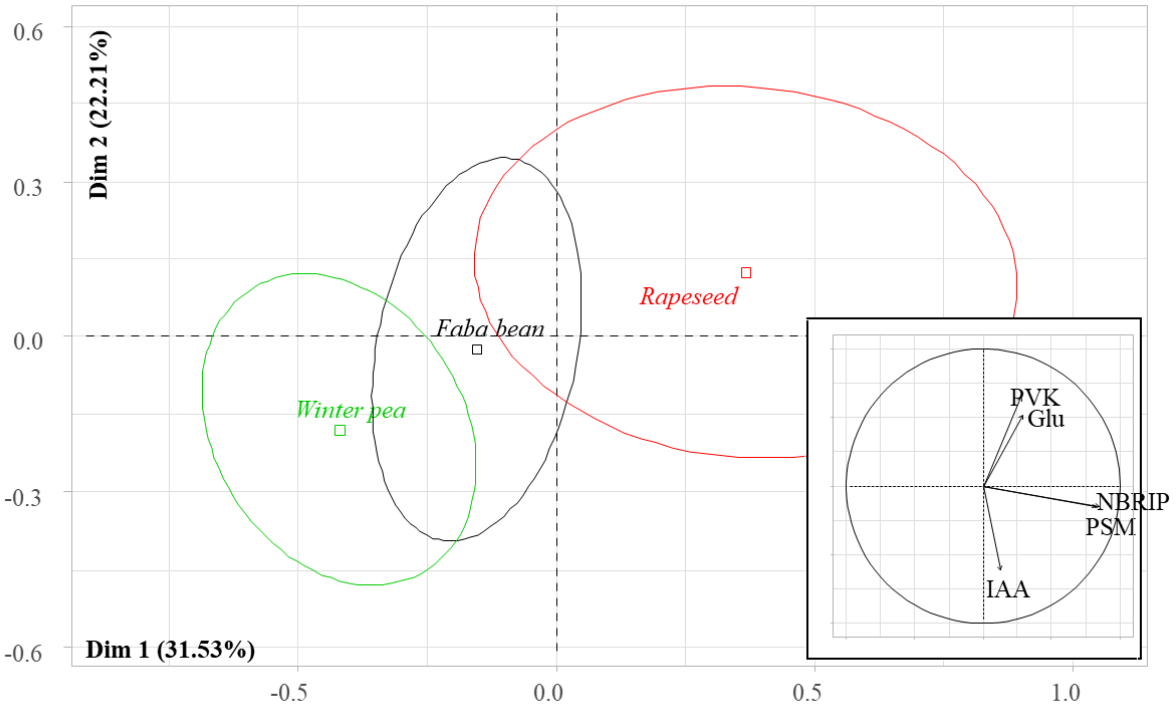


Figure 2 : Principal Component Analysis of PSM strains according to their soils of crop origin. Correlation circles comprise the solubilization indexes on Pikovskaya (PVK), Phytase Screening (PSM), and NBRIP Media, and the gluconic acid (Glu) and IAA assays.

71.0 % of all PSB. This proportion was higher for WPS (84.2 %) than for RS (62.1 %), while no differences were found for FBS (72.4 %) compared to the other soils investigated. The percentages of HCN-producing isolates were the same for each investigated crop soil, representing only a small proportion of all PSB (16.1 % on average). The gluconic acid assay highlighted 41 producing strains from the rapeseed plot (62.1% with a mean production of 139.5 ± 22.4 µg mL^{-1}), 23 producing strains from the winter pea plot (60.5% with a mean production of 104.0 ± 19.6 µg mL^{-1}) and 36 producing strains from the faba bean plot (70.6% with a mean production of 156.6 ± 33.0 µg mL^{-1}) (Table 4). The proportion of PSB strains producing gluconic acid tended to be greater in FBS, and they had higher production abilities. Interestingly, the proportions observed in both WPS and RS were similar.

Concerning IAA, 34.8% of all strains were actually producers. A higher number of IAA-producing strains was observed under FBS (49.0%) compared to RS (24.2%), while no differences were found regarding WPS (34.2%). IAA-producing PSB showed a mean production of 73.3 ng μL^{-1} (± 9.8), 54.3 ng μL^{-1} (± 8.4) and 46.9 ng μL^{-1} (± 5.0) for PSB originating from RS, WPS and FBS, respectively. IAA amounts produced were highest considering PSB strains from RS (from a range of 7.7 to 297.1 ng μL^{-1}), followed by WPS (3.5 to 208.5 ng μL^{-1}) and lowest for FBS (2.6 to 147.6 ng μL^{-1}). Due to the combination of proportion of IAA-producing PSB and variations in quantities, all PSB strains showed close mean productions of auxin: around 20 ng μL^{-1} on average. Regarding ACC deaminase activity, no significant differences were highlighted. About 59.7 % of strains isolated from RS were able to use ACC as an N source, 73.7% for PSB from WPS and 63.0% for PSB from FBS.

Principal Component Analyses (PCA) of these results, plotted according to soil origins, showed a separation in the PSB populations between RS and WPS due to the higher P solubilization values of the RS populations on NBRIP, Pikovskaya and PSM media (Figure 2).

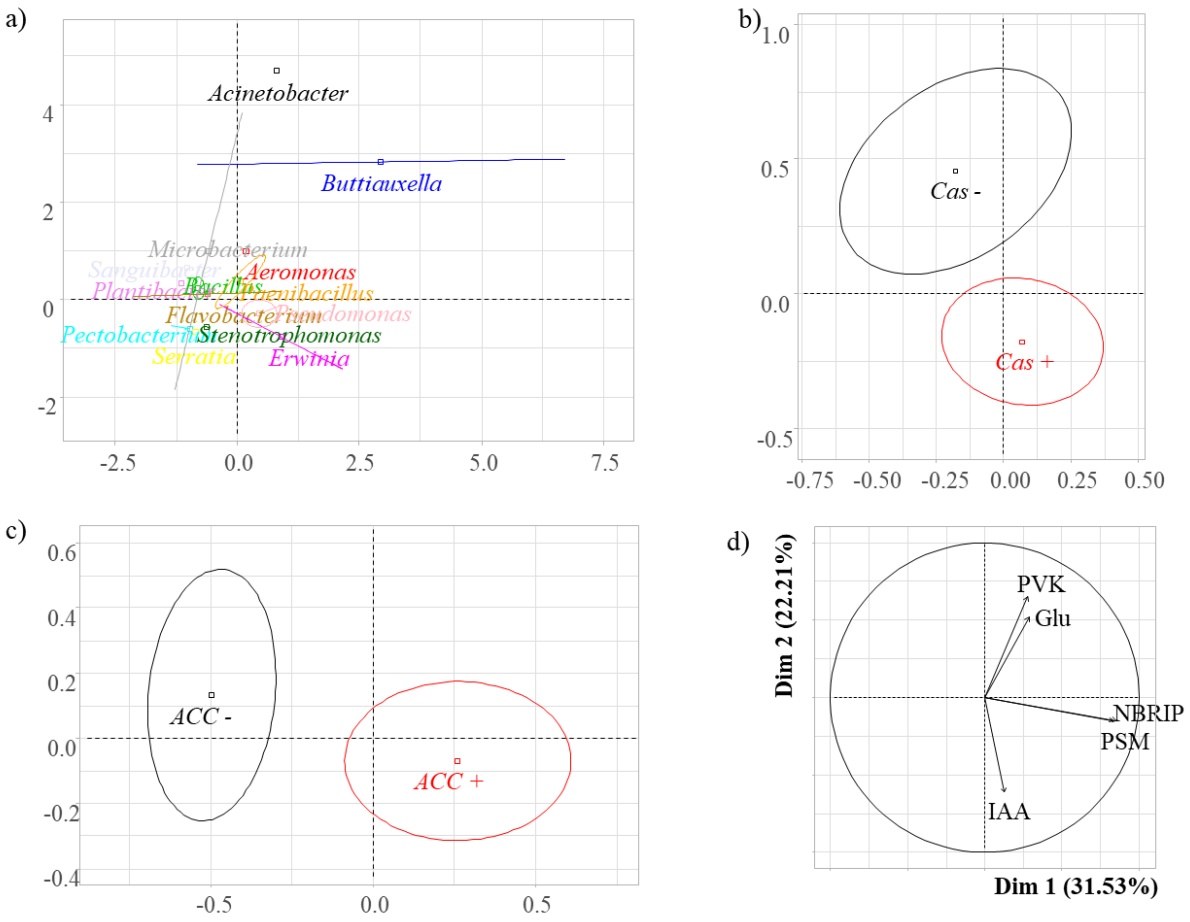


Figure 3: Principal Component Analysis of PSM strains according to (a) their genera; (b) abilities to produce siderophores on CAS medium; or (c) to degrade ACC. The correlation circles (d) comprise the solubilization indexes on Pikovskaya (PVK), Phytase Screening (PSM), and NBRIP Media, and the gluconic acid (Glu) and IAA assays.

The same PCA, plotted according to PSB genera (Figure 4a), highlighted that all PSB genera have similar mean solubilization abilities and PGPR characteristics, except for the genera *Buttiauxella* and *Acinetobacter*. These two genera seemed to show higher SI values on Pikovskaya medium and a higher gluconic acid production. Siderophore-producing PSB showed distinct characteristics from non-producing ones (Figure 4b). Indeed, interestingly, siderophore-producing strains tended to produce more IAA but less gluconic acid and had lower SIs on Pikovskaya medium. Similarly, the presence of ACC deaminase activity seemed to be linked to higher SIs on NBRIP and PSM media (Figure 4c). The SIs on NBRIP medium seemed also to correlate with phytate utilization. Solubilization on Pikovskaya medium seemed to correlate with gluconic acid production (Figure 4d). No distinct profile could be found between HCN-producing PSB and non-producing strains (data not shown).

4. Discussion

4.1 Identification of potential PSB strains from soils in Normandie

The use of beneficial microorganisms as biofertilizers represents an emerging and promising alternative to mineral fertilizer application (Menezes-Blackburn et al., 2017). Numerous bacterial strains with PSB or PGPR abilities have already been reported in the literature (Alori et al., 2017). In this study, we decided to appoint as PSB all bacterial isolates presenting a SI > 1 on at least one of the tested media (Pikovskaya or NBRIP). The three investigated soils hosted a great variety of PSB strains, representing a wide range of the overall culturable bacteria. Unsurprisingly, most of the PSB isolates belonged to *Pseudomonas* and *Bacillus* genera, which are among the most represented PSB genera described in the literature (Ghorbanzadeh et al., 2020; Safari et al., 2020; Saxena et al., 2020). The third most abundant genus here was *Paenibacillus* which has also previously been described as an endophytic PGPR mainly isolated from legume nodules and showing P solubilization abilities (Ali et al., 2021).

However, surprisingly, this genus was not detected in faba bean rhizosphere. Most of the other genera found in our study also had prior description as potential PSB strains (Araújo et al., 2021; Emami et al., 2020; Mitra et al., 2020; Rodríguez and Fraga, 1999), except for *Sanguibacter*, mainly known as N_2 fixing bacteria with biocontrol properties against nematode infestation (Alishahi et al., 2020; Moussa and Zawam, 2010). To our knowledge, the present study reveals for the first time a *Sanguibacter inulinus* isolate with phosphate solubilization abilities and can thus be described as a PSB.

To characterize the ability of bacterial isolates to solubilize inorganic phosphate, two dedicated media were used: Pikovskaya and NBRIP (Pikovskaya, 1948; Nautiyal, 1999). These two media are classically used for screening of PSM (Suleman et al., 2018; Xiao et al., 2020). NBRIP medium provide a more stringent environment, with lower quantities of C and N sources compared to Pikovskaya medium. Most of our PSB isolates showed positive P solubilization on both medium, despite occasional differences in the SI value range for the same strain. However, some isolates showed a positive solubilization of inorganic P in only one medium. These differences were probably linked to the adaptation of bacterial metabolism to their surrounding environmental conditions, and particularly in response to nutrient ratios (Cui et al., 2018; Manzoni et al., 2017). An accurate evaluation of P solubilization in several environmental conditions would be a relevant procedure for PSB screening and to better understand and so exploit their potential.

Other direct and indirect mechanisms of P solubilization were explored in parallel. We decided to focus our screening on acidification ability, through the assessment of gluconic acid production as one of the principal organic acids released by PSB (Alori et al., 2017). We also evaluate siderophore production, phytate utilization and HCN production.

Beside these specific PSB characteristics, auxin production and ACC deaminase activity, other interesting classical PGPR traits, were also explored according to their possible interest for root growth enhancement, and so potentiality to increase the volume of soil prospected by plants (Ambreetha and Balachandar, 2019; Richardson et al., 2009)

When considering jointly all studied traits, two interesting PSB profiles can be distinguished. Isolates showing better direct solubilization of phosphate also presented high secretion of gluconic acid but lacked siderophore production. So, it could be hypothesized that these isolates would improve P availability in soil rather through direct processes. On the contrary, PSB strains that showed lower direct solubilization correlated with low gluconic acid production were able to produce siderophores and also high levels of auxin, improving P availability in soil rather via indirect processes. PSB strains that are efficient in solubilizing phosphate in more deprived conditions (on NBRIP medium, with lower N and P content) were also able to use phytate and had positive ACC deaminase activity. These strains showed a broad metabolism, with the solubilization of both inorganic and organic P, maybe more adapted to stressful and variable soil conditions. Only little relationship between PSB characteristics and bacterial genus, except in the cases of the *Buttiauxella* and *Acinotetobacter* strains, less studied than *Bacillus* or *Pseudomonas*. Indeed, in our study the *Buttiauxella* and *Acinotetobacter* strains showed globally higher potential for P solubilization on Pikovskaya medium and high production of gluconic acid. The other genera studied showed great variability in all studied traits. These results emphasize the importance of exploring total soil microbial diversity, without setting up an *a priori* screening approach.

4.2 The influence of plant type on the beneficial microorganism community

In this work, the presence and diversity of culturable PSB was explored in the rhizosphere of three different crops, each with their own specificities and P requirements.

Interestingly, a higher number of PSB isolates were recovered from rapeseed relative to winter pea or faba bean. Because rapeseed is known to have high P requirements compared to legume crops (Bolland et al., 1999; Bolland and Brennan, 2008), this higher PSB abundance and proportion among culturable bacteria was actually expected. These results emphasize the strong influence of the rhizosphere environment on the culturable PSB community, and particularly the specific nutrient preference of each plant species to condition microbiome's recruitment. Plant influence on the rhizospheric bacterial community is well known (Costa et al., 2006; Gkarmiri et al., 2017). The specific assemblages of the associated microbiome are governed by each plant species' traits, and more particularly as part of an adaptative strategy to sustain and improve nutrient acquisition (Bakker et al., 2018; Cai et al., 2017; Dastogeer et al., 2020; Fitzpatrick et al., 2018). Some recent studies have assessed plant-microbe interactions and plasticity in terms of the P nutritional status of the plant (Castrillo et al., 2017; Pang et al., 2021). For instance, in the eggplant rhizosphere, Li et al. (2019) demonstrated a correlation between P-requiring developmental stages and PSB abundance and efficiency. In their study, the highest P requirements occurred during flowering and fruit maturation. In the current work, soils were also sampled during flowering in the three crops, which could have maximized the probability of screening efficient and diverse PSB.

A noteworthy trend in the level of phosphate solubilization indexes according to the investigated rhizosphere could be also highlighted. Indeed, in the rhizosphere of rapeseed, where the P requirement was high, the solubilization indexes of isolated PSB were higher than those isolated from the soil under the legumes. PSB found under winter pea and faba bean, with comparable P requirements (Bolland et al., 1999), presented similar P solubilization indexes despite geographical distancing between fields and differences in some soil physico-chemical properties. Recruitment of more efficient PSB by rapeseed supported again the hypothesis of a targeted selection linked to plant nutrient preference. However, the higher proportion of PSB

in rapeseed rhizosphere could also be due to the lower content of available P, leading to a higher need of PSB recruitment for the crop, when compared to winter pea and faba bean. Nevertheless, high requirement of P of rapeseed, and so nutrient uptake in soil with the help of PSB populations, could also be one of the mains reasons explaining the lower observed content of available P in its rhizosphere.

A lower diversity in PSB species could be expected in soil under rapeseed (Siebers et al., 2018). Indeed, in the rhizosphere of rapeseed, the rhizodeposition of glucosinolates represented a major constraint, compelling and shaping microbial communities (Bressan et al., 2009). Rumberger and Marschner, (2003) showed that these brassicaceous sulphurous metabolites and their products of degradation with bioactive properties are continuously released by living canola roots in the rhizosphere, even if they can be rapidly degraded by some microorganisms (for example, in 90 h for 2-phenylethylisothiocyanate). Nevertheless, in our study, PSB isolates retrieved from rapeseed rhizosphere were affiliated to a larger variety of genera than those from soil harvested under winter pea or faba bean. While different proportions of PSB strains were found in the three investigated soils, the proportions among the two main genera (*i.e.*, *Pseudomonas* and *Bacillus*) were incredibly similar in the soils under the legumes, despite the geographic distance and differences in measured physico-chemical properties of the soils, but were distinct from the rapeseed crop's soil. The abundance of PSB affiliated to *Bacillus* genus was lower under winter pea, compared to rapeseed, which is consistent with the generally overall lower level of *Bacillus* observed in the rhizosphere of legumes (Kumar et al., 2012). Conversely, a decrease in *Pseudomonas* abundance has been previously observed in rapeseed's rhizosphere (Gkarmiri et al., 2017). However, Gkarmiri et al. (2017) also demonstrated that despite this lower abundance, this bacterial genus seemed to be highly active in the rhizosphere.

Because these three crops are known to deploy different physiological and morphological strategies of adaptation to P stress conditions (Honvault et al., 2020), we could hypothesized that each crop would have selected PSB strains possessing functioning complementary or synergistic with their own P acquisition strategies. Indeed, Honvault (2020) showed that P acquisition strategies for legumes were geared towards direct mechanisms with phosphatase release and decreases in soil pH, while Brassicaceae rather increased fine roots and hair production to explore a higher soil volume and also released carboxylates. In the present work, rapeseed seemed to recruit PSB profiles with direct solubilization mechanisms (high SI), while the PSB from winter pea and faba bean showed an indirect solubilization profile with higher production of siderophores and auxin. However, as our study has only focused on culturable PSB, representing only a small proportion of the total microbiome of the soil (Steen et al., 2019), the hypothesis of this synergy between plants abilities and microbial recruitment of complementary characteristics will require greater exploration.

Even if the chosen *in-situ* approach is undoubtedly influenced by several confounding factors, our results remain of interest to take into account specific plants microbiomes properties in crop rotations and in mixed-cropping. Particularly, besides a direct influence of the cultivated crop, the possible influence of the physicochemical characteristics of soil, the entire field history and particularly the legacy of previous crops could not be excluded. The observed assemblage of microbial populations could finally be the resultant of crop effect combined with all applied farming practices. It would be now interesting to deeply explore and disentangle the determinism of each of these factors.

5. Conclusion

In this study, a large proportion and a wide diversity of all bacterial isolates showed PSB traits, highlighting their extensive presence in soils. A vast majority belonged to the *Pseudomonas* and *Bacillus* genera, previously well characterized as PSB across numerous studies. A higher proportion of PSB were found in soil from rapeseed, with higher *in vitro* solubilization abilities, suggesting that crops with higher P requirements can modulate and shape their associated microbiome according to their nutrient preference. The rhizosphere of these crops could be considered as a niche of great interest to study the contribution of PSB in P dynamics in soil, but also a reservoir for the screening of high-potential PSB. Interesting linkages were found between PSB/PGPR traits and highlighted two distinct profiles of isolates, deploying either direct or indirect processes in relation to P solubilization and availability. Furthermore, crops seemed to preferentially recruit beneficial microbial partners presenting complementary functional characteristics to sustain P uptake. Future work will focus on *in situ* evaluation of the efficiency of selected PSB on rapeseed growth and P acquisition in controlled conditions. The final ambition will be to determine the potential of these bio-inoculants, composed of soil origin-linked PSB isolates, as a reliable fertilizer alternative for improving nutrient acquisition of crops. Moreover, the results of the present work also indicate the potential of plant-driven selection to attract high-value microbial partners to benefit nutrition of the current crop, but also as a legacy to fortify soil microbiome for subsequent crops in the context of crop rotation.

Declaration of interests:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Author Contributions: Conceptualization, CA, MB, KL; methodology, CA, MB; software, CA; validation, CA ; formal analysis, CA, MB ; investigation, CA, MB ; writing—original draft preparation, CA ; writing—review and editing, CA, MB, JCA; supervision, MB, KL, JCA; project administration, MB, KL, JCA; funding acquisition, KL, JCA. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Normandy region which supported the projects RIN EPURE (Enhancing Plant nutRition and Health), RIN Normandy Plant Technologies and the regional funding of the PhD thesis of Charlotte Amy.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support provided by the Normandy region, the University of Caen-Normandy and the SFR Normandie Végétal (FED4277). The authors want also to acknowledge François d'Hubert and farmers of the "Groupement d'Interêt Economique et Environnemental (GIEE) Pois d'Hiver en Pays de Bray" for their help by giving access to their farm plots, the technical staff of Unilasalle and UMR INRAe/UCN EVA, D^{r} Babacar Thioye for his help in plylogeny and Laurence Cantrill for the English revision.

References

Ali, M.A., Lou, Y., Hafeez, R., Li, X., Hossain, A., Xie, T., Lin, L., Li, B., Yin, Y., Yan, J., An, Q., 2021. Functional Analysis and Genome Mining Reveal High Potential of Biocontrol and Plant Growth Promotion in Nodule-Inhabiting Bacteria Within Paenibacillus polymyxa Complex. Front. Microbiol. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618601

Alishahi, F., Alikhani, H.A., Khoshkholgh-Sima, N.A., Etesami, H., 2020. Mining the roots of various species of the halophyte Suaeda for halotolerant nitrogen-fixing endophytic bacteria with the potential for promoting plant growth. Int. Microbiol. 23, 415–427. https://doi.org/10.1007/s10123-019-00115-y

Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Front. Microbiol. 8, 971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971

Ambreetha, S., Balachandar, D., 2019. Rhizobacteria-Mediated Root Architectural Improvement: A Hidden Potential for Agricultural Sustainability, in: Kumar, A., Meena, V.S. (Eds.), Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability. Springer Singapore, Singapore, pp. 111–128. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_6

Araújo, R.C. de, Rodrigues, F.A., Nadal, M.C., Ribeiro, M. de S., Antônio, C.A.C., Rodrigues, V.A., Souza, A.C. de, Pasqual, M., Dória, J., 2021. Acclimatization of Musa spp. seedlings using endophytic Bacillus spp. and Buttiauxella agrestis strains. Microbiol. Res. 248, 126750. https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126750

Babalola, O.O., Emmanuel, O.C., Adeleke, B.S., Odelade, K.A., Nwachukwu, B.C., Ayiti, O.E., Adegboyega, T.T., Igiehon, N.O., 2021. Rhizosphere Microbiome Cooperations: Strategies for Sustainable Crop Production. Curr. Microbiol. 78, 17. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02375-2

Bakker, A., Schippers, 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and Pseudomonas spp-mediated plant growth-stimulation. Soil Biol. Biochem. 19, 451–457. https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90037-x

Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., de Jonge, R., Berendsen, R.L., 2018. The Soil-Borne Legacy. Cell 172, 1178–1180. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.024

Bolland, M.D.A., Brennan, R.F., 2008. Comparing the phosphorus requirements of wheat, lupin, and canola. Aust. J. Agric. Res. 59, 983. https://doi.org/10.1071/AR07430

Bolland, M.D.A., Siddique, K.H.M., Loss, S.P., Baker, M.J., 1999. Comparing responses of grain legumes, wheat and canola to applications of superphosphate 19.

Bressan, M., Roncato, M.-A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F. el Z., Achouak, W., Berge, O., 2009. Exogenous glucosinolate produced by Arabidopsis thaliana has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. ISME J. 3, 1243–1257. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68

Bünemann, E.K., 2015. Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus – A review. Soil Biol. Biochem. 89, 82–98. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.026

Cai, F., Pang, G., Miao, Y., Li, Ruixia, Li, Rong, Shen, Q., Chen, W., 2017. The nutrient preference of plants influences their rhizosphere microbiome. Appl. Soil Ecol. 110, 146–150. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.006

Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. Plant Soil 383, 3–41. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8

Castrillo, G., Teixeira, P.J.P.L., Paredes, S.H., Law, T.F., de Lorenzo, L., Feltcher, M.E., Finkel, O.M., Breakfield, N.W., Mieczkowski, P., Jones, C.D., Paz-Ares, J., Dangl, J.L., 2017. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. Nature 543, 513–518. https://doi.org/10.1038/nature21417

Chandra, S., Choure, K., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., 2007. Rhizosphere competent Mesorhizobiumloti MP6 induces root hair curling, inhibits Sclerotinia sclerotiorum and enhances growth of Indian mustard (Brassica campestris). Braz. J. Microbiol. 38, 124–130. https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100026

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 42, D633–D642. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244

Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., Smalla, K., 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. Fems Microbiol. Ecol. 56, 236–249. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00026.x

Cui, Y., Fang, L., Guo, X., Wang, X., Zhang, Y., Li, P., Zhang, X., 2018. Ecoenzymatic stoichiometry and microbial nutrient limitation in rhizosphere soil in the arid area of the northern Loess Plateau, China. Soil Biol. Biochem. 116, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.025

Dastogeer, K.M.G., Tumpa, F.H., Sultana, A., Akter, M.A., Chakraborty, A., 2020. Plant microbiome–an account of the factors that shape community composition and diversity. Curr. Plant Biol., Plant Interactions with Microbes and Environment 23, 100161. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100161

Emami, S., Alikhani, H.A., Pourbabaee, A.A., Etesami, H., Motasharezadeh, B., Sarmadian, F., 2020. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. Rhizosphere 14, 100196. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100196

Fitzpatrick, C.R., Copeland, J., Wang, P.W., Guttman, D.S., Kotanen, P.M., Johnson, M.T.J., 2018. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. Proc. Natl. Acad. Sci. 115, E1157–E1165. https://doi.org/10.1073/pnas.1717617115

Ghorbanzadeh, N., Mahsefat, M., Farhangi, M.B., Khalili Rad, M., Proietti, P., 2020. Short-term impacts of pomace application and Pseudomonas bacteria on soil available phosphorus. Biocatal. Agric. Biotechnol. 28, 101742. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101742

Gkarmiri, K., Mahmood, S., Ekblad, A., Alström, S., Högberg, N., Finlay, R., 2017. Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere Soil of Oilseed Rape. Appl. Environ. Microbiol. 83. https://doi.org/10.1128/AEM.01938-17

Glick, B.R., Karaturovíc, D.M., Newell, P.C., 2011. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonads. Can. J. Microbiol. https://doi.org/10.1139/m95-070

Grizzetti, B., Billen, G., Davidson, E.A., Winiwarter, W., de Vries, W., Fowler, D., Howard, C.M., Bleeker, A., Sutton, M.A., Lassaletta, L., Garnier, J., 2020. Global Nitrogen and Phosphorus Pollution, in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Bleeker, A., Hicks, W.K., Masso, C., Raghuram, N., Reis, S., Bekunda, M. (Eds.), Just Enough Nitrogen. Springer International Publishing, Cham, pp. 421–431. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58065-0_28

Helfenstein, J., Tamburini, F., von Sperber, C., Massey, M.S., Pistocchi, C., Chadwick, O.A., Vitousek, P.M., Kretzschmar, R., Frossard, E., 2018. Combining spectroscopic and isotopic techniques gives a dynamic view of phosphorus cycling in soil. Nat. Commun. 9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05731-2

Holford, I.C.R., 1997. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. Soil Res. 35, 227–240. https://doi.org/10.1071/s96047

Honvault, N., Houben, D., Nobile, C., Firmin, S., Lambers, H., Faucon, M.-P., 2020. Tradeoffs among phosphorus-acquisition root traits of crop species for agroecological intensification. Plant Soil 14. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04584-3

Howson, S.J., Davis, R.P., 1983. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. Enzyme Microb. Technol. 5, 377–382. https://doi.org/10.1016/0141-0229(83)90012-1

Ikhajiagbe, B., Anoliefo, G.O., Olise, O.F., Rackelmann, F., Sommer, M., Adekunle, I.J., 2020. Major phosphorus in soils is unavailable, yet critical for plant development. Not. Sci. Biol. 12, 500–535. https://doi.org/10.15835/nsb12310672

Illmer, P., Schinner, F., 1995. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-Solubilization Mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27, 257–263. https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., Kopriva, S., 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. Front. Plant Sci. 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617

Kjeldahl, J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Z. Für Anal. Chem. 22, 366–382. https://doi.org/10.1007/BF01338151

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004. How Do Crop Plants Tolerate Acid Soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. Annu. Rev. Plant Biol. 55, 459–493. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655

Kumar, A., Kumar, Amit, Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S., 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. Recent Res. Sci. Technol. 5.

Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., 2012. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. Microbiol. Res. 167, 493–499. https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002

Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth, A.L., Janine Sherrier, D., Bais, H.P., 2015. A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (Oryza sativa L.). Planta 242, 1037–1050. https://doi.org/10.1007/s00425-015-2340-2

Li, H., Ding, X., Chen, C., Zheng, X., Han, H., Li, C., Gong, J., Xu, T., Li, Q.X., Ding, G., Li, J., 2019. Enrichment of phosphate solubilizing bacteria during late developmental stages of eggplant (*Solanum melongena* L.). FEMS Microbiol. Ecol. 95. https://doi.org/10.1093/femsec/fiz023

Manzoni, S., Čapek, P., Mooshammer, M., Lindahl, B.D., Richter, A., Šantrůčková, H., 2017. Optimal metabolic regulation along resource stoichiometry gradients. Ecol. Lett. 20, 1182–1191. https://doi.org/10.1111/ele.12815

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64, 795–799. https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998

Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, T.S., Blackwell, M., Stutter, M., Shand, C., Lumsdon, D., Cooper, P., Wendler, R., Brown, L., Almeida, D.S., Wearing, C., Zhang, H., Haygarth, P.M., 2017. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. Plant Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3362-2

Mitra, D., Vasi, T., Mahakur, B., Radha, T.K., 2020. Phosphate-Solubilizing Microbes and Biocontrol Agent for Plant Nutrition and Protection: Current Perspective. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 14. https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1729379

Moussa, L., Zawam, H., 2010. Efficacy of some Biocontrol Agents on Reproduction and Development of Meloidogyne incognita Infecting Tomato. J. Am. Sci. 16.

Muyzer, G., Waal, E.C. de, Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170, 265–270.

Olanrewaju, O.S., Ayangbenro, A.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2019. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 103, 1155–1166. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9556-6

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., Cheng, Y., 2021. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. Front. Plant Sci. 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nat. Rev. Microbiol. 11, 789–799. https://doi.org/10.1038/nrmicro3109

Pikovskaya, R., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologia 362–370.

Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil 321, 305–339. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2

Rijavec, T., Lapanje, A., 2016. Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785

Roberts, T.L., Johnston, A.E., 2015. Phosphorus use efficiency and management in agriculture. Resour. Conserv. Recycl., Losses and Efficiencies in Phosphorus Management 105, 275–281. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.09.013

Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319–339. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2

Rumberger, A., Marschner, P., 2003. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. Soil Biol. Biochem. 35, 445–452. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00296-1

Safari, M., Motamedi, E., Kari Dolatabad, H., Modarres Sanavy, S.A.M., 2020. Nano-carriers effects on the viability and efficiency of Pseudomonas strains as phosphate solubilizing bacteria. Heliyon 6, e05076. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05076

Saxena, A.K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., Bagyaraj, D.J., 2020. Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. J. Appl. Microbiol. 128, 1583–1594. https://doi.org/10.1111/jam.14506

Steen, A.D., Crits-Christoph, A., Carini, P., DeAngelis, K.M., Fierer, N., Lloyd, K.G., Cameron Thrash, J., 2019. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. ISME J. 13, 3126–3130. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0484-y

Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B.M., Mirza, M.S., 2018. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. PLOS ONE 13, e0204408. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204408

Syers, J.K., Johnston, A.E., Curtin, D., 2009. Efficiency of Soil and Fertilizer Phosphorus Use: Reconciling Changing Concepts of Soil Phosphorus Behaviour with Agronomic Information. Exp. Agric. 45, 128. https://doi.org/10.1017/S0014479708007138

Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., Liu, X., 2021. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. Biology 10, 158. https://doi.org/10.3390/biology10020158

Vance, C.P., 2001. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiol. 127, 390–397.

Xiao, C., Zhou, Y., Hu, J., Guo, S., Zhou, N., Chi, R., 2020. Biosolubilization of Low-Grade Rock Phosphate by Native Microbial Consortia from Phosphate Mines: Effect of Sampling Sources and Culture Media. Geomicrobiol. J. 37, 859–866. https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1793033

Supplemental data :

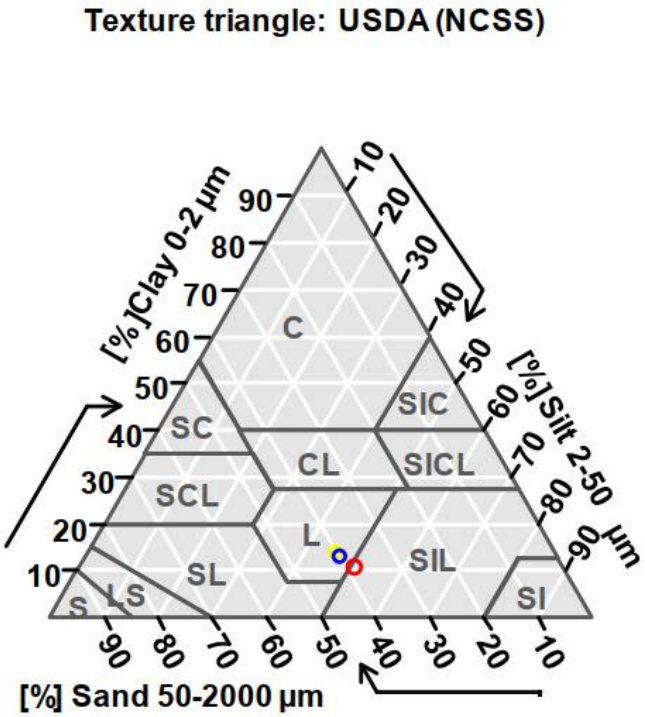


Figure S1: Positions of studied soils on USDA soils textures triangles. Yellow circle indicates rapeseed crop soil, blue circle indicates winter pea crop soil and red circle indicates faba bean crop soil.

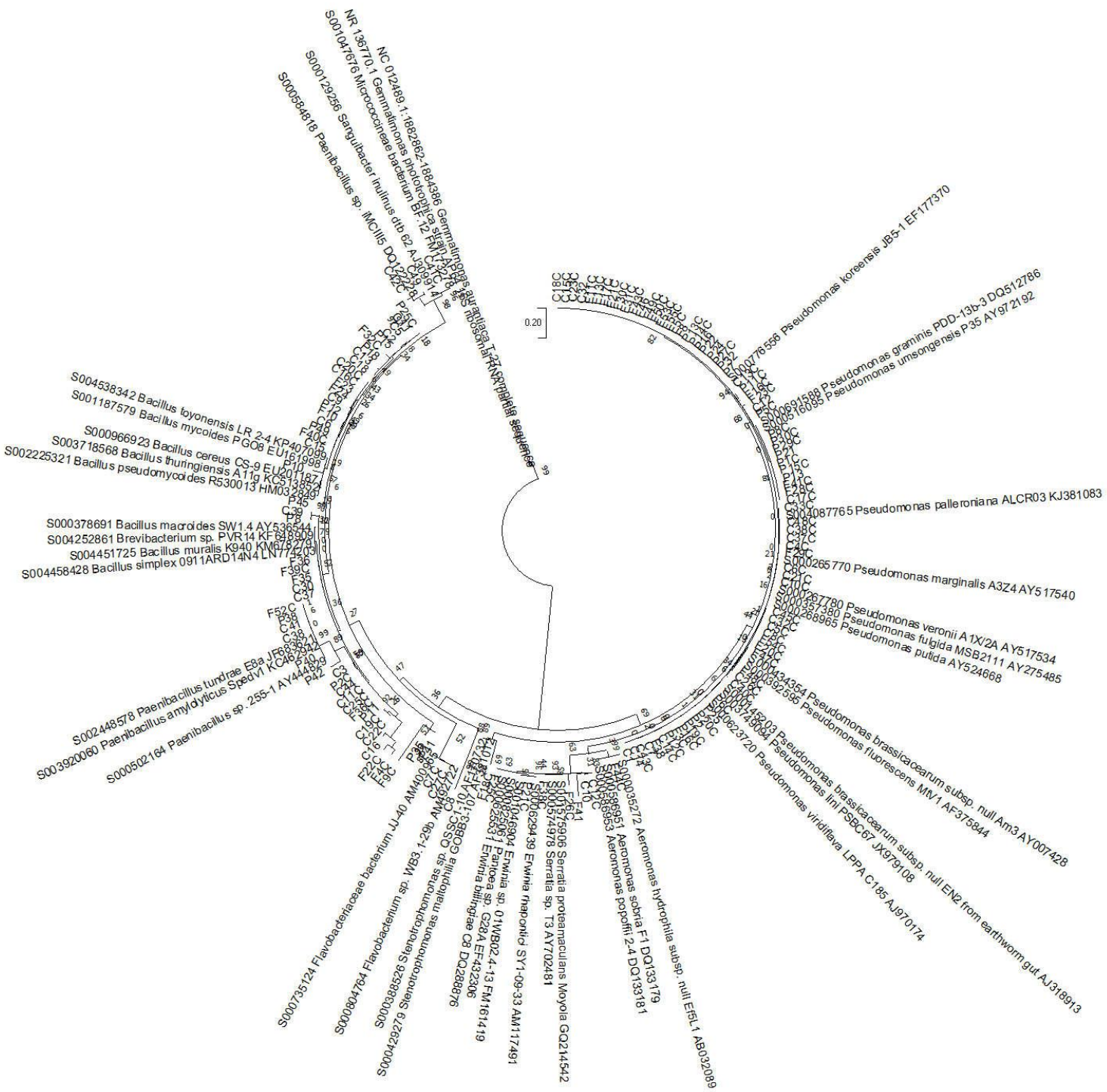


Figure S2: Phylogenetic analysis of isolated PSM strains. Strains are named according to their native soil (C for rapeseed, P for winter pea and F for Faba bean).

C. Evaluer le potentiel de réintroduction dans l'environnement rhizosphérique du colza de trois souches PSB, et l'efficience in planta de leur traits PSB et PGPR.

C-1 Etude de l'effet de trois souches PSB provenant de sols prélevés sous trois couverts de grandes cultures différents, inoculées sur les plantules de colza et soumises à un gradient de fertilisation P

Hypothèses :

-Le colza étant le plus susceptible de recruter des souches PSB correspondant à ses exigences, une souche isolée sous colza est un meilleur candidat pour un usage en tant que biointrant sur la même espèce végétale.

- La mise en œuvre d'une solution de type biointrants à base d'un organisme PSB est une alternative prometteuse pour soutenir la croissance des plantes tout en réduisant les besoins de fertilisation minérale.

Objectifs : L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité en tant que biointrants des souches présentant le meilleur potentiel PSB et PGPR *in vitro* sur la croissance de jeunes plantules de colza. Les souches testées présentant des caractéristiques différentes, un second objectif est de déterminer s'il existe un profil PSB assurant son succès lors de sa réintroduction dans un sol avec une communauté microbienne autochtone. Enfin, il s'agit d'identifier *in situ* les processus biologiques pouvant expliquer l'amélioration observée de la croissance du colza et / ou de son statut nutritionnel.

Méthodologie : Une expérimentation en serre a été menée sur les deux premiers mois de croissance des plantules de colza sur un sol pauvre en P. Trois souches PSB appartenant au genre *Pseudomonas*, mises en évidence précédemment (une par couvert étudié : colza, pois d'hiver et féverole) et présentant les profils les plus prometteurs ont été inoculées après l'émergence des premières feuilles. Quatre niveaux de fertilisation P ont été apportés (P100 correspondant aux recommandations de fertilisation, P50 et P25 correspondant respectivement à 50 et 25 % de P100 et enfin P0 correspondant à une absence de fertilisation minérale en P). Les caractéristiques morphométriques et les statuts en N et P des plantes ont été évalués, ainsi que les caractéristiques chimiques des sols après récolte. Les activités enzymatiques liées aux cycles N et P ont été mesurées pour chacune des modalités. Enfin, pour la souche ayant montré les résultats les plus prometteurs sur la biomasse et l'acquisition de N et P par le colza, l'analyse métagénomique des communautés microbiennes des sols a été réalisée pour chaque niveau de fertilisation

Résultats principaux : La souche F23 originaire du sol prélevé sous la culture de féverole a montré des capacités de promotion de la croissance des plantules de colza, permettant une diminution de la fertilisation P de 50%. Dans ces conditions, une augmentation de la biomasse racinaire ainsi que de la quantité de N et P ont été observées. Egalement, une augmentation de l'activité phosphatase alcaline a été montrée dans les sols, ainsi que des modifications dans la structure des communautés associées à l'environnement racinaire du colza.

Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'article soumis au journal Rhizosphere le 18 octobre 2021 sous le titre *« Are native soil-borne Phosphate-Solubilizing Bacteria a relevant alternative to classical mineral fertilization in order to sustain plant growth ? Part II : Impact of three PSB strains on rapeseed subjected to a gradient of phosphate fertilization."*. Ces travaux sont également proposés pour une communication affichée au cinquième congrès international Biostimulants qui se tient en décembre 2021.

Number of tables: 2

Number of Figures: 8

Title: Are native soil-borne phosphate-solubilizing bacteria a relevant alternative to sustain plant growth? Part II: Impact of three PSB strains on rapeseed subjected to a gradient of phosphate fertilization.

Charlotte Amy [ab], Karine Laval [b], Jean-Christophe Avice [a], 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

*** Corresponding author:** Email address: melanie.bressan@unilasalle.fr

Abstract: Rapeseed (*Brassica napus*) is a major oleoproteaginous crop, characterized by its high requirement of phosphate (P) leading generally to the application of a high amount of P fertilizers. Such inputs are known to cause environmental damages. Use of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) represents an interesting alternative, but their effective mechanisms and relationships with plants and/or autochthonous microorganisms still need to be unravelled. In this study, three PSB strains belonging to the *Pseudomonas* genus, isolated from soil harvested under rapeseed (C12), winter pea (*Pisum sativum*, P2), and faba bean (*Vicia faba*, F23), were tested on rapeseed growth. This test was performed under controlled conditions during the vegetative stage of rapeseed in combination with a gradient of P fertilization (P100, P50, P25 and P0 corresponding to 125, 62.5, 31.5 and 0 mg P_2O_5, respectively), P50. Efficient plant growth promotion was expected for treatment with C12, originating from the rapeseed rhizosphere. Finally, more contrasted results were observed for the three tested strains. PSB from rapeseed showed no effect on plant biomass or P status. P2 and F23 increased the biomass and P amount in roots when P fertilization was decreased from 50%, but winter pea PSM dramatically decreased plant biomass below this P input threshold. For P50 fertilization with P2 and F23 strains, an increase in alkaline phosphatase activity was observed in the rhizosphere. The structure and diversity of the soil microbial community was then assessed to explore some of the indirect effects of F23 application. Some bacterial genera known as potentially involved in biocontrol were decreased (*Sphingomonas,* Acidobacteria Gp6, *Lysobacter, Thermomonas*, and a genus belonging to the *Spartobacteria* class), whereas other genera involved in the nitrogen and sulphur cycles were increased (*Ramlibacter, Nocardioides, Inhella, Bradyrhizobium*, and *Thiobacillus*), possibly sustaining plant access to essential nutrients.

Keywords: Rapeseed, phosphate, phosphate-solubilizing bacteria, plant growth-promoting rhizobacteria, crop requirements, microbial community structure, phosphatase

1. Introduction

Phosphorus (P) is a central element in the metabolism of overall living organisms (Sterner et al., 2003), although it is scarce in the environment in an available form for primary producers (Vance, 2001). To compensate for this scarcity, farmers used to apply P fertilizers, often in mineral form directly available for plants. Unfortunately, phosphate is nevertheless quickly complexed into unavailable forms when applied to soil (Helfenstein et al., 2018). Not only does this amount of P remain unavailable, but it also increases the unmobilized P reservoir, leading to the application of more P fertilizers by farmers, and thus to environmental issues (Grizzetti et al., 2020).

Plants have developed strategies to cope with P scarcity through several dedicated mechanisms (Dissanayaka et al., 2021), including root trait modifications and release of organic acids and phosphatases (Honvault et al., 2020), but also through the recruitment of beneficial microorganisms (Isidra-Arellano et al., 2021). Some of them are known as phosphate-solubilizing bacteria (PSB) because of their ability to decomplex phosphate from calcium, iron or aluminium P particles (Alori et al., 2017). Moreover, the mineralization potential of organic P sources allows plants to access new soil P pools through phosphatase and/or phytase activities (Menezes-Blackburn et al., 2017). These PSB strains often show other plant growth promoting traits leading to stimulate the root growth and allowing the exploration of wider soil volume to seek more P (Ambreetha and Balachandar, 2019).

Rapeseed (*Brassica napus*) is a major oleoproteaginous crop, widespread around global temperate regions and characterized by high P requirements (Rashid and Bughio, 1993). Reducing P fertilizer input and improving the environmental balance of such a crop by using the benefit of PSB could be a promising alternative to the massive use of mineral intrants.

The aim of this study was (1) to assess *in planta* the PSB potential of three strains previously screened from soils collected under rapeseed, winter pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) crops, (2) to determine the existence of optimal PSB-fitness profile and (3) to identify biological processes potentially related to the growth enhancement and/or P status in rapeseed subjected to a gradient of phosphate fertilization.

2. Materials and methods

2.1 PSB screening

A PSB screening has been previously performed from soils taken on plots presenting three different cultures: rapeseed (*Brassica napus*), winter pea (*Pisum sativum*) and Faba bean (*Vicia faba*). Briefly, soil suspensions were made by mixing 5 g of fresh soil to 45 mL NaCl 0.09%. Serial dilutions of these suspensions were then plated on Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) and NBRIP (Nautiyal, 1999) media. Several Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) traits were assessed on each isolated bacterial strain. Siderophore production was evaluated on a Chrome-Azurol-S (CAS) medium as described by Lakshmanan et al. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA, auxin) production, ACC deaminase activity and hydrogen cyanide (HCN) production were measured as described by (Kumar et al., 2012). Ability to solubilize phytate were also tested on a phytate screening medium as described by Howson and Davis (1983). Molecular identification was performed by the Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France) of a 16S amplicon obtained from PCR amplification using 63f (50-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-30) (Marchesi et al., 1998) and BU16S4 (5-CTGCTGCCTCCCGTAGG-30) derived from 341F. Briefly, 2 µL of bacterial culture, 1 X of GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) and 1µM of each primer were mixed in a final volume of 50 µL. PCR reaction was performed in a GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, USA). The amplification program was 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C.

A final extension step was performed for 7 min at 72°C. PCR product quality was verified by electrophoresis on agarose gels stained with ethidium bromide. Obtained sequences were finally aligned using the sequence match tool from the Ribosome Database Project (RDP; Cole et al., 2014).

2.2 Description, culture and inoculum preparation of PSB strains

The three tested PSB strains were chosen according to their solubilization abilities and provenance. The five most efficient solubilizers on Pikovskaya or NBRIP media for each native soil were first selected. The quantitative P solubilization of these 15 strains were monitored during 5 days as described by Kumar et al., 2012. Medium pH was also measured in parallel. Finally, one PSB for each soil origin was selected according to their potential of quantitative P solubilization and auxin production abilities. Potential metabolic phenotypes of PSB regarding diverse carbon sources were assessed using the Biolog GEN III system (BIOLOG, Inc, Hayward, CA, USA) according to the manufacturer's procedure.

For application on plants, PSB strains were cultured for 24 h at 30°C in Luria broth. The optical density at 580 nm was measured to evaluate the UFC quantity per mL. Cultures were then centrifuged and resuspended in NaCl 0.9% to inoculate 1 x 10^6 UFC in 1 mL directly near plants collar.

2.3 Greenhouse experiment

Soil was collected from a cropped field in the Pays de Bray in Normandy, France (49°46'24.197"N, 1°31'45.569"E). The physico-chemical characterization of the soil was previously determined to target a specifically phosphorus-deprived soil. The chosen soil was superficial clay-limestone (USDA) with a water pH of 8.3, deprived of available phosphorus (Olsen P_2O_5, 26 ppm) and with a nitrogen content of 1.66 g kg^{-1} dry soil. Soil was sieved then at 2 mm prior to be used in a pot experiment. Rapeseed (*Brassica* napus, cv. Aviso) seeds were surface sterilized and directly sown in 10 L pots containing 4 kg of soil at 70% of its water

retention capacity. All plants received 125 mg N (ammonium nitrate 33.5%) and 63 mg KCl, according to French fertilization recommendation from COMIFER (COMIFER, 1995) and the requirements of the planned crop. Four levels of P fertilization were then studied: P100, P50, P25 and P0 corresponding to 125, 62.5, 31.5 and 0 mg P_2O_5, respectively. The highest level of phosphate fertilization (P100) also corresponds to fertilization recommendations, i.e. 125 mg P_2O_5 brought as a superphosphate (TSP 45%). P50, P25 and P0 modalities were separately inoculated with the PSB strains C12, F23 and P2 or without PSB inoculant at sowing and 15 days after plants emergence. Culture conditions were 16 h days at 20°C and 8 h nights at 12°C with 80% relative humidity. Water irrigation was 30 mL per day, manually completed by weighing, if necessary, to maintain 70% of water retention capacity. A final harvest was done after 10 weeks of culture. Shoots and roots were separated, dried at 70°C and grounded after weighing. Soil neighbouring roots were collected at an extended rhizospheric area. This soil was sieved at 5 mm and then either stored at −80°C or air-dried, for further analyses.

2.4 Elemental analyses of plant tissues

Phosphorus content in shoots and roots was directly measured after fine grinding by X-ray fluorescence (XRF, S1 Titan, Bruker, Billerica, MA, USA). Carbon and nitrogen content were assessed by elemental spectroscopy (Flash*Smart* CHN, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) after the weighing of grinded plant tissue into tin capsules.

2.5 Physico-chemical soil properties assays

Physico-chemical properties of soil samples were assayed by standard methods. Water-pH was determined using the NF ISO 10390 method; soil total and organic carbon were assayed using a total organic carbon (TOC) analyser (Shimadzu SSM-5000A/TOC-VCSH Carbon, Shimadzu, Kyoto, Japan). Soil total nitrogen was determined by the Kjeldahl method (Kjeldahl, 1883). Active calcium carbonate content was assayed following the method described in standard NF-X31-106 (2002). Available P was determined using the Olsen method (NF ISO 11263).

2.6 Enzymatic activities assays

Urease, arylamidase, total phosphatase, acid phosphatase and alkaline phosphatase were assayed in microplates using standard ISO 20130:2018. Briefly, 4 g of soil are weighed and mixed with 25 mL deionized water. Corresponding substrates are added (urea, L-Leucine β-naphthylamide hydrochloride and p-nitro-phenylphosphate disodium salt hexahydrate), except in control wells. Plates are incubated at 37°C for 2 h for arylamidase, 30 min for phosphatases and 25°C during 3 h for urease. Reactions are stopped with the adjunction of ethanol (96%) for urease, 25% ethanol in Trizma (0.1M) pH 12 for phosphatases and a mix of salicylate and cyanurate for urease. Substrate is then added in control wells. Plates are then centrifuged 5 min at 1500 g. Supernatant is transferred to a new plate and read by photometric measurement (λ = 650 nm for urease, λ = 540 nm for arylamidase and λ= 405 nm for phosphatases).

2.7 DNA extraction and quantification

Total DNA was extracted from soil samples using the FastDNA SPIN Kit for soil (MP-Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) and following the manufacturers' recommendations. Soil DNA concentrations were assayed by fluorimetry using the Fluorescent DNA Quantitation Kit Hoechst 33258 (Biorad, Hercules, CA, USA) and following the manufacturer's recommendations. DNA samples were then stored at −20°C until further analyses.

2.8 Illumina MiSeq sequencing and amplicon-metagenomics data processing:

Bacterial community structure was assessed by the sequencing of the V3 and V4 regions of the 16S rRNA gene, whereas fungal community structure was assessed by the sequencing of the internal transcribed spacer (ITS 2) region of the 18S rRNA gene. Two-step Nextera PCR libraries using the primer pair 341F (5′- CCT ACG GGN GGC WGC AG-3′) and 805R (5′- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC -3′) and the primer pair gITS7 (5′- GTG AAT CAT CGA RTC TTT G-3′) and ITS4 (5′- TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) were created for the bacterial and fungal communities, respectively.

Subsequently, an Illumina MiSeq platform and a v3-600 cycles kit were used to sequence the PCR libraries (Biofidal, Vaulx-en-Velin, France). The produced paired-end reads that passed Illumina's chastity filter were subjected to the de-multiplexing and trimming of Illumina adaptor residuals using Illumina's bcl2fastq software version v2.20.0.422. The quality of the reads was checked with the software FastQC version 0.11.8, and sequencing reads that fell below an average Q-score of 20 or had any uncalled bases (N) were removed from further analysis. The locus-specific V34 primers and ITS2 primers were trimmed from the sequencing reads with the software Cutadapt v3.2. Paired-end reads were discarded if the primer could not be trimmed. Trimmed forward and reverse reads of each paired-end read were merged to *in-silico* reform the sequenced molecule considering a minimum overlap of 15 bases using the software USEARCH version 11.0.667. Merged sequences were again quality filtered, allowing a maximum of one expected error per merged read and discarding those containing ambiguous bases. From the remaining reads, the fungal ITS2 sub regions were extracted with help of the ITSx software suite v1.1.3 and its included database. Reads that contain ambiguous bases or that were outliers regarding the amplicon size distribution were also discarded. Samples that resulted in less than 5,000 merged reads were discarded to not distort the statistical analysis. The remaining reads were denoised using the UNOISE algorithm implemented in USEARCH to form operational taxonomic units (OTUs) discarding singletons and chimeras in the process. The resulting OTU abundance table was then filtered for possible barcode bleed-in contaminations using the UNCROSS algorithm. OTU sequences were compared to the reference sequences of the RDP 16S, and the UNITE database and taxonomies were predicted considering a minimum confidence threshold of 0.5 using the SINTAX algorithm implemented in USEARCH. The computational data analysis described in this section was performed by Microsynth AG (Balgach, Switzerland).

Table 1 : *In vitro* characterization of PGPR traits for the 3 tested PSB isolates: P solubilization and pH on Pikovskaya and NBRIP media; production of gluconic acid on both media; phytate solubilization; siderophores, HCN (Hydrogen cyanide), IAA (indole-3-acetic acid) productions; and ACC deaminase activity. Results are expressed as the mean value ± standard deviation, or presence (+) / absence (-) of production. SI : Solubilization Index

	Pikovskaya medium				NBRIP								
Strain designation	SI	solubilized P (µg/mL)	medium pH	Gluconic acid production (µmol/mL)	SI	solubilized P (µg/mL)	medium pH	Gluconic acid production (µmol/mL)	Phytates SI	Siderophore production	HCN production	IAA production (ng/µL)	ACC deamin activity
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	-

2.9 Statistical analyses

All data were analysed using Rx64 software (4.0.2 version). One-way analysis of variance (ANOVA) of the 'multcomp' package was performed for every assay to compare all modalities for each measured variable, followed by a post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package 'agricolae'. Two-way ANOVA was performed to assess the effects of the PSB application, P fertilization level and interaction of PSB and P fertilization using the aov function of the 'multcomp' package. Significant difference was considered for p value < 0.05. Principal component analysis (PCA) was performed to compare physico-chemical properties of soils, plant profiles and analysis of bacterial and fungal community structures according to the applied fertilization and PSB application, using the package 'Factoshiny'. Biodiversity indexes were calculated from OTU matrices using the diversity function of the 'Vegan' package. Heatmaps for bacterial and fungal phyla and classes were performed using the heatmap function. A Bray–Curtis dissimilarity matrix was calculated using the function vegdist of the 'Vegan' package.

3. Results

3.1 Characterization of the 3 tested bacterial isolates

Among PSB isolated from soils collected in the vicinity of rapeseed, faba bean and winter pea, the three selected strains (C12, F23 and P2, respectively), belong to the *Pseudomonas* genus. They showed solubilization abilities on both the Pikovskaya and NBRIP media (Table 1). Solubilized P on the Pikovskaya medium was comprised between 152.1 and 207.3 µg mL^{-1}, combined with a pH decrease for the C12 and P2 strains. On the NBRIP medium, solubilized P was comprised between 49.3 and 104.5 µg mL^{-1}, and all strains showed a pH decrease (Table 1). Both F23 and P2 produced gluconic acid in the two media, whereas C12 did not show gluconic acid production on the Pikovskaya medium (Table 1).

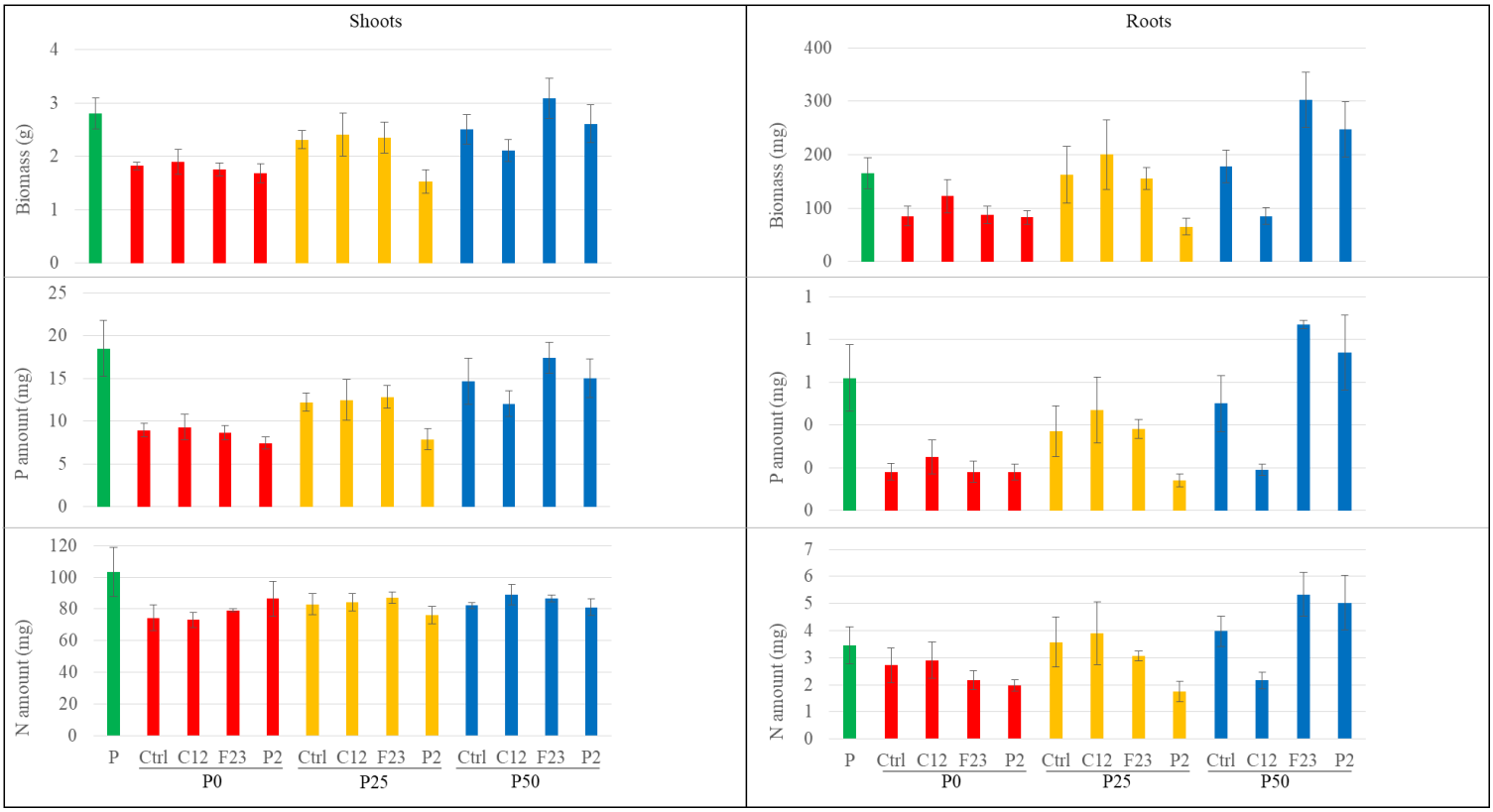


Figure 1 : Dry biomasses (g), P and N amounts (mg) in shoots and roots of rapeseed plants receiving a total P fertilization (green), zero fertilization (P0, red), a quarter fertilization (P25, orange) or a half fertilization (P50, blue). P was assessed by XRF and N was assessed by CHN (n=4).

By contrast, the maximal gluconic acid amount in NBRIP medium was observed for C12 (17.2 µmol mL^{-1}) compared to F23 and P2 (8.3 and 5.4 µmol mL^{-1}, respectively). The three strains were able to solubilize phytate on the PSM medium and produced siderophores and IAA (Table 1). P2 produced a significantly higher amount of IAA compared to F23 and P2. Meanwhile, only C12 showed an ability to synthetize HCN. Both F23 and C12 showed an ACC deaminase activity, but P2 strain did not (Table 1).

Potential metabolic profiles of these strains regarding the degradation of C sources were determined using the Biolog GENIII system (Figure S1). The F23 strain showed a wider metabolic profile because 41 wells showed a significant bacterial growth, whereas C12 and P2 had 20 positive wells. The three strains degraded different carbohydrate types. F23 showed high capacities in degrading carboxylic acids and amino acids.

3.2 Effects of P fertilization and PSB adjunction on growth and P and N status of shoots

The level of P fertilization had a highly significant effect on shoot dry biomasses (Table S2, Figure 1). As expected, plants receiving total P fertilization (P100) presented the highest shoot dry biomass (2.80 g per plant), whereas plants without P fertilization (P0) had significantly lower shoot dry biomass (Table S2, Figure 1). Considering P25 fertilization, shoot dry biomasses tended to be intermediate with no significant differences compared to P100 or P0 fertilization. Surprisingly, the application of strain P2 in combination with P25 fertilization led to a strong decrease in shoot biomass (1.53 g on average for P2 and 2.31 g for control; Table S2). For P50 fertilization, shoot dry biomasses fluctuated between 2.11 g (C12) and 3.08 g (F23) and were not significantly different from P100 fertilization (Table S2). However, under P50 fertilization, the addition of the isolate F23 led to the significant increase of the dry biomass of shoots (3.08 g on average) compared to C12. The P fertilization level and PSB application also had a highly significant effect on P status in shoots (Table S2).

As expected, the P amount globally increased with P fertilization rates in the absence of PSB (P0: 8.95 mg, P25: 12.23 mg, P50: 14.67 mg, P100: 18.52 mg).Interestingly, the combination of P50 fertilization with the application of F23 or P2 strains allowed to reach values of P close to that of P100. On the contrary, a dramatic decrease was observed for P25 fertilization with the inoculation of P2 strain (7.89 mg). No significant difference in the N content of shoots was observed whatever the level of P fertilization and the addition of PSB (Table S2, Figure 1).

3.3 Effects of P fertilization and PSB adjunction on the growth and P and N status of roots

The level of P fertilization alone, but also in interaction with PSB application, significantly affected root growth (Table S1). Root dry biomass was significantly more important after the application of F23 combined with P50 (302.5 mg on average) compared to all other treatments. Interestingly, it was especially so when compared to P100 (165 mg on average; Table S3, Figure 1). Similarly, after P2 application combined with P50, root dry biomass (247.50 mg) tended to be higher than that for P100 (Table S3, Figure 1).

Variations of P amount in roots were mainly explained by P fertilization and also by the interaction between P fertilization and PSB application (Table S1). As expected, and already observed in shoot, the P amount globally increased with P fertilization rates in absence of PSB (P0: 0.18 mg, P25: 0.37 mg, P50: 0.50 mg, P100: 0.62 mg; Table S3, Figure 1). PSB application with P25 fertilization did not affect the root P amount, except for P2, which tends to decrease the P amount (0.14 mg) compared with P25 control (0.37 mg). Interestingly, as observed in shoots, only the combination of P50 fertilization with F23 or P2 application allowed to reach similar values to P100 fertilization (Table S3, Figure 1). Contrary to shoots, P fertilization alone or in interaction with PSB application significantly impacted the N status of roots (Table S3, Figure 1). P2 application tended to decrease the N amount in roots for P100 treatment (1.75 mg).

Table 2 : Physico-chemical properties of sampled soils expressed as mean ± standard deviation. P fertilization (P100), zero fertilization (P0), half fertilization (P50) with or without PSM application, C12, F23 or P2. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package “agricolae” (p-value < 0.05).

		pH		Total C (‰)		Organic C (‰)		Total N (ppm)		$[P_2O_5]_{Olsen}$ (ppm)		$CaCO_3$ (%)	
P100	Ctrl	8.39 ± 0.04	*abc*	86.10 ± 0.29	*a*	20.78 ± 1.47	*a*	1459.30 ± 150.02	*bce*	27.60 ± 0.77	*cde*	63.28 ± 1.93	*abc*
P0	Ctrl	8.33 ± 0.05	*e*	86.00 ± 0.43	*a*	19.58 ± 0.67	*a*	1193.15 ± 339.43	*a*	25.15 ± 2.70	*efg*	62.78 ± 0.75	*abc*
	C12	8.33 ± 0.01	*cde*	86.08 ± 0.96	*a*	20.27 ± 1.59	*a*	1587.99 ± 68.28	*ac*	30.78 ± 2.32	*b*	63.35 ± 0.38	*abc*
	F23	8.36 ± 0.01	*bcde*	85.07 ± 0.55	*a*	19.75 ± 1.70	*a*	1565.87 ± 134.79	*ab*	26.43 ± 1.39	*ef*	62.22 ± 1.51	*bc*
	P2	8.38 ± 0.01	*abc*	85.49 ± 0.92	*a*	20.48 ± 1.07	*a*	1372.58 ± 122.60	*ace*	35.23 ± 3.23	*ab*	61.10 ± 3.26	*c*
P25	Ctrl	8.41 ± 0.03	*a*	86.29 ± 1.01	*a*	20.18 ± 0.98	*a*	1273.55 ± 137.12	*ace*	22.10 ± 0.55	*h*	61.41 ± 3.53	*c*
	C12	8.34 ± 0.01	*cde*	86.22 ± 0.45	*a*	20.81 ± 1.24	*a*	1803.94 ± 121.10	*ace*	24.80 ± 1.44	*fg*	63.38 ± 0.63	*abc*
	F23	8.39 ± 0.02	*ab*	86.16 ± 0.52	*a*	20.17 ± 0.53	*a*	1853.80 ± 142.53	*acd*	23.33 ± 0.72	*gh*	62.59 ± 1.11	*abc*
	P2	8.40 ± 0.03	*ab*	85.14 ± 1.11	*a*	19.43 ± 1.11	*a*	1705.50 ± 67.55	*ace*	29.67 ± 1.11	*bcd*	64.42 ± 0.52	*ab*
P50	Ctrl	8.39 ± 0.02	*abc*	85.12 ± 0.98	*a*	19.40 ± 1.58	*a*	1315.66 ± 226.62	*ace*	27.19 ± 0.95	*def*	61.33 ± 1.67	*c*
	C12	8.38 ± 0.02	*abcd*	85.70 ± 0.70	*a*	19.91 ± 1.10	*a*	1459.30 ± 150.02	*ce*	29.77 ± 2.39	*bc*	64.59 ± 0.61	*ab*
	F23	8.37 ± 0.04	*abcde*	86.43 ± 0.87	*a*	20.50 ± 1.08	*a*	1568.99 ± 40.50	*de*	25.91 ± 1.67	*ef*	64.92 ± 0.90	*a*
	P2	8.33 ± 0.06	*de*	85.65 ± 0.47	*a*	19.78 ± 1.35	*a*	1756.63 ± 46.28	*e*	26.00 ± 0.39	*ef*	64.11 ± 1.32	*ab*

Interestingly, for P100 fertilization, the N amount in roots tended to increase with the application of the F23 or P2 strains (5.33 mg and 5.03 mg, respectively) when compared to all other modalities, such as P100 (3.98 mg, Table S3).

Taken together, data of the morphometric and elemental contents for P50 treatments (without PSB and with C12, F23 or P2), P0 (without PSB) and P100 control were gathered to determine a global profile of plants (Figure S2). PCA showed similar profiles for plants with P50 supplemented with the F23 and P2 strains and closed to P100. Moreover, these profiles were distinct from the global profile obtained by P50 supplement with C12 application or no P fertilization (P0).

3.4 Evaluation of soil physico-chemical properties after 10 weeks of culture

Soil physico-chemical properties, summarized in Table 2, were measured when plants were harvested, i.e. after 10 weeks of culture. Soil pH was significantly, even though only sparsely, affected by the level of P fertilization alone or combined with PSB application. P0 treatment without PSB had a significantly lower pH (8.33) when compared to all other controls (P25: pH around 8.4 for P25, P50 or P100). The pH also slightly decreased with C12 application for P25 treatment (8.34) and P2 application for P50 fertilization (8.33; Table 2).

Total carbon (TC) and total organic carbon (TOC) were affected neither by P fertilization nor by PSB application. No significant differences were found among all modalities (Table 2). TC represented 85.80 g kg^{-1} of dry soil and a TOC of 20.08 g kg^{-1}.

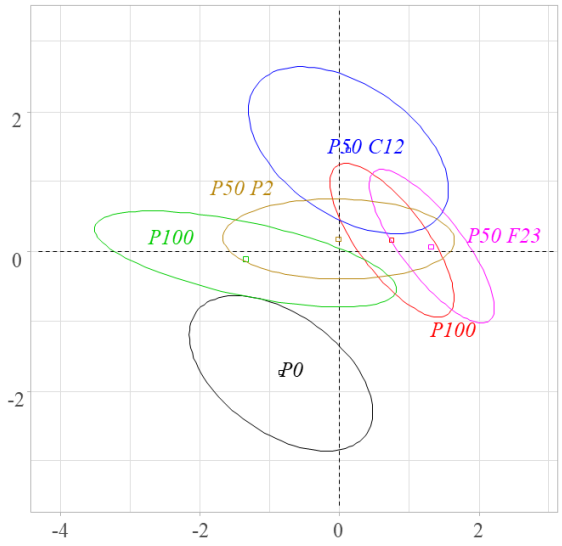
By contrast, the level of P fertilization strongly influenced soil total N content (Table 2). P100 fertilization led to higher soil total N (1705.25 ppm) compared to P0, P25 and P50 controls without PSB (with ascending values: 1193.15; 1273.55 and 1315.66 ppm, respectively). Interestingly, the adjunction of PSB, whatever the level of P fertilization, tended to increase the total N content of the soil in comparison to their respective control (Table 2).

Regarding the measure of Olsen P, both P fertilization and PSB application, considered alone or in interaction, strongly influenced available P in soils (Table S1). P25 control showed lower values (22.10 ppm) compared to other controls for all levels of P fertilization (P0: 25.15 ppm, P50: 27.19 ppm, P100: 27.60 ppm; Table 2). C12 application significantly increased Olsen P for all P fertilization levels (P0+C12: 30.78 ppm, P25+C12: 24.80 ppm, P50+C12: 29.77 ppm), compared to their corresponding control, and even to P100. Similarly, P2 application increased Olsen P in soil when combined to P0 and P25 treatments (32.23 ppm and 29.67 ppm, respectively).

No clear global influence of the level of P fertilization or PSB application on the content of soil calcium carbonate could be highlighted (Table S1). Some tenuous difference could be mentioned. For P25 treatment, application of P2 strain significantly increased calcium carbonate content (64.42%) compared to P25 control (61.41%). Similarly, for P50 treatments, each applied strain significantly increased calcium carbonate values compared to the corresponding control (P50: 61.33% for P50 versus more than 64% for P50+C12, P50+F23 and P50+P2). However, no difference of calcium carbonate content in soil was observed for all tested modalities compared to P100 fertilization.

PCA of soil physico-chemical properties for P50 treatments and P0 and P100 controls showed a slight separation of the global soil pattern for these 3 levels of P fertilizations, in absence of PSB, mainly explained by higher N, calcium carbonate and pH values (Figure 2). P100 and P50 controls also showed higher Olsen P values compared to P0 control. When focused on P50 modalities, soil physico-chemical properties after the application of C12 or F23 strains were clearly separated from the corresponding control, explained by higher N, $CaCO_3$ and pH values. Soil physico-chemical properties of P50+F23 appeared to be highly similar to those from P100 fertilization.

A)



B)

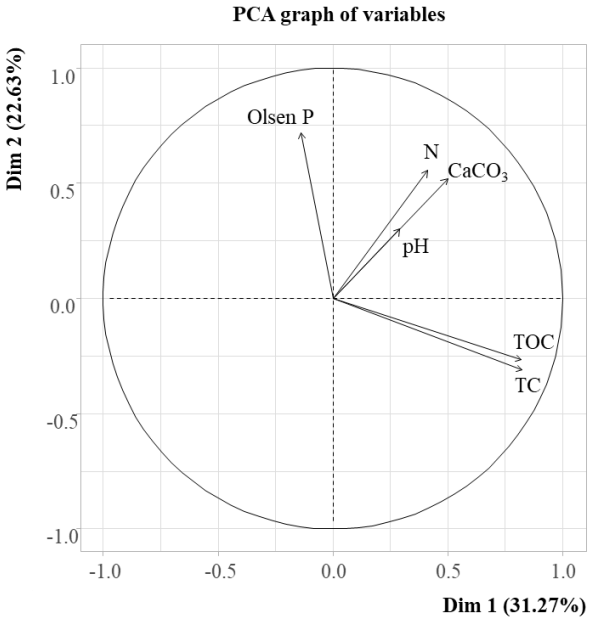


Figure 2 : A) Principal Component Analysis of physico-chemical properties of soils receiving a total P fertilization (P100), zero fertilization (P0), half fertilization (P50) with or without PSM application, C12, F23 or P2. B) Correlation graphic of tested variables : N; Nitrogen, TOC; Total Organic Carbon, TC; Total Carbon).

3.5 Enzyme assays

Several enzymatic activities implied in the functioning of biogeochemical cycles in soil were investigated to evaluate the modifications induced by P fertilization modalities and particularly those linked to PSB application.

Interaction of PSB application and P fertilization had a significant influence on urease activity (Table S1). The absence of P fertilization without PSB application (P0 control) led to a strong reduction of urease activity in soil (0.03 mmol NH_4 min^{-1} g^{-1}), whereas all other fertilizations and PSB applications (including P0+C12, P0+F23 or P0+P2) allowed to maintain a similar level to P100 (Table S4). Arylamidase activity was also significantly affected by both PSB application and the level of P fertilization, considered alone but also in interactions (Table S1). P100 and P0 control showed significantly lower activity (2 and 2.28 mmol β-Naphtylamine min^{-1} g^{-1}, respectively) when compared to all other fertilization modalities (Table S4). Level of P fertilization, and to a lesser extent in interaction with PSB application, significantly affected phosphatase activity measured at pH 7 (Table S1). A higher value for uninoculated ZF control was found (55.10 mmol PNP min^{-1} g^{-1}), significantly different of all other controls (P25: 52.09 mmol PNP min^{-1} g^{-1}; P50: 48.86 mmol PNP min^{-1} g^{-1}; P100: 49.37 mmol PNP min^{-1} g^{-1}; Table S4). F23 application seemed to decrease phosphatase activity when combined with P0 and P25 (49.82 and 47.96 mmol PNP min^{-1} g^{-1}, respectively), comparatively to the corresponding control. Similarly, this enzymatic activity was also decreased for P25+P2 (47.08 mmol PNP min^{-1} g^{-1}). No noticeable difference could be found regarding acid phosphatase activity, which showed a mean activity of 46.48 ± 3.88 mmol PNP min^{-1} g^{-1}, considering all modalities. On the contrary, alkaline phosphatase activity was clearly affected by PSB application, likewise also in interaction with level P fertilization. No difference was observed between all uninoculated control treatments (between 93 and 107 mmol PNP min^{-1} g^{-1}; for P0, P25, P50 and P100 control, Table S4).

However, alkaline phosphatase activity tended to be higher following F23 or P2 application in combination with P50 (110 and 114.22 mmol PNP min^{-1} g^{-1}, respectively), particularly when compared to the P100 control (93.84 mmol PNP min^{-1} g^{-1}).

Enzymatic profiles were then calculated as the geometric mean of the combination of all previously described enzymatic activities (Table S4). P0, P25 and P50 control showed the highest values (17.7, 15.8 and 14.3, respectively), whereas the lowest values were obtained for P100, P25+P2 and P50+P2 (around 9–9.3).

3.6 P fertilization and PSB effects on bacterial and fungal abundance

Bacterial abundance, assessed by real-time PCR targeting a portion of 16S rDNA, showed no difference among all levels of P fertilization or after PSB application (Table S5). Meanwhile, fungal abundance, assessed by real-time PCR targeting a portion of 18S rDNA, showed tenuous differences despite two-way ANOVA showing no significant effect of fertilization or PSB application (Table S1). No noticeable difference was found by comparing P fertilization controls (Table S5). C12 application had no impact on fungal abundance, regardless of the level of P fertilization. F23 application decreased fungal abundance when no P fertilization (P0) was provided ($1.04.10^{+6}$ 18S copies g^{-1}). On the contrary, P2 application tends to slightly increase fungal abundance in P25 fertilization ($3.46.10^{6}$ 18S copies g^{-1}).

3.7 Effects of the level of P fertilization and the inoculation of F23 on bacterial and fungal community structure

Because of interesting results on plant growth observed after F23 application combined with P50 fertilization, a focus on the diversity and the structure of microbial community associated with the plant rhizosphere was more particularly done for P100, P0, P0+F23, P25, P25+F23 and P50 fertilization.

3.7.1 Diversity and richness indices

After the demultiplexing and trimming of raw reads for bacterial and fungal analyses (realized by Microsynth), the number of high-quality sequences retained for each studied modality are summarized in Table S6. Rarefaction curves were drawn and reached the plateau for all samples in both bacterial and fungal analyses (data not shown), making these results sufficiently representative of the associated microbiomes.

Bacterial and fungal richness (Table S7) were identical for all tested modalities. Regarding the diversity Shannon index, the results stayed closed, but some differences were highlighted. P50 control showed a lower Shannon index for bacterial communities (4.36) compared to the P0 and P100 fertilization controls and all P fertilization levels with F23 application (around 4.41 and 4.44). Fungal Shannon indexes showed no differences, except between P50 with F23 application and P25 control (3.28 versus 3.51). Same results were found concerning evenness with the Pielou index (Table S7) in both bacterial and fungal communities.

3.7.2 Microbiome composition

3.7.2.1 Bacterial community

All sequences were assigned at a different taxonomic level, from bacterial phylum to species. Among the bacterial community, the dominant phyla (Figure 3, Table S8) were Proteobacteria (from 32.2 to 34.3%), followed by Acidobacteria (from 26.5 to 27.6%) and Actinobacteria (from 21.2 to 23.1%). PCA of the overall OTU matrix (Figure 4) depicted a high variation in bacterial community structure and diversity for uninoculated P50 control. However, F23 application combined with P50 fertilization appears totally separated from this control as well as from P0 and P100. All treatments with F23 application, whatever the level of P fertilization, appeared to be grouped together, whereas control treatments are more dispersed (Figure 4).

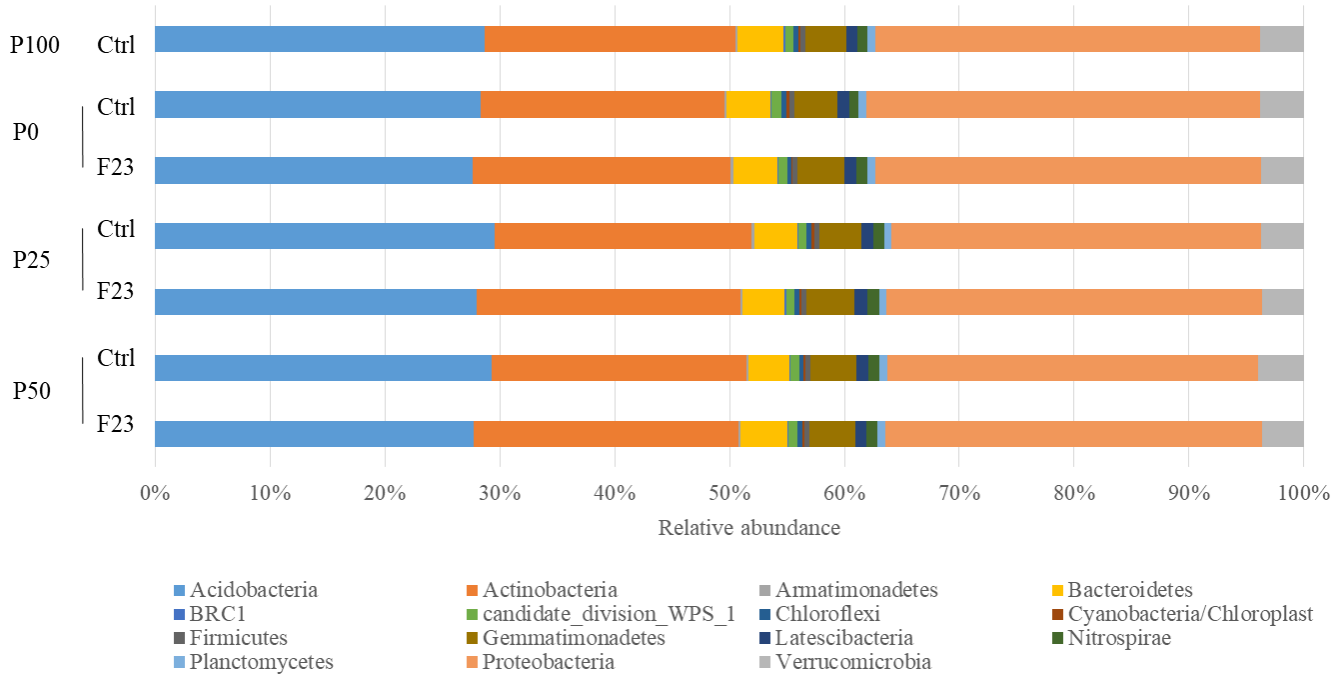


Figure 3: Bacterial phyla relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. P100: Total P fertilization, P0: zero P Fertilization, P25: quarter fertilization, P50: half fertilization, Ctrl: control samples receiving no PSB inoculum, F23: samples receiving the F23 strain

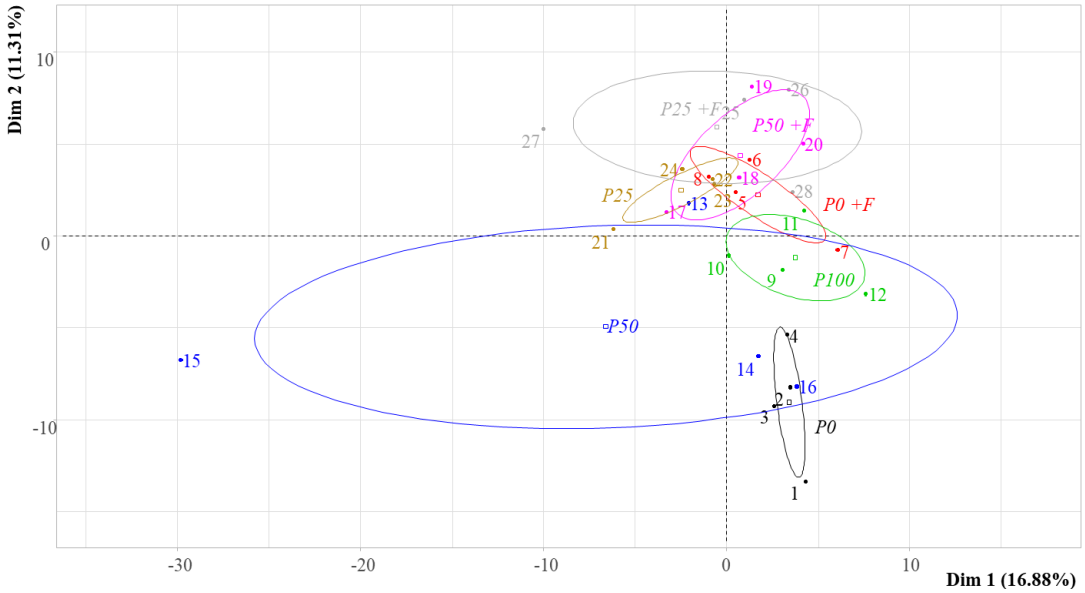


Figure 4: Principal Component Analysis generated from matrices of bacterial OTUs relative abundances, obtained by Illumina sequencing of four replicates per treatments. P0: zero P fertilization, P100: total P fertilization, P50: half fertilization, P25: quarter fertilization, « +F » means F23 PSB application

Nevertheless, no such clear patterns were found at the phylum and class scales on heatmap analyses (Figures S3 and S4). Here, we decided to focus more precisely on the incidence of F23 application on the bacterial community associated with rhizospheric soil, in comparison to the corresponding uninoculated control, at each level of P fertilization. Considering the phyla scale, at P0, both relative proportions of Gemmatimonadetes and Nitrospirae were significantly higher following F23 addition (4.07% and 1.02%, respectively, compared to 3.76% and 0.84% for uninoculated P0 control, respectively; Table S8). At P25, relative proportions of Acidobacteria and Firmicutes were significantly lower following F23 addition (28% and 0.42%, respectively, compared to 29.5% and 0.48% for uninoculated P25 control, respectively). On the contrary, the relative proportion of Gemmatimonadetes was significantly higher (4.22% compared to 3.94% for uninoculated P25 control; Table S6). At P50 fertilization, the relative proportions of Acidobacteria and Verrucomicrobia were significantly lower following F23 addition (27.7% and 3.68%, respectively, compared to 29.3% and 3.57% for uninoculated P50 control, respectively). On the contrary, the relative proportion of Bacteroidetes was significantly higher (4.06%) compared to 3.57% for uninoculated HF control (Table S8). When comparing all F23-inoculated modalities together, only the relative proportions of Firmicutes were significantly influenced by the level of P fertilization, with a higher proportion for P50+F23 (0.49%) compared to 0.42% for both P0 and P25 with the F23 strain (Figure 3). At the genus scale, some differences could also be highlighted (Figure 5, Table S9). At P0, compared to non-inoculated control, F23 application significantly increased relative abundances of the genera *Gemmatimonas*, *Thermodesulforhabdus* and *Allocatelliglobosispora* but decreased those of *Sphingomonas*, *Ferruginibacter*, *Lysobacter*, *Sphingosinicella*, *Thermomonas* and *Spartobacteria* (Table S9). At P50, F23 application increased relative abundances of the genera *Ramlibacter*, *Nocardioides*, *Inhella*, *Bradyrhizobium* and *Thiobacillus* but decreased those of *Sphingomonas*, Acidobacteria-GP6, *Lysobacter*, *Thermomonas* and *Spartobacteria.*

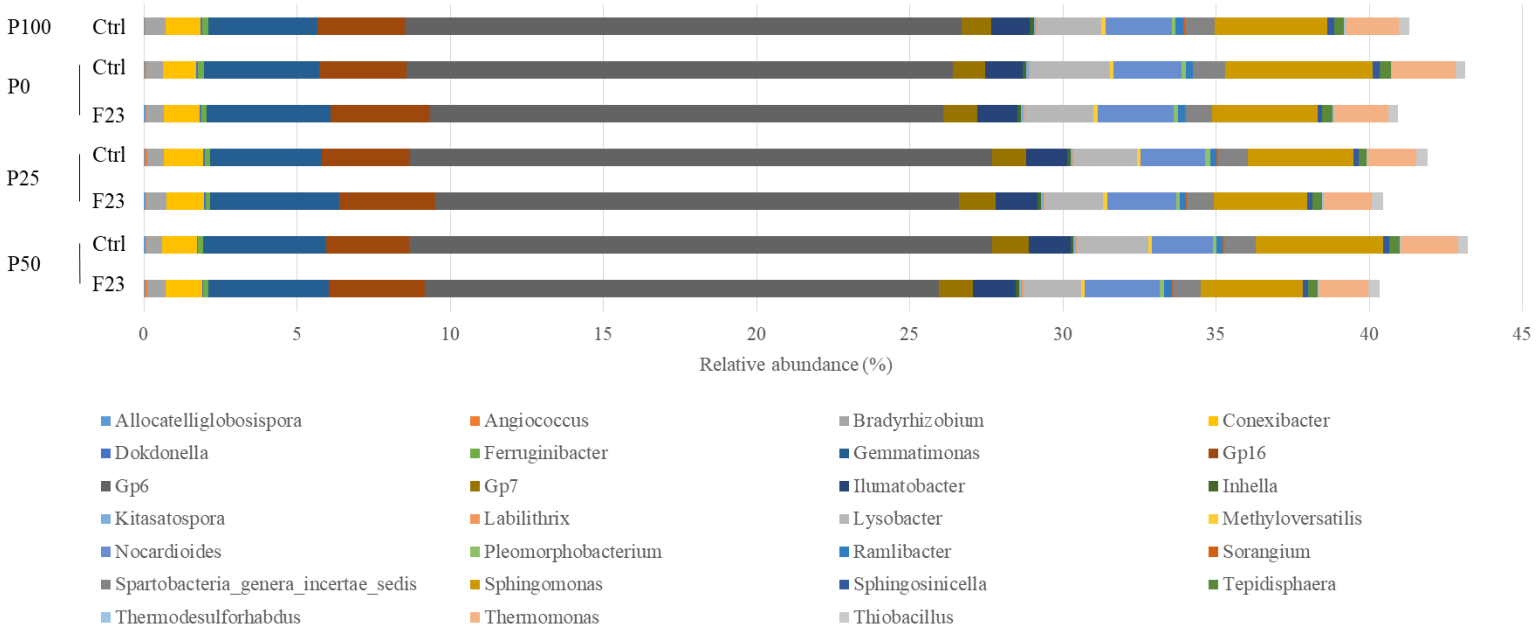


Figure 5: bacterial genera relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the different treatments are showed here. P100: Total P fertilization, P0: zero P Fertilization, P25: quarter fertilization, P50: half fertilization, Ctrl: control samples receiving no PSB inoculum, F23: samples receiving the F23 strain

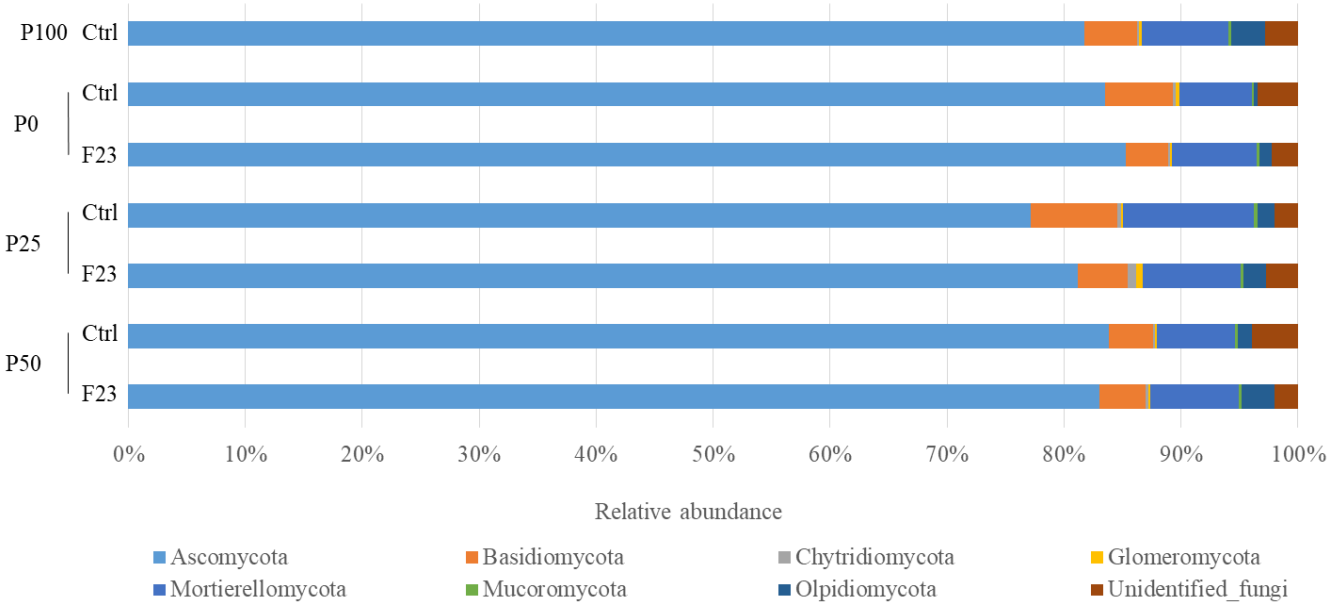


Figure 6: Fungal phyla relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. P100: Total P fertilization, P0: zero P Fertilization P25: quarter fertilization, P50: half fertilization, Ctrl: control samples receiving no PSB inoculum, F23: samples receiving the F23 strain.

When comparing all F23-inoculated modalities together, relative abundances of some bacterial genera were influenced by the level of associated P fertilization. Proportions of *Angiococcus* and *Thiobacillus* were lower for P0+F23, whereas those of *Lysobacter* were higher. Those of *Ramlibacter* and *Pleomorphobacterium* were lower for P25+F23. Proportions of *Thermodesulforhabdus* were lower for P50+F23, whereas those of *Labilithrix* were higher.

3.7.2.2 Fungal community

All sequences were assigned at different taxonomic levels, from bacterial phylum to species. Regarding fungal phyla relative abundance (Figure 6, Table S10), Ascomycota was highly represented (from 77.17% to 83.7%), followed by Mortierellomycota (from 6.20 to 11.19%) and Basidiomycota (from 3.63% to 7.42%). Proportions of other fungal phyla were comprised between 0.14% and 2.90%. Unidentified fungi represented 2% to 3.96% of all fungal OTUs. PCA of fungal OTUs (Figure 7) showed that all modalities with F23 inoculation were grouped together, as observed on PCA analysis for bacterial OTUs. However, the distinctions from uninoculated modalities were not clearly observed, such as those for the P0 and P25 levels. Only the P50 fertilization level presented a tenuous separation between uninoculated control and F23 application, according to the second axis. In the same way as the bacterial analysis, no such patterns were found on heatmaps at the phylum and class scales (Figures S5 and S6). Once more, as for the bacterial community, we focused on the description of the incidence of F23 application on the fungal community associated with rhizospheric soil, in comparison to the corresponding uninoculated control, at each level of P fertilization. Considering the phyla scale, no clear significant differences could be noticed following F23 application in comparison to each corresponding uninoculated control, excepted for a higher proportion of Glomeromycota for P25+ F23 (0.6%) compared to 0.17% for P25 control as well as significantly superior to those observed for P0+F23 and P50+F23.

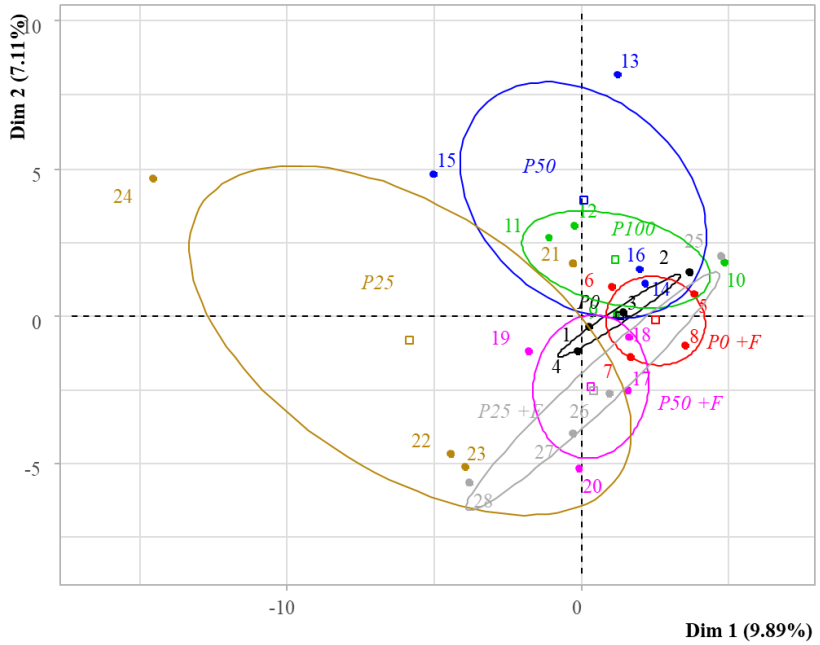


Figure 7: Principal Component Analysis generated from matrices of fungal OTUs relative abundances obtained by Illumina sequencing of four replicates per treatments. P0: zero P fertilization, P100: total P fertilization, P50: half fertilization, P25: quarter fertilization, « +F » means F23 PSB application

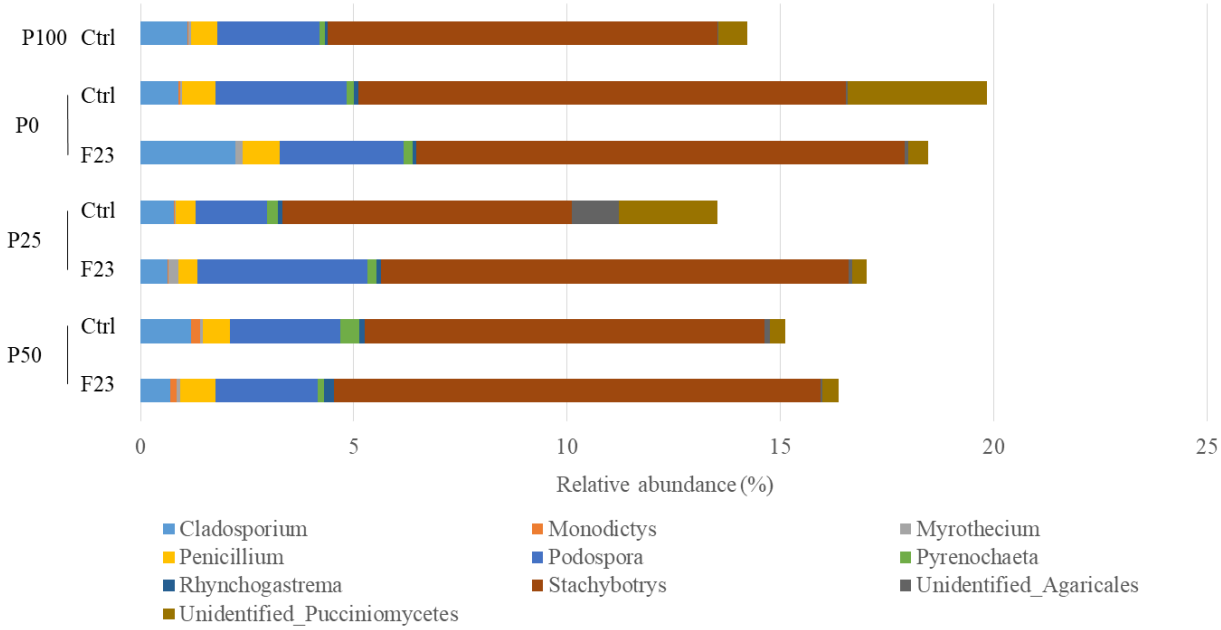


Figure 8 : Fungal genera relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing at least one significant differences among the tested treatments are presented here. P100 : Total P fertilization, P0: zero P Fertilization P25 : quarter P fertilization, P50 : half P fertilization , Ctrl : control samples receiving no PSB innoculum, F23 : samples receiving the F23 strain

A higher variability of fungal phyla's relative abundance was observed than was previously observed for bacterial phyla. Interestingly, the global pattern of fungal phyla observed for uninoculated P25 control tended to be tenuously dissimilar from all other modalities (Figure 6, Table S10). Indeed, P25 presented the lowest relative abundance of Ascomycota (77.17%) and the highest relative abundances of Mortierellomycota (11.19%) and Basidiomycota (7.42%).

Regarding the relative abundance of fungal genera, some significant differences could be noted (Figure 8, Table S11). At P0, compared to non-inoculated control, F23 application significantly lowered the relative abundance of unidentified *Pucciniomycetes* (Table S11). At P25, F23 application significantly decreased the relative abundance of *Agaricales* but increased those of *Myrothecium*, *Podospora* and *Stachybotrys* (Table S11). Under P50 fertilization, F23 application significantly lowered the relative abundance of unidentified *Pyrenochaeta* but increased that of *Rhynchogastrema* (Table S11). When comparing all F23-inoculated modalities together, the relative abundances of some fungal genera were influenced by the level of associated P fertilization. Thus, the relative abundance of *Cladosporium*, *Podospora* and *Rhynchogastrema* were higher for P0+F23, P25+F23 and P50+F23, respectively. On the contrary, the proportion of *Podospora* was lower for P25+F23.

4. Discussion

4.1 Key factors of success for PSB strain application

The three tested PSB strains were first selected according to their *in vitro* potential of P solubilization and also considering their associated PGPR traits. P2 and F23 strains showed contrasted solubilization efficiency according to nutrient ratios and forms, between the richer Pikovskaya and the more stringent NBRIP medium. This suggests a metabolic change according to culture conditions (Manzoni et al., 2017; Nautiyal, 1999). When these PSB strains were added to soil after rapeseed emergence, a wide variety of plant responses was observed.

C12 strain, isolated from rapeseed rhizospheric soil, which presented high *in vitro* solubilization efficiency on both tested media (Pikovskaya and NBRIP) and also interesting PGPR traits, showed no effect on rapeseed growth.

On the contrary, the F23 strain, isolated from faba bean rhizospheric soil, with lower *in vitro* solubilization abilities on both Pikovskaya and NBRIP media but higher production of gluconic acid and more efficiency to use phytate, presented a promising ability to promote plant growth. Its application on rapeseed seedlings led to an increased biomass in roots compared to plants receiving a total mineral P fertilization (P100) without any adjunction of PSB strains. As F23, P2 strain tends to increase root growth. However, dramatical deleterious effects were observed when the level of P fertilization associated with P2 treatment was lower. Furthermore, combined with P25 fertilization, the application of P2 strain increased the global fungal biomass, suggesting a possible preferential cooperation between P2 and fungi regarding P acquisition (Zhang et al., 2016).

These results highlight the importance of considering the surrounding environmental conditions, particularly the importance of a minimal available P input to activate the PSB potentiality. Indeed, the absence of PSB or PGPR effect on rapeseed growth for P25 fertilization suggests that the initial threshold of available P may not have been sufficient (i) for PSB development and colonization, (ii) for the expression of its PSB potential and (iii) for P solubilization to the benefit of rapeseed growth (i.e. cooperation preference with fungi for microbial P uptake). Another hypothesis is that the response of rapeseed to P starvation could have raised a deleterious crosstalk between plants and microorganisms through plant immune system remodelling (Isidra-Arellano et al., 2021). Indeed, Morcillo et al. (2020) found P starvation-like immune system modulation in *Arabidopsis thaliana* turned the PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* into a pathogenic phenotype.

As some *Pseudomonas* could be plant pathogens (Carezzano et al., 2017; Gislason and de Kievit, 2020), the immune status of plants, particularly linked to nutrient conditions, must be considered to ensure the success of PSB deployment.

As tested strains were originated from soils under the influence of roots of three different crops, the C12 strain originating from the rapeseed environment could be expected to induce superior growth promotion of rapeseed, which was ultimately not verified here. When regarding the general metabolism of various C sources evaluated through the determination of the substrate utilization pattern of the three tested strains by Biolog analysis, the F23 strain showed a more diverse and efficient profile, particularly in carboxylates and amino-acid consumption. As these C forms are known to be abundant in root exudates (Jones, 2005; Mimmo et al., 2011), the PGPR ability to consume these compounds could represent a crucial advantage for their competitiveness with the autochthonous microbial community and thus an efficient colonization of the ecological niche. Indeed, one of the proposed keys of success of PGPR inoculation relies on the efficient colonization of the root environment, including bacterial mobility and the ability of microorganisms to recognize plants recruitment signals, escape immune defences, produce biofilm and produce metabolites of interest for plant growth if surrounding physico-chemical conditions are favourable (Pang et al., 2021; Trivedi et al., 2020).

Malate has been proposed as an important signal metabolite to recruit PGPR in the rhizosphere (Rudrappa et al., 2008). The ability of the three tested PSB strains to degrade it represents a strong clue of their potential of closed specific interaction with rapeseed. F23 strain is distinguishable by its capability to use citric acid and succinic acid, exuded by rapeseed (Shahbaz et al., 2006). Here, we assume the promising effect of the isolate F23 relies on its wider metabolic profile, allowing better colonization of the plant rhizosphere.

This strain constitutes the best candidate to enhance rapeseed growth, despite the apparently lower *in vitro* solubilization efficiency. Moreover, these results also highlighted the importance of a minimal combined threshold of available P in a P-deprived soil. Here, in the chosen soil with a low P content, P fertilization could be decreased to a half level compared to the recommended dose, combined with F23 application. This appears to be a promising alternative to reduce chemical fertilizers. Nevertheless, the chosen soil showed particular characteristics, including a high level of free calcium carbonate content and thus a particularly low available phosphate content (Castro and Torrent, 1994). So transposition of such results has to be confirmed in another pedoclimatic context. Nevertheless, our results now need to be confirmed on a complete culture cycle of rapeseed, particularly to evaluate the consequence on yield and production quality. They also need to be validated through field experiments.

4.2 Biological processes sustaining rapeseed growth

Changes in the bioavailability of nutrients constitutes the main goal for PSB deployment. In this study, both C12 and F23 strains, combined with P50 fertilization level, led to interesting modifications of soil chemical property profiles, indicating an action of microorganisms on nutrient availability. Regarding C12 application, no effect was observed on plant growth, so no modifications of soil chemical properties were expected. However, following C12 inoculation, soil chemical profile was characterized by a slightly higher amount of available P. As free calcium carbonate increased, available P was probably provided by solubilization. Because phosphatase activities are known to be repressed by surrounding P availability (Sinsabaugh and Follstad Shah, 2012), this increase in available P could be sufficient to inhibit organic P mineralization. This phenomenon could explain why alkaline phosphatase activity was still maintained similarly to P50 control (without PSB inoculation), impairing plant growth promotion because of P starvation. On the contrary, rapeseed growth enhancement following F23 inoculation occurred concomitantly with modifications of soil chemical properties.

Further, F23 application led to a modification of the chemical profile of soil, reaching the total fertilization profile. Interestingly, P2 application did not significantly modify the soil chemical profile compared to P50 control. Meanwhile, as free calcium carbonate increased in the soil following the inoculation of these two strains, we assume that P solubilization occurred. As our results show soils at the final stage, we hypothesize that solubilized P was consumed by plants and/or soil microorganisms. In parallel, microbial alkaline phosphatase activity was increased for P50 fertilization combined with P2 and F23 inoculation. The immediate consumption of the newly available P by plants and microorganisms allowed maintained activity of organic P mineralization and thus an interesting equilibrium state and continuous P flow.

Even if soil total N tended to increase with PSB inoculation (significantly so with P2 application), no significant increase in the activities of N-mineralizing enzymes was found. Previous studies showed that P availability increased N mineralization (Chen et al., 2016; Hobbie, 2015), which was not the case here. As peptides and amino acids could be rapidly mineralized (Ma et al., 2017), a past increase of arylamidase activity could not be totally excluded. Other N and P enzymes, such as N-acetyl-glucosaminidase, nucleases or phytases, could provide more information on nutrient sources. Disentangling P solubilization processes and PGPR activities remains sometimes difficult at our current state of knowledge. Here, some evidence of P solubilization activity seemed to be observed but were not systematically correlated with P uptake by plants. Microbial-mediated biological processes did not explain the modifications of the chemical properties of soils, and no coupling between N and P cycles has been demonstrated here. Although some evidence of P solubilization has been observed, its effects on rapeseed growth could also have been the result of PGPR traits such as IAA production or even a combined effect of PGPR and PSM abilities.

4.3 Modifications of the microbial community structure to the benefit of rapeseed growth

PGPR inoculation in soil can induce shifts in the structure of the native microbial community (De Zutter et al., 2021). Because PSB inoculation showed no effect on global indicators for bacteria or fungi abundance, a deeper exploration was performed by analyzing the microbiome composition of the different modalities using the strain F23, which appeared to be the most promising actor. Indeed, the F23 strain actually modified the associated bacterial communities by increasing their diversity and evenness when combined with P50 fertilization. On the contrary, no such global effect could be observed for fungal indicators. Only minor shifts were found regarding the relative abundance of fungal genera. When considering the modality P50+ F23, the relative abundance of *Pyrenochaeta* appeared to decrease. *Pyrenochaeta* had already been described as an infectious agent causing root rots on a wide host spectrum, such as rapeseed, tomato and onion (Bennett et al., 2020; Elsiddig and Hassan, 2017; Testen et al., 2019). Conversely, the relative abundance of *Rhynchogastrema* increased with the treatment P50+F23. The role of *Rhynchogastrema* in soils and plants remained unclear except for its mycoparasitic lifestyle (Begerow et al., 2017). The modulation of the structure of the fungal community after F23 inoculation was more tenuous compared to the bacterial compartment. Rhizospheric microbial communities associated with Brassicaceae are well known to be very constrained and principally linked to the production of glucosinolates by plants. In particular, Bressan et al. (2009) showed a stronger impact of these specific compounds on fungi, which was only marginally modified by F23 inoculation.

The impacts of F23 application on the bacterial community structure are more conclusive. OTU analysis showed that bacterial community structures were very close following F23 inoculation, whatever the P fertilization level, and differentiated from controls with no PSB. These results suggest that plant growth enhancement could also be due to the modification of bacterial community structure following the F23 inoculation.

However, this positive effect seemed to be expressed only when the P threshold in soil was sufficient (i.e. for P50 fertilization, particularly). Bacterial relative abundance shifts were significantly observed on some interesting genera, as already described in several studies focused on PGPR inoculations (Chen et al., 2021; De Zutter et al., 2021; Fu et al., 2017; Y. Zhang et al., 2019). The abundance of 5 genera decreased with PSB under P50 fertilization: *Sphingomonas*, Acidobacteria-Gp6, *Lysobacter*, *Thermomonas* and a genus belonging to the *Spartobacteria* class. These genera have already been described as potential biocontrol strains (Innerebner et al., 2011; Zhao et al., 2020) or involved in soil suppressiveness (Seccareccia et al., 2015) but also sometimes as PGPR involved in root growth (Visioli et al., 2018), resistance to osmotic stresses (Videira et al., 2009) and endophytic N_2 fixation (Asaf et al., 2017). Conversely, the bacterial genera *Ramlibacter*, *Nocardioides*, *Inhella*, *Bradyrhizobium* and *Thiobacillus* increased. *Ramlibacter* and *Nocardioides* had already been described as presenting PGPR potential in recent studies (Meena et al., 2020; L.-N. Zhang et al., 2019). Indeed, *Ramlibacter* genus, the abundance of which was increased following the application of a PGPR cocktail, positively contributed to disease mitigation and plant growth (Zhang et al., 2019). The production of growth-enhancing phytohormones has been demonstrated in *Nocardioides*, which could play a role in mitigating salinity stress and promote plant growth in this condition (Meena et al., 2020). To our knowledge, less is known in the literature about the contribution of *Inhella* to plant growth. It had been recently suggested that *Inhella* is involved in cadmium remediation in soils (Xu et al., 2020). *Thiobacillus* was already described as a potentially PGPR enhancing transformation of sulphur in sulphate, contributing to their availability for plants (Gilani et al., 2021). *Bradyrhizobium* is well known as N_2-fixing bacteria, including as free-living fixators (Tao et al., 2021). Taken together, these results highlight a potentially interesting shift in the bacterial vicinity of rapeseed by decreasing the bacteria involved in disease control to the benefit of other PGPR more involved in plant growth and the N and sulphur cycles.

More, sulphur improvement in the vicinity of rapeseed roots could lead to a higher production in glucosinolates (Zhao et al., 1997), suggesting a shift towards this specific plant defense strategy, combined with a modulation of microbiota from biocontrol to nutrition specialization. Interestingly, cadmium-remediating bacteria were enhanced, and the use of mineral P fertilizers was often correlated with metal trace elements, including cadmium (Taylor and Percival, 2001). Because no change in enzyme activities involved in N cycle were found here, the tendency to an enhancement in free-living *Bradyrhizobium* populations following F23 application could also explain the observed increase of the content of soil total N.

5. Conclusion

In this study, three PSB strains isolated from rapeseed (strain C12), winter pea (strain P2) and faba bean (strain F23) were tested on early stages of rapeseed growth combined to a gradient of phosphate fertilization. Because best effects were expected with the C12 strain (i.e. isolated from the rhizosphere of same crop), no effect could be noticed on plant growth, despite some clues being found showing a potential of phosphate solubilization in the soil. Both the P2 and F23 strains enhanced the growth and P amount in roots when fertilization was reduced by half regarding the recommended input. Despite these promising results, the P2 strain was highly deleterious to rapeseed growth below this fertilization rate, which could be very limiting to its deployment in the field. While F23 showed apparently less favourable *in vitro* results, its global benefits to sustaining rapeseed growth were more relevant and satisfactory. Deployment of F23 allowed the reduction of P intrant by one half of the recommended fertilization, making this strain a promising alternative for the development of a biointrant solution. Its success could be partially explained by a wider range of carbon source catabolism, especially for carboxylates and amino acids, facilitating soil colonization.

Enhanced plant growth following F23 application could be linked to several processes, such as the production of PGPR metabolites and the increase in alkaline phosphatase activity. But it could also act through shifts in the structure of bacterial community, promoting other bacterial genera known as PGPR and involved in the N and sulphur cycles. This study also highlighted the necessity to consider the potentiality of hybrid solutions combining PSB use and mineral P input. The obtained results emphasized the importance of a minimal required P threshold to initiate the desired positive effects of the PSB/PGPR isolates on plant growth. It could be interesting to evaluate the impact of F23 inoculation on rapeseed root architecture in contrast to P and N fertilization. Moreover, the F23 effect should also be validated on the complete culture cycle of rapeseed and in field experiments.

Another promising perspective could be to consider an approach based on the construction of SynComs, i.e. synthetic microbial communities allowing the combining of several desirable PGPR traits (Trivedi et al., 2020). We tested here only single-strain inoculations. Because numerous studies showed a great potential in PGPR interactions, applying microorganisms' consortia could improve plant benefit through the possible synergic effect of multiple strains. Future research could also be focused on optimizing and shaping plant–microorganisms interaction. Indeed, besides artificial PSB inoculation, another alternative will be to maximise the balance to native beneficial microbial partners associated with plants. Research has to be engaged to better understand the influence of rapeseed exudation on PGPR recruitment, their maintenance in the rhizosphere and their expression of a beneficial phenotype for plants.

Declaration of Interests:

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Author Contributions: Conceptualization, CA, MB, KL; methodology, CA, MB; software, CA; validation, CA; formal analysis, CA, MB; investigation, CA, MB; writing—original draft preparation, CA; writing—review and editing, CA, MB, JCA; supervision, MB, KL, JCA; project administration, MB, KL, JCA; funding acquisition, KL, JCA. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Region Normandie, which supported the projects RIN EPURE (Enhancing Plant nUtRition and hEalth), RIN Normandy Plant Technologies and the regional funding of the PhD thesis of Charlotte Amy.

Acknowledgments : The authors acknowledge the support provided by the region Normandy, the University of Caen Normandy and the SFR Normandie Végétal (FED4277). The authors also want to acknowledge Dr Coline Deveautour for her help in metagenomic analysis; François d'Hubert, the farmers of the Groupement d'Interêt Economique et Environnemental (GIEE) of 'Pois d'Hiver en Pays de Bray' and Laurent Batel for their help by giving access to their farm plots, both for PSB screening and for greenhouse experiment; the technical staff of Unilasalle and UMR INRAe/UCN EVA for their help in the realization of these experiments.

References :

Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Front. Microbiol. 8, 971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971

Ambreetha, S., Balachandar, D., 2019. Rhizobacteria-Mediated Root Architectural Improvement: A Hidden Potential for Agricultural Sustainability, in: Kumar, A., Meena, V.S. (Eds.), Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability. Springer Singapore, Singapore, pp. 111–128. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_6

Asaf, S., Khan, A.L., Khan, M.A., Imran, Q.M., Yun, B.-W., Lee, I.-J., 2017. Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with Sphingomonas sp. LK11 and exogenous trehalose. Microbiol. Res. 205, 135–145. https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.009

Begerow, D., Kemler, M., Feige, A., Yurkov, A., 2017. Parasitism in Yeasts, in: Buzzini, P., Lachance, M.-A., Yurkov, A. (Eds.), Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Springer International Publishing, Cham, pp. 179–210. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_7

Bennett, A.J., Hilton, S., Chandler, D., Mills, P., Bending, G.D., 2020. Relationships between yield, rotation length, and abundance of Olpidium brassicae and Pyrenochaeta sp. in the rhizosphere of oilseed rape. Appl. Soil Ecol. 147, 103433. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103433

Carezzano, M.E., Sotelo, J.P., Primo, E., Reinoso, E.B., Rovey, M.F.P., Demo, M.S., Giordano, W.F., Oliva, M. de las M., 2017. Inhibitory effect of Thymus vulgaris and Origanum vulgare essential oils on virulence factors of phytopathogenic Pseudomonas syringae strains. Plant Biol. 19, 599–607. https://doi.org/10.1111/plb.12572

Castro, B., Torrent, J., 1994. Phosphate availability in calcareous Vertisols and Inceptisols in relation to fertilizer type and soil properties. Fertil. Res. 40, 109–119. https://doi.org/10.1007/BF00750095

Chen, L., Hao, Z., Li, K., Sha, Y., Wang, E., Sui, X., Mi, G., Tian, C., Chen, W., 2021. Effects of growth-promoting rhizobacteria on maize growth and rhizosphere microbial community under conservation tillage in Northeast China. Microb. Biotechnol. 14, 535–550. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13693

Chen, Y., Sun, T.-T., Qian, H.-Y., Fan, J.-B., He, Y.-Q., Sun, B., 2016. Nitrogen mineralization as a result of phosphorus supplementation in long-term phosphate deficient soil. Appl. Soil Ecol. 106, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.019

Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 42, D633–D642. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244

COMIFER, 1995. Aide au diagnostic et à la prescription de la fertilisation phosphatée et potassique des grandes cultures.

De Zutter, N., Ameye, M., Debode, J., De Tender, C., Ommeslag, S., Verwaeren, J., Vermeir, P., Audenaert, K., De Gelder, L., 2021. Shifts in the rhizobiome during consecutive *in planta* enrichment for phosphate-solubilizing bacteria differentially affect maize P status. Microb. Biotechnol. 1751-7915.13824. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13824

Dissanayaka, D.M.S.B., Ghahremani, M., Siebers, M., Wasaki, J., Plaxton, W.C., 2021. Recent insights into the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. J. Exp. Bot. 72, 199–223. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa482

Elsiddig, M.A., Hassan, S.M.E., 2017. Host Plants of Pyrenochaeta terrestris the Causal Agent of Pink Root Rot Disease on Onion Allium cepa L. IOSR J. Agric. Vet. Sci. 10, 49–52. https://doi.org/10.9790/2380-1003014952

Fu, L., Penton, C.R., Ruan, Y., Shen, Z., Xue, C., Li, R., Shen, Q., 2017. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. Soil Biol. Biochem. 104, 39–48. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.10.008

Gilani, A., Abbasdokht, H., Gholami, A., 2021. Effects of Thiobacillus and Different Levels of Sulfur Fertilizer on Growth and Physiological Indices in Intercropping of Sesame (Sesamum Indicum L.) and Mung Bean (Vigna Radiata L.). Gesunde Pflanz. https://doi.org/10.1007/s10343-021-00554-6

Gislason, A.S., de Kievit, T.R.Y. 2020, 2020. Friend or foe? Exploring the fine line between Pseudomonas brassicacearum and phytopathogens. J. Med. Microbiol. 69, 347–360. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001145

Grizzetti, B., Billen, G., Davidson, E.A., Winiwarter, W., de Vries, W., Fowler, D., Howard, C.M., Bleeker, A., Sutton, M.A., Lassaletta, L., Garnier, J., 2020. Global Nitrogen and Phosphorus Pollution, in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Bleeker, A., Hicks, W.K., Masso, C., Raghuram, N., Reis, S., Bekunda, M. (Eds.), Just Enough Nitrogen. Springer International Publishing, Cham, pp. 421–431. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58065-0_28

Helfenstein, J., Tamburini, F., von Sperber, C., Massey, M.S., Pistocchi, C., Chadwick, O.A., Vitousek, P.M., Kretzschmar, R., Frossard, E., 2018. Combining spectroscopic and isotopic techniques gives a dynamic view of phosphorus cycling in soil. Nat. Commun. 9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05731-2

Hobbie, S.E., 2015. Plant species effects on nutrient cycling: revisiting litter feedbacks. Trends Ecol. Evol. 30, 357–363. https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.03.015

Honvault, N., Houben, D., Nobile, C., Firmin, S., Lambers, H., Faucon, M.-P., 2020. Tradeoffs among phosphorus-acquisition root traits of crop species for agroecological intensification. Plant Soil 14. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04584-3

Howson, S.J., Davis, R.P., 1983. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. Enzyme Microb. Technol. 5, 377–382. https://doi.org/10.1016/0141-0229(83)90012-1

Innerebner, G., Knief, C., Vorholt, J.A., 2011. Protection of Arabidopsis thaliana against Leaf-Pathogenic Pseudomonas syringae by Sphingomonas Strains in a Controlled Model System. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3202–3210. https://doi.org/10.1128/AEM.00133-11

Isidra-Arellano, M.C., Delaux, P.-M., Valdés-López, O., 2021. The Phosphate Starvation Response System: its role in the regulation of plant-microbe interactions. Plant Cell Physiol. https://doi.org/10.1093/pcp/pcab016

Jones, D.L., 2005. Organic acids in the rhizosphere – a critical review 20.

Kjeldahl, J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Z. Für Anal. Chem. 22, 366–382. https://doi.org/10.1007/BF01338151

Kumar, Ajay, Kumar, Amit, Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S., 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. Recent Res. Sci. Technol. 5.

Lakshmanan, V., Shantharaj, D., Li, G., Seyfferth, A.L., Janine Sherrier, D., Bais, H.P., 2015. A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (Oryza sativa L.). Planta 242, 1037–1050. https://doi.org/10.1007/s00425-015-2340-2

Ma, H., Pei, G., Gao, R., Yin, Y., 2017. Mineralization of amino acids and its signs in nitrogen cycling of forest soil. Acta Ecol. Sin. 37, 60–63. https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2016.09.001

Manzoni, S., Čapek, P., Mooshammer, M., Lindahl, B.D., Richter, A., Šantrůčková, H., 2017. Optimal metabolic regulation along resource stoichiometry gradients. Ecol. Lett. 20, 1182–1191. https://doi.org/10.1111/ele.12815

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 64, 795–799. https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998

Meena, K.K., Bitla, U.M., Sorty, A.M., Singh, D.P., Gupta, V.K., Wakchaure, G.C., Kumar, S., 2020. Mitigation of Salinity Stress in Wheat Seedlings Due to the Application of Phytohormone-Rich Culture Filtrate Extract of Methylotrophic Actinobacterium Nocardioides sp. NIMMe6. Front. Microbiol. 11, 2091. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02091

Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, T.S., Blackwell, M., Stutter, M., Shand, C., Lumsdon, D., Cooper, P., Wendler, R., Brown, L., Almeida, D.S., Wearing, C., Zhang, H., Haygarth, P.M., 2017. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. Plant Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3362-2

Mimmo, T., Hann, S., Jaitz, L., Cesco, S., Gessa, C.E., Puschenreiter, M., 2011. Time and substrate dependent exudation of carboxylates by Lupinus albus L. and Brassica napus L. Plant Physiol. Biochem. 49, 1272–1278. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.012

Morcillo, R.J., Singh, S.K., He, D., An, G., Vílchez, J.I., Tang, K., Yuan, F., Sun, Y., Shao, C., Zhang, S., Yang, Y., Liu, X., Dang, Y., Wang, W., Gao, J., Huang, W., Lei, M., Song, C.-P., Zhu, J.-K., Macho, A.P., Paré, P.W., Zhang, H., 2020. Rhizobacterium-derived diacetyl modulates plant immunity in a phosphate-dependent manner. EMBO J. 39, e102602. https://doi.org/10.15252/embj.2019102602

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170, 265–270.

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., Cheng, Y., 2021. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. Front. Plant Sci. 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276

Pikovskaya, R., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologia 362–370.

Rashid, A., Bughio, N., 1993. Evaluating internal phosphorus requirement of rapeseed, chickpea, lentil, and wheat by seed analysis. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 24, 1359–1369. https://doi.org/10.1080/00103629309368882

Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W., Bais, H.P., 2008. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. Plant Physiol. 148, 1547–1556. https://doi.org/10.1104/pp.108.127613

Seccareccia, I., Kost, C., Nett, M., 2015. Quantitative Analysis of Lysobacter Predation. Appl. Environ. Microbiol. 81, 7098–7105. https://doi.org/10.1128/AEM.01781-15

Shahbaz, A.M., Oki, Y., Adachi, T., Murata, Y., Khan, M.H.R., 2006. Phosphorus starvation induced root-mediated pH changes in solublization and acquisition of sparingly soluble P sources and organic acids exudation by *Brassica* cultivars. Soil Sci. Plant Nutr. 52, 623–633. https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00082.x

Sinsabaugh, R.L., Follstad Shah, J.J., 2012. Ecoenzymatic Stoichiometry and Ecological Theory. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 43, 313–343. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-071112-124414

Sterner, R.W., Elser, J.J., Vitousek, P.M., 2003. Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press. https://doi.org/10.1515/9781400885695

Tao, J., Wang, S., Liao, T., Luo, H., 2021. Evolutionary origin and ecological implication of a unique nif island in free-living Bradyrhizobium lineages. ISME J. https://doi.org/10.1038/s41396-021-01002-z

Taylor, M.D., Percival, H.J., 2001. Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertiliser bin. Environ. Pollut. 113, 35–40. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00170-6

Testen, A.L., Chala, A., Azerefegne, F., Miller, S.A., 2019. First Report of Corky Root Rot of Tomato Caused by *Pyrenochaeta lycopersici* in Africa. Plant Dis. 103, 1032. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1887-PDN

Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nat. Rev. Microbiol. 18, 607–621. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1

Vance, C.P., 2001. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiol. 127, 390–397.

Videira, S.S., De Araujo, J.L.S., Da Silva Rodrigues, L., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 2009. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing Sphingomonas bacteria associated with rice plants grown in Brazil. FEMS Microbiol. Lett. 293, 11–19. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01475.x

Visioli, G., Sanangelantoni, A.M., Vamerali, T., Dal Cortivo, C., Blandino, M., 2018. 16S rDNA Profiling to Reveal the Influence of Seed-Applied Biostimulants on the Rhizosphere of Young Maize Plants. Molecules 23, 1461. https://doi.org/10.3390/molecules23061461

Xu, Z., Wang, D., Tang, W., Wang, L., Li, Q., Lu, Z., Liu, H., Zhong, Y., He, T., Guo, S., 2020. Phytoremediation of cadmium-polluted soil assisted by D-gluconate-enhanced Enterobacter cloacae colonization in the Solanum nigrum L. rhizosphere. Sci. Total Environ. 732, 139265. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139265

Zhang, L., Xu, M., Liu, Y., Zhang, F., Hodge, A., Feng, G., 2016. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. New Phytol. 210, 1022–1032. https://doi.org/10.1111/nph.13838

Zhang, L.-N., Wang, D.-C., Hu, Q., Dai, X.-Q., Xie, Y.-S., Li, Q., Liu, H.-M., Guo, J.-H., 2019. Consortium of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strains Suppresses Sweet Pepper Disease by Altering the Rhizosphere Microbiota. Front. Microbiol. 10, 1668. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01668

Zhang, Y., Gao, X., Shen, Z., Zhu, C., Jiao, Z., Li, R., Shen, Q., 2019. Pre-colonization of PGPR triggers rhizosphere microbiota succession associated with crop yield enhancement. Plant Soil 439, 553–567. https://doi.org/10.1007/s11104-019-04055-4

Zhao, F.J., Withers, P.J.A., Evans, E.J., Monaghan, J., Salmon, S.E., Shewry, P.R., McGrath, S.P., 1997. Sulphur nutrition: An important factor for the quality of wheat and rapeseed. Soil Sci. Plant Nutr. 43, 1137–1142. https://doi.org/10.1080/00380768.1997.11863731

Zhao, Y., Mao, W., Pang, L., Li, R., Li, S., 2020. Influence of Phragmites communis and Zizania aquatica on rhizosphere soil enzyme activity and bacterial community structure in a surface flow constructed wetland treating secondary domestic effluent in China. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 26141–26152. https://doi.org/10.1007/s11356-020-08904-z

Supplemental data:

Table S1: p.values of two-ways ANOVA showing potential effects of PSB application, P fertilization and interactions of PSB and fertilization on each tested variable. Statistical tests were performed using aov function of R (4.0.2) software.

		PSB	P fertilization	PSB x fertilization
Biomass and status of P and N in plants	Shoots dry biomass	0.128	**0.001**	0.148
	Roots dry biomass	0.328	**0.002**	**0.003**
	Total dry biomass	0.148	**0.001**	0.091
	P amount in shoots	**0.023**	**5.07E-07**	0.161
	P amount in roots	0.251	**7.40E-05**	**0.004**
	P content in shoots	**0.042**	**9.06E-06**	0.964
	P content in roots	**0.014**	**6.73E-08**	0.700
	N amount in shoots	0.855	**0.031**	0.783
	N amount in roots	0.588	**0.012**	**0.014**
Soil chemical properties	pH	0.127	**0.027**	**0.013**
	Olsen P	**1.72E-07**	**1.45E-05**	**8.28E-07**
	$CaCO_3$	0.111	0.076	0.063
	Total Nitrogen	0.651	**2.71E-07**	0.247
	TOC	0.833	0.479	0.695
	TC	0.273	0.623	0.071
Enzyme activities	Arylamidase	**7.60E-09**	**1.73E-06**	**2.82E-03**
	Urease	0.084	0.122	**0.029**
	Alkaline phosphatase	**0.004**	0.273	**0.004**
	Acid phosphatase	0.948	0.056	0.175
	phosphatase pH 7	0.101	**1.17E-04**	**0.010**
Molecular biology analyses	bacterial abundance	0.685	0.280	0.717
	fungal abundance	0.087	0.080	0.532
	bacteria : fungi ratio	0.095	0.191	0.680
	bacterial Shannon index	**0.004**	0.231	0.192
	bacterial Pielou index	**0.004**	0.222	0.183
	Sphingomonas relative abundance	**3.44E-06**	**5.86E-05**	**0.018**
	Ramlibacter relative abundance	0.773	**0.009**	0.099
	Gp6 relative abundance	**3.45E-04**	0.396	0.536
	Lysobacter relative abundance	**0.005**	**0.004**	0.450
	Bradyrhizobium realtive abundance	**0.049**	**0.011**	0.378
	Thermomonas relative abundance	**0.019**	**0.008**	0.211
	Nocardioides relative abundance	**0.001**	0.378	0.255
	Inhella relative abundance	0.148	**0.041**	0.050
	Thiobacillus relative abundance	0.089	**0.010**	0.307
	Spartobacteria relative abundance	**0.001**	0.325	0.528
	Pyrenochaeta relative abundance	0.466	0.362	0.159
	Rhynchogastrema relative abundance	0.106	**0.002**	**0.018**

Table S2: Dry biomass and elemental contents (P, N, C) in rapeseed shoots, for each level of fertilization (total, zero, quarter and half) and each tested PSB (control: no PSB inoculation and inoculation with C1, F23 or P2). Results are expressed as the mean value ± standard deviation. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

		Biomass (g)		P content (mg)		N content (mg)	
P100	Ctrl	2.80 ± 0.30	*ab*	18.52 ± 3.25	*a*	103.60 ± 15.52	*ab*
P0	Ctrl	1.82 ± 0.07	*def*	8.95 ± 0.78	*cde*	74.37 ± 8.26	*b*
	C12	1.90 ± 0.24	*cdef*	9.29 ± 1.51	*cde*	73.23 ± 4.77	*b*
	F23	1.75 ± 0.12	*def*	8.65 ± 0.85	*cde*	79.12 ± 0.91	*b*
	P2	1.68 ± 0.18	*ef*	7.44 ± 0.72	*e*	86.47 ± 10.87	*ab*
P25	Ctrl	2.31 ± 0.17	*bcde*	12.23 ± 1.04	*bc*	83.03 ± 6.64	*b*
	C12	2.41 ± 0.41	*abcde*	12.48 ± 2.38	*bc*	84.20 ± 5.63	*ab*
	F23	2.35 ± 0.30	*abcde*	12.83 ± 1.31	*bc*	87.05 ± 3.70	*ab*
	P2	1.53 ± 0.22	*f*	7.89 ± 1.27	*de*	76.03 ± 5.49	*b*
P50	Ctrl	2.50 ± 0.28	*abcd*	14.67 ± 2.69	*ab*	82.12 ± 1.89	*b*
	C12	2.11 ± 0.21	*bcdef*	12.05 ± 1.54	*bcd*	88.99 ± 6.53	*ab*
	F23	3.08 ± 0.38	*a*	17.41 ± 1.84	*a*	86.63 ± 1.94	*ab*
	P2	2.61 ± 0.35	*abcd*	15.03 ± 2.25	*ab*	80.96 ± 5.23	*b*

Table S3: Dry biomass and elemental contents in roots of rapeseed, for each level of fertilization (total, zero, quarter and half) and each tested PSB (control: no PSB inoculation and inoculation with C1, F23 or P2). Results are expressed as the mean value ± standard deviation. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

		Biomass (mg)		P content (mg)		N content (mg)	
P100	Ctrl	165.00 ± 29.01	*bcde*	0.62 ± 0.16	*abc*	3.46 ± 0.69	*abcd*
P0	Ctrl	85.00 ± 18.49	*de*	0.18 ± 0.04	*ef*	2.72 ± 0.65	*bcd*
	C12	122.50 ± 31.19	*cde*	0.25 ± 0.08	*def*	2.90 ± 0.68	*bcd*
	F23	87.50 ± 16.52	*de*	0.18 ± 0.05	*ef*	2.17 ± 0.36	*bcd*
	P2	82.50 ± 12.50	*de*	0.18 ± 0.04	*ef*	1.96 ± 0.21	*cd*
P25	Ctrl	162.50 ± 53.60	*bcde*	0.37 ± 0.12	*cdef*	3.58 ± 0.93	*abcd*
	C12	200.00 ± 65.45	*abc*	0.47 ± 0.16	*bcde*	3.90 ± 1.16	*abc*
	F23	155.00 ± 20.21	*bcde*	0.38 ± 0.05	*cdef*	3.07 ± 0.18	*bcd*
	P2	65.00 ± 15.55	*e*	0.14 ± 0.03	*f*	1.75 ± 0.38	*d*
P50	Ctrl	177.50 ± 30.38	*bcd*	0.50 ± 0.13	*bcd*	3.98 ± 0.56	*ab*
	C12	85.00 ± 15.55	*de*	0.19 ± 0.03	*def*	2.16 ± 0.31	*bcd*
	F23	302.50 ± 51.70	*a*	0.87 ± 0.02	*ab*	5.33 ± 0.81	*a*
	P2	247.50 ± 52.18	*ab*	0.74 ± 0.18	*ab*	5.03 ± 1.01	*a*

Table S4: Enzymatic activities in soils linked to N and P cycles realized on four replicates. Enzymatic profiles are calculated as the geometric mean of enzymatic activities (mean ± standard deviation). Letters indicate significant differences for each tested enzyme, ds = dry soil. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

		Urease [Mmol NH_4/min /g ds]		Arylamidase [nmol B-Naph/ min/g ds]		Phosphatase [PNP/ min/g ds]		Acid Phosphatase [PNP/ min/g ds]		Alkaline Phosphatase [PNP/ min/g ds]		Enzymatic profile	
P100	Ctrl	0.14 ± 0.06	*b*	2.00 ± 0.27	*b*	49.37 ± 0.39	*ac*	45.41 ± 2.02	*a*	101.74 ± 10.11	*ab*	9.06 ± 1.2	*b*
P0	Ctrl	0.03 ± 0.03	*c*	2.28 ± 0.44	*b*	55.10 ± 1.25	*ce*	48.39 ± 3.41	*a*	107.12 ± 5.32	*ab*	17.7 ± 10.8	*a*
	C12	0.15 ± 0.02	*ab*	3.41 ± 0.53	*a*	52.55 ± 4.46	*bc*	50.26 ± 5.13	*a*	107.84 ± 6.70	*ab*	10.7 ± 0.17	*ab*
	Fc23	0.13 ± 0.03	*ab*	3.58 ± 0.66	*a*	49.82 ± 1.87	*ac*	46.25 ± 2.19	*a*	102.82 ± 5.76	*ab*	10.1 ± 0.32	*ab*
	P2	0.15 ± 0.04	*b*	4.17 ± 0.43	*a*	52.97 ± 2.93	*bc*	49.53 ± 6.32	*a*	109.78 ± 5.04	*b*	11.2 ± 0.56	*ab*
P25	Ctrl	0.11 ± 0.01	*ab*	3.86 ± 0.62	*a*	52.09 ± 1.09	*ac*	46.82 ± 2.20	*a*	106.51 ± 6.18	*ab*	15.8 ± 11.3	*ab*
	C12	0.16 ± 0.07	*a*	4.05 ± 0.09	*a*	51.97 ± 3.73	*ac*	46.72 ± 2.24	*a*	113.54 ± 2.84	*b*	11.1 ± 0.75	*ab*
	Fc23	0.13 ± 0.01	*ab*	3.59 ± 0.33	*a*	47.96 ± 2.90	*ab*	44.04 ± 2.87	*a*	105.04 ± 4.30	*ab*	15.1 ± 10.4	*ab*
	P2	0.10 ± 0.06	*b*	4.19 ± 0.41	*a*	47.08 ± 0.84	*ab*	45.18 ± 1.01	*a*	109.66 ± 8.49	*b*	9.31 ± 2.34	*b*
P50	Ctrl	0.13 ± 0.06	*ab*	3.43 ± 0.53	*a*	48.86 ± 1.64	*ab*	46.52 ± 1.34	*a*	93.84 ± 5.77	*a*	14.3 ± 8.95	*ab*
	C12	0.11 ± 0.01	*ab*	3.94 ± 0.24	*a*	46.46 ± 2.91	*a*	41.83 ± 3.16	*a*	99.86 ± 4.61	*ab*	10.3 ± 1.52	*ab*
	Fc23	0.16 ± 0.03	*b*	4.38 ± 0.34	*a*	49.33 ± 2.01	*ac*	47.86 ± 4.25	*a*	109.99 ± 3.93	*b*	11.1 ± 0.75	*ab*
	P2	0.13 ± 0.05	*ab*	4.06 ± 0.26	*a*	50.03 ± 0.71	*ac*	45.42 ± 6.21	*a*	114.22 ± 4.93	*b*	9.23 ± 2.48	*b*

Table S5: Microbial abundance of sampled soils obtained by real-time PCR targeted 16S and 18S rDNA genes, according to the fertilization treatments and PSB inoculation. Results are expressed as mean ± standard deviation of four replicates. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

		Bacterial abundance (16S copies / g dry soil)		Fungal abundance (18S copies / g dry soil)		16S : 18 S ratio	
P100	Ctrl	1.64E+08 ± 6.45E+07	*a*	1.05E+06 ± 4.57E+05	*ab*	164.38 ± 65.14	a
P0	Ctrl	1.39E+08 ± 3.62E+07	*a*	1.90E+06 ± 5.14E+05	*abc*	85.06 ± 24.72	bc
	C12	1.19E+08 ± 5.10E+07	*a*	1.40E+06 ± 5.79E+06	*ab*	91.51 ± 8.64	bc
	F23	1.26E+08 ± 1.91E+07	*a*	1.04E+06 ± 2.10E+05	*b*	123.68 ± 22.16	ab
	P2	1.17E+08 ± 8.42E+07	*a*	1.65E+06 ± 3.34E+05	*a*	94.90 ± 28.05	bc
P25	Ctrl	2.49E+08 ± 1.88E+08	*a*	1.77E+06 ± 1.02E+06	*abc*	109.24 ± 25.95	abc
	C12	2.10E+08 ± 2.59E+08	*a*	3.02E+06 ± 3.13E+06	*abc*	61.17 ± 54.60	bc
	F23	1.64E+08 ± 1.30E+08	*a*	1.42E+06 ± 6.73E+05	*ab*	110.68 ± 72.26	abc
	P2	3.83E+08 ± 3.87E+08	*a*	3.46E+06 ± 8.72E+05	*c*	57.96 ± 21.77	c
P50	Ctrl	1.62E+08 ± 1.65E+08	*a*	2.13E+06 ± 1.01E+06	*abc*	90.22 ± 16.48	bc
	C12	1.39E+08 ± 2.90E+07	*a*	1.83E+06 ± 6.53E+05	*abc*	84.19 ± 33.21	bc
	F23	1.72E+08 ± 8.58E+07	*a*	1.69E+06 ± 4.20E+05	*ab*	103.82 ± 44.37	bc
	P2	1.60E+08 ± 5.44E+07	*a*	2.47E+06 ± 1.30E+06	*a*	56.74 ± 12.87	c

Table S6: Number of bacterial and fungal sequences in the sampled soils, obtained by Illumina sequencing and after bioinformatics filtration. Results are expressed as mean ± standard deviation of four replicates.

		Bacterial high-quality sequences	Bacterial OTUs	Fungal high-quality sequences	Fungal OTUs
P100		77 494.25 ± 14 750.98	270.00 ± 0.50	24 748.25 ± 6 142.29	116.00 ± 3.86
P0	Ctrl	91 016.25 ± 7 861.78	270.00 ± 0.50	42 539.00 ± 10 079.94	120.00 ± 2.52
	F23	99 243.25 ± 10 197.90	270.00 ± 0.50	40 074.50 ± 20 873.12	118.00 ± 2.71
P25	Ctrl	71 108.25 ± 11 608.10	270.00 ± 0.50	12 671.75 ± 7 948.08	109.00 ± 21.70
	F23	99 710.00 ± 20 760.55	270.00 ± 0.50	25 160.75 ± 6 613.34	118.00 ± 3.11
P50	Ctrl	80 106.00 ± 25 204.59	271.00 ± 0.58	15 334.00 ± 9 629.58	113.00 ± 9.83
	F23	81 566.00 ± 9 699.39	270.00 ± 0.50	20 667.25 ± 1 785.96	118.00 ± 2.58

Table S7: Diversity indices calculated from OUT abundance obtained by Illumina sequencing in four replicates of sampled soils. Shannon index indicates specific diversity, Pielou index indicates the evenness and richness represents the total numbers of OTUs. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

		P0		P100		P50		P25	
		Ctrl	F23	Ctrl	Ctrl	F23	Ctrl	F23	
		(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	
Bacterial communities	Shannon Index	4.41 ± 0.02 *ab*	4.43 ± 0.03 *a*	4.41 ± 0.02 *ab*	4.36 ± 0.06 *c*	4.44 ± 0.04 *a*	4.37 ± 0.04 *bc*	4.42 ± 0.03	
	Richness	270 ± 0.5 *a*	270 ± 0.5 *a*	270 ± 0.5 *a*	271 ± 0.58 *a*	270 ± 0.5 *a*	270 ± 0.5 *a*	270 ± 0.5	
	Pielou Index	0.7 ± 0.00 *ab*	0.7 ± 0 *a*	0.7 ± 0 *ab*	0.69 ± 0.01 *c*	0.71 ± 0.01 *a*	0.7 ± 0.01 *bc*	0.7 ± 0	
Fungal communities	Shannon Index	3.37 ± 0.01 *ab*	3.43 ± 0.05 *ab*	3.46 ± 0.09 *ab*	3.43 ± 0.14 *ab*	3.28 ± 0.26 *b*	3.51 ± 0.05 *a*	3.43 ± 0.1	
	Richness	120 ± 2.52 *a*	118 ± 2.71 *a*	116 ± 3.86 *a*	113 ± 9.83 *a*	118 ± 2.58 *a*	109 ± 21.7 *a*	118 ± 3.11	
	Pielou Index	0.62 ± 0 *ab*	0.63 ± 0.01 *ab*	0.64 ± 0.02 *ab*	0.63 ± 0.04 *ab*	0.6 ± 0.05 *b*	0.65 ± 0.03 *a*	0.63 ± 0.02	

Table S8: Bacterial phyla relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

	P0		P100		P50		P25	
	Ctrl	F23	Ctrl	Ctrl	F23	Ctrl	F23	
	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	(mean ± sd)	
Acidobacteria	28.4± 0.78 *bc*	27.6± 1.06 *c*	28.7± 0.35 *abc*	29.3± 0.44 *ab*	27.7± 0.88 *c*	29.5± 0.83 *a*	28± 0.63 *c*	
Actinobacteria	21.2± 0.94 *b*	22.5± 0.91 *ab*	21.8± 0.91 *ab*	22.2± 1.54 *ab*	23.1± 0.61 *a*	22.4± 0.56 *ab*	23± 1.14 *a*	
Armatimonadetes	0.19± 0.01 *b*	0.18± 0.02 *ab*	0.2± 0.02 *ab*	0.18± 0.01 *ab*	0.2± 0.03 *a*	0.2± 0.02 *ab*	0.19± 0.02 *a*	
Bacteroidetes	3.85± 0.13 *ab*	3.83± 0.18 *ab*	4.03± 0.29 *ab*	3.57± 0.39 *b*	4.06± 0.16 *a*	3.74± 0.27 *ab*	3.7± 0.4 *ab*	
BRC1	0.12± 0.01 *ab*	0.11± 0.01 *ab*	0.11± 0.01 *ab*	0.11± 0.02 *ab*	0.13± 0.02 *a*	0.1± 0.02 *b*	0.12± 0.02 *ab*	
candidate_division_WPS_1	0.82± 0.05 *a*	0.76± 0.03 *a*	0.76± 0.1 *a*	0.79± 0.11 *a*	0.76± 0.04 *a*	0.73± 0.05 *a*	0.74± 0.02 *a*	
Chloroflexi	0.44± 0.11 *a*	0.38± 0.02 *ab*	0.4± 0.04 *ab*	0.35± 0.05 *b*	0.39± 0.05 *ab*	0.4± 0.03 *ab*	0.39± 0.01 *ab*	
Cyanobacteria/ChlorP0last	0.24± 0.16 *a*	0.12± 0.04 *a*	0.16± 0.05 *a*	0.11± 0.03 *a*	0.18± 0.04 *a*	0.24± 0.07 *a*	0.18± 0.17 *a*	
Firmicutes	0.44± 0.03 *ab*	0.42± 0.03 *b*	0.46± 0.04 *ab*	0.45± 0.05 *ab*	0.49± 0.05 *a*	0.48± 0.03 *a*	0.42± 0.02 *b*	
Gemmatimonadetes	3.76± 0.14 *bcd*	4.07± 0.21 *a*	3.57± 0.17 *d*	4.01± 0.37 *ab*	3.94± 0.11 *abc*	3.65± 0.15 *cd*	4.22± 0.12 *a*	
Latescibacteria	1.01± 0.04 *a*	1.03± 0.13 *a*	0.98± 0.05 *a*	1.02± 0.08 *a*	1.03± 0.07 *a*	0.99± 0.09 *a*	1.06± 0.03 *a*	
Nitrospirae	0.84± 0.09 *bc*	1.02± 0.1 *a*	0.82± 0.14 *c*	1.01± 0.17 *ab*	0.96± 0.09 *abc*	1.02± 0.14 *ab*	1.06± 0.08 *a*	
Planctomycetes	0.7± 0.05 *a*	0.66± 0.02 *ab*	0.69± 0.05 *a*	0.66± 0.12 *ab*	0.65± 0.02 *ab*	0.6± 0.02 *b*	0.64± 0.03 *ab*	
Proteobacteria	34.3± 0.75 *ab*	33.6± 0.51 *ab*	33.5± 0.63 *ab*	32.3± 2.07 *b*	32.8± 0.73 *ab*	32.2± 0.64 *b*	32.7± 1.38 *ab*	
Verrucomicrobia	3.8± 0.26 *ab*	3.74± 0.21 *ab*	3.8± 0.17 *ab*	4.01± 0.4 *a*	3.68± 0.12 *b*	3.75± 0.03 *ab*	3.65± 0.17 *b*	

Table S9: Bacterial genera relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the different treatments are showed here. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

	P0				P100				P50				P25			
	Ctrl		F23		Ctrl		Ctrl		F23		Ctrl		F23			
	(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)			
Sphingomonas	4.82 ± 0.61	*a*	3.44 ± 0.07	*cd*	3.68 ± 0.23	*c*	4.15 ± 0.26	*b*	3.33 ± 0.10	*cd*	3.45 ± 0.32	*cd*	3.05 ± 0.29	*d*
Gemmatimonas	3.76 ± 0.14	*bcd*	4.07 ± 0.21	*a*	3.57 ± 0.17	*d*	4.01 ± 0.37	*ab*	3.94 ± 0.11	*abc*	3.65 ± 0.15	*cd*	4.22 ± 0.12	*a*
Ramlibacter	0.23 ± 0.02	*ab*	0.23 ± 0.02	*ab*	0.27 ± 0.03	*a*	0.19 ± 0.07	*b*	0.26 ± 0.00	*a*	0.20 ± 0.02	*b*	0.20 ± 0.03	*b*
Gp6	17.86 ± 0.54	*ab*	16.74 ± 1.20	*b*	18.16 ± 0.50	*ab*	19.02 ± 1.66	*a*	16.79 ± 1.15	*b*	18.99 ± 0.84	*a*	17.09 ± 0.51	*b*
Ferruginibacter	0.19 ± 0.01	*a*	0.15 ± 0.02	*bc*	0.19 ± 0.01	*a*	0.17 ± 0.03	*ab*	0.15 ± 0.01	*bc*	0.17 ± 0.03	*ab*	0.13 ± 0.02	*c*
Methyloversatilis	0.12 ± 0.01	*bcd*	0.14 ± 0.01	*ab*	0.15 ± 0.02	*a*	0.11 ± 0.01	*c*	0.11 ± 0.01	*c*	0.11 ± 0.03	*c*	0.15 ± 0.00	*a*
Lysobacter	2.61 ± 0.16	*a*	2.24 ± 0.15	*b*	2.12 ± 0.36	*bc*	2.33 ± 0.08	*ab*	1.87 ± 0.16	*c*	2.06 ± 0.30	*bc*	1.89 ± 0.30	*c*
Dokdonella	0.05 ± 0.01	*ab*	0.05 ± 0.00	*ab*	0.05 ± 0.01	*ab*	0.03 ± 0.01	*c*	0.04 ± 0.00	*abc*	0.04 ± 0.01	*bc*	0.06 ± 0.02	*a*
Sphingosinicella	0.24 ± 0.03	*a*	0.16 ± 0.01	*c*	0.21 ± 0.03	*ab*	0.19 ± 0.04	*bc*	0.16 ± 0.02	*c*	0.16 ± 0.02	*c*	0.16 ± 0.01	*c*
Thermodesulforhabdus	0.04 ± 0.01	*c*	0.07 ± 0.02	*a*	0.05 ± 0.01	*bc*	0.05 ± 0.01	*bc*	0.05 ± 0.01	*bc*	0.04 ± 0.01	*c*	0.06 ± 0.01	*ab*
Bradyrhizobium	0.56 ± 0.06	*bcd*	0.58 ± 0.04	*abc*	0.64 ± 0.08	*a*	0.51 ± 0.04	*c*	0.60 ± 0.05	*abc*	0.55 ± 0.01	*bc*	0.64 ± 0.05	*a*
Ilumatobacter	1.25 ± 0.04	*c*	1.33 ± 0.03	*abc*	1.26 ± 0.05	*bc*	1.36 ± 0.05	*a*	1.38 ± 0.04	*a*	1.35 ± 0.08	*ab*	1.38 ± 0.11	*a*
Thermomonas	2.07 ± 0.10	*a*	1.75 ± 0.11	*bc*	1.73 ± 0.16	*bc*	1.87 ± 0.20	*ab*	1.61 ± 0.19	*c*	1.59 ± 0.09	*c*	1.58 ± 0.28	*c*
Angiococcus	0.04 ± 0.02	*ab*	0.04 ± 0.01	*b*	0.03 ± 0.01	*b*	0.05 ± 0.03	*ab*	0.06 ± 0.01	*a*	0.06 ± 0.01	*a*	0.05 ± 0.00	*ab*
Nocardioides	2.23 ± 0.18	*ab*	2.48 ± 0.17	*a*	2.16 ± 0.16	*b*	2.01 ± 0.05	*b*	2.46 ± 0.30	*a*	2.13 ± 0.22	*b*	2.26 ± 0.12	*ab*
Gp16	2.85 ± 0.11	*ab*	3.24 ± 0.16	*a*	2.87 ± 0.09	*ab*	2.71 ± 0.69	*b*	3.12 ± 0.17	*ab*	2.88 ± 0.18	*ab*	3.15 ± 0.16	*a*
Inhella	0.11 ± 0.01	*ab*	0.11 ± 0.01	*ab*	0.13 ± 0.02	*a*	0.10 ± 0.02	*b*	0.14 ± 0.02	*a*	0.11 ± 0.01	*b*	0.12 ± 0.02	*ab*
Pleomorphobacterium	0.13 ± 0.02	*abcd*	0.14 ± 0.01	*abc*	0.10 ± 0.01	*d*	0.12 ± 0.03	*bcd*	0.14 ± 0.01	*ab*	0.14 ± 0.01	*a*	0.11 ± 0.02	*cd*
Labilithrix	0.04 ± 0.01	*ab*	0.04 ± 0.02	*ab*	0.02 ± 0.01	*c*	0.04 ± 0.02	*ab*	0.05 ± 0.01	*a*	0.04 ± 0.01	*bc*	0.03 ± 0.01	*bc*
Thiobacillus	0.31 ± 0.01	*b*	0.31 ± 0.00	*b*	0.35 ± 0.05	*ab*	0.31 ± 0.02	*b*	0.36 ± 0.04	*a*	0.35 ± 0.03	*ab*	0.38 ± 0.04	*a*
Spartobacteria_genera_incertae_sedis	1.04 ± 0.07	*a*	0.85 ± 0.04	*c*	0.96 ± 0.10	*abc*	1.04 ± 0.13	*a*	0.92 ± 0.05	*bc*	0.97 ± 0.06	*ab*	0.88 ± 0.09	*bc*
Kitasatospora	0.07 ± 0.02	*abcd*	0.09 ± 0.01	*a*	0.06 ± 0.01	*bc*	0.07 ± 0.01	*abc*	0.08 ± 0.02	*ab*	0.06 ± 0.01	*c*	0.08 ± 0.01	*a*
Tepidisphaera	0.35 ± 0.04	*a*	0.33 ± 0.01	*a*	0.33 ± 0.03	*a*	0.34 ± 0.08	*a*	0.31 ± 0.02	*ab*	0.27 ± 0.01	*b*	0.31 ± 0.01	*ab*
Conexibacter	1.07 ± 0.11	*c*	1.16 ± 0.09	*abc*	1.15 ± 0.07	*bc*	1.14 ± 0.16	*bc*	1.20 ± 0.06	*abc*	1.29 ± 0.08	*a*	1.24 ± 0.04	*ab*
Allocatelliglobosispora	0.03 ± 0.01	*b*	0.04 ± 0.00	*a*	0.03 ± 0.01	*ab*	0.05 ± 0.02	*a*	0.04 ± 0.00	*ab*	0.04 ± 0.01	*ab*	0.04 ± 0.00	*a*
Sorangium	0.02 ± 0.01	*c*	0.03 ± 0.01	*bc*	0.06 ± 0.03	*ab*	0.04 ± 0.01	*abc*	0.03 ± 0.01	*bc*	0.07 ± 0.04	*a*	0.04 ± 0.01	*bc*
Gp7	1.03 ± 0.07	*bc*	1.11 ± 0.06	*ab*	0.96 ± 0.09	*c*	1.20 ± 0.13	*a*	1.12 ± 0.05	*ab*	1.13 ± 0.10	*ab*	1.19 ± 0.12	*a*

Table S10: Fungal genera relative abundance expressed as percentages of total sequences obtained by Illumina sequencing. Only genera showing significant differences among the different treatments are showed here. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

	P0				P100				P50				P25			
	Ctrl		F23		Ctrl		Ctrl		F23		Ctrl		F23			
	(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)		(mean ± sd)			
Cladosporium	0.89 ± 0.27	*ab*	2.35 ± 2.49	*a*	1.02 ± 0.33	*ab*	1.19 ± 0.49	*ab*	0.70 ± 0.07	*b*	0.79 ± 0.19	*ab*	0.64 ± 0.18	*b*
Monodictys	0.05 ± 0.09	*ab*	0.06 ± 0.09	*b*	0.02 ± 0.04	*b*	0.20 ± 0.17	*a*	0.15 ± 0.18	*ab*	0.02 ± 0.02	*b*	0.01 ± 0.01	*b*
Myrothecium	0.04 ± 0.02	*b*	0.09 ± 0.07	*ab*	0.12 ± 0.14	*b*	0.06 ± 0.06	*b*	0.08 ± 0.05	*b*	0.03 ± 0.02	*b*	0.24 ± 0.22	*a*
Penicillium	0.79 ± 0.08	*a*	0.88 ± 0.11	*a*	0.64 ± 0.10	*ab*	0.64 ± 0.38	*ab*	0.83 ± 0.15	*a*	0.45 ± 0.22	*b*	0.45 ± 0.06	*b*
Podospora	3.07 ± 0.22	*ab*	2.90 ± 0.39	*ab*	2.60 ± 0.71	*bc*	2.59 ± 0.62	*bc*	2.39 ± 0.63	*bc*	1.68 ± 0.55	*c*	3.98 ± 1.70	*a*
Pyrenochaeta	0.16 ± 0.05	*b*	0.22 ± 0.05	*ab*	0.14 ± 0.03	*b*	0.45 ± 0.43	*a*	0.14 ± 0.01	*b*	0.25 ± 0.21	*ab*	0.21 ± 0.10	*ab*
Rhynchogastrema	0.12 ± 0.07	*bc*	0.07 ± 0.04	*bc*	0.07 ± 0.03	*c*	0.13 ± 0.01	*b*	0.24 ± 0.08	*a*	0.10 ± 0.05	*bc*	0.10 ± 0.04	*bc*
Stachybotrys	11.43 ± 2.10	*a*	11.13 ± 0.77	*a*	9.56 ± 1.31	*ab*	9.37 ± 3.55	*ab*	11.40 ± 1.68	*a*	6.79 ± 4.00	*b*	10.97 ± 1.93	*a*
Unidentified_Agaricales	0.04 ± 0.03	*b*	0.05 ± 0.01	*b*	0.06 ± 0.05	*b*	0.11 ± 0.03	*b*	0.05 ± 0.03	*b*	1.11 ± 1.18	*a*	0.08 ± 0.06	*b*
Unidentified_Pucciniomycetes	3.26 ± 3.75	*a*	2.57 ± 4.08	*b*	0.60 ± 0.42	*b*	0.36 ± 0.15	*b*	0.39 ± 0.16	*b*	2.30 ± 0.55	*ab*	0.34 ± 0.13	*b*

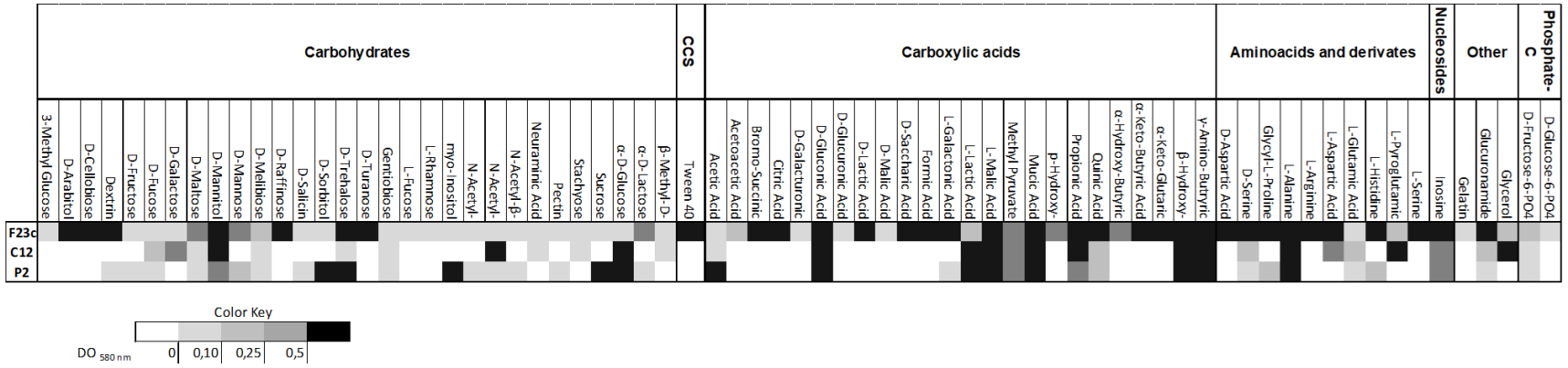


Figure S1: Biochemical potential profile of tested PSB strains regarding consumption of carbon substrates obtained by the Biolog GENIII system. Color scale indicates the optical density at 580 nm, reflecting the bacterial biomass in each well of the plate, containing a sole carbon source.

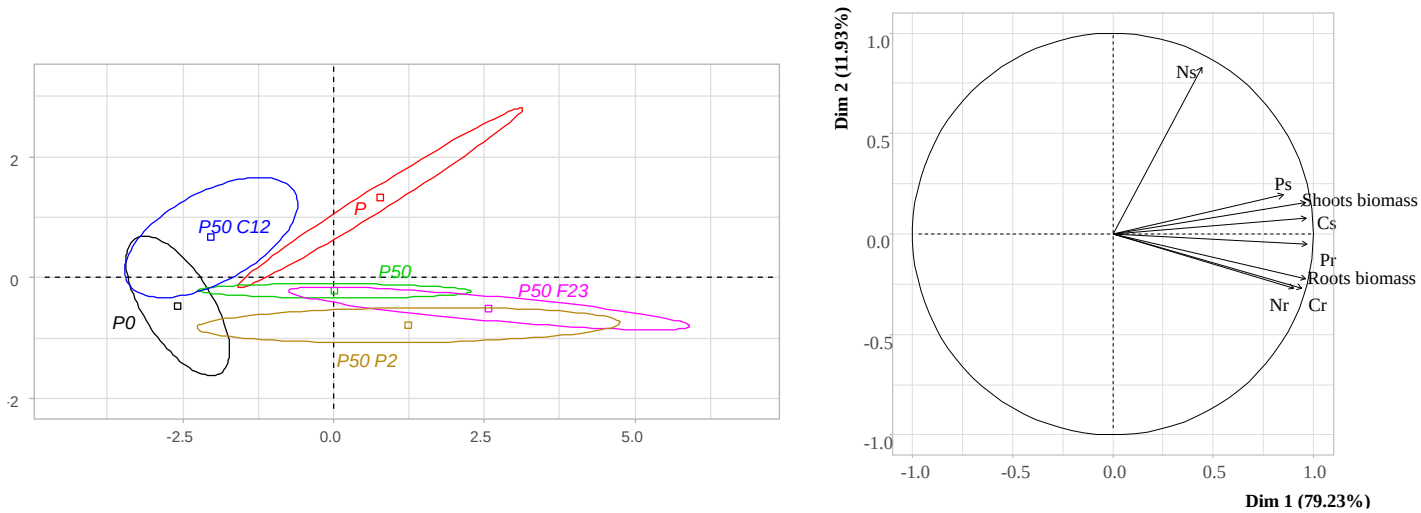


Figure S2: Principal Component Analysis of global plants profiles according to their morphometric characteristics and elemental contents obtained on four replicates. P0 = Zero P fertilization, P100 = Total P fertilization, P50 = Half fertilization. Ns = Nitrogen amount in shoots, Ps = Phosphorus amount in shoots, Cs = Carbon amount in shoots, Pr = P amount in roots, Cr = C amount in roots, Nr = N amount in roots.

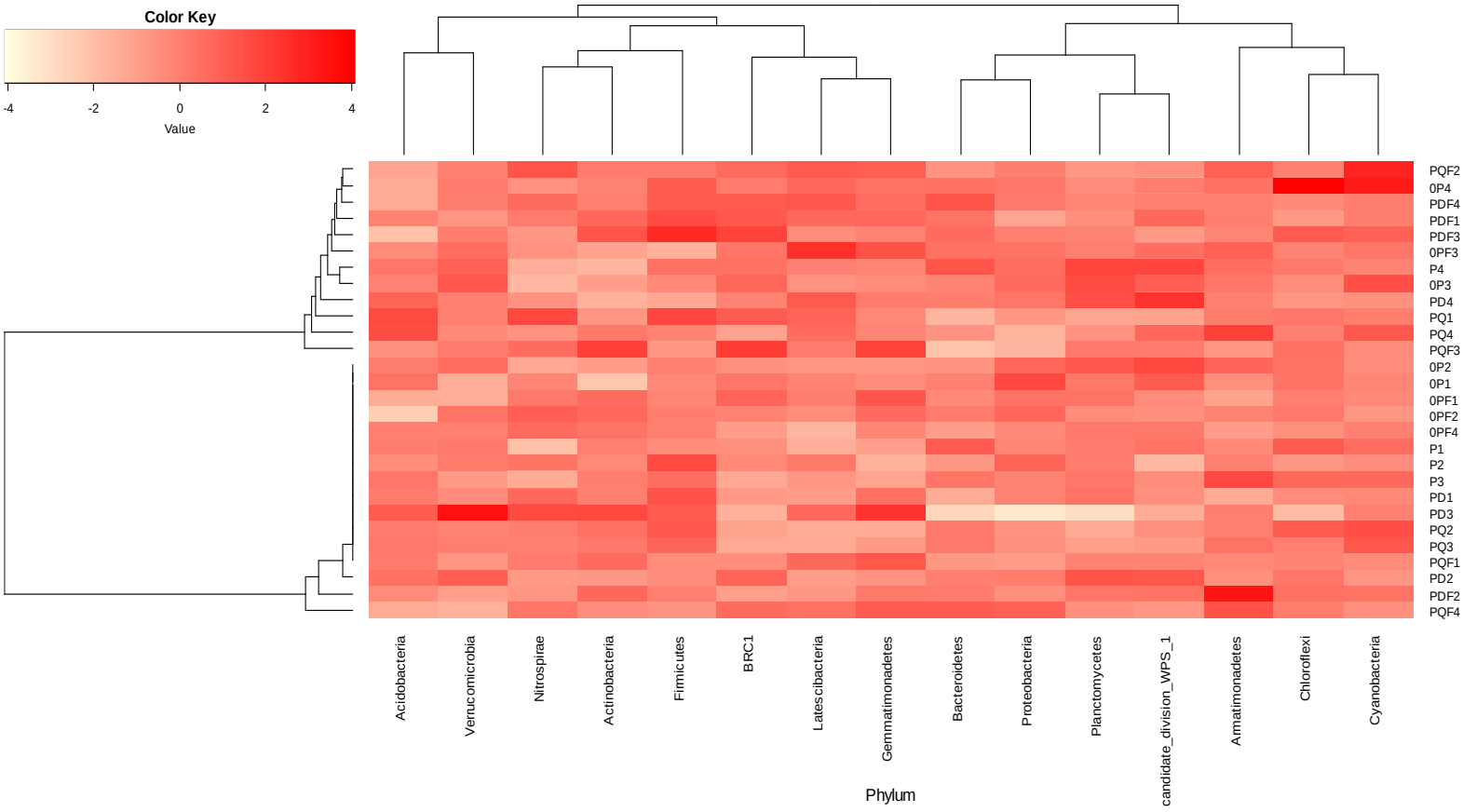


Figure S3 : Heatmap of bacterial phyla relative abundance obtained by Illumina sequencing realized on four replicates of soils samples, and performed following Z-score centered on the median.0P : No fertilization ; 0PF : no fertilization + F23 ; PQ : quarter fertilization ; PQF : quarter fertilization + F23 ; PD : half fertilization ; PDF : half fertilization + F23 ; P : total fertilization.

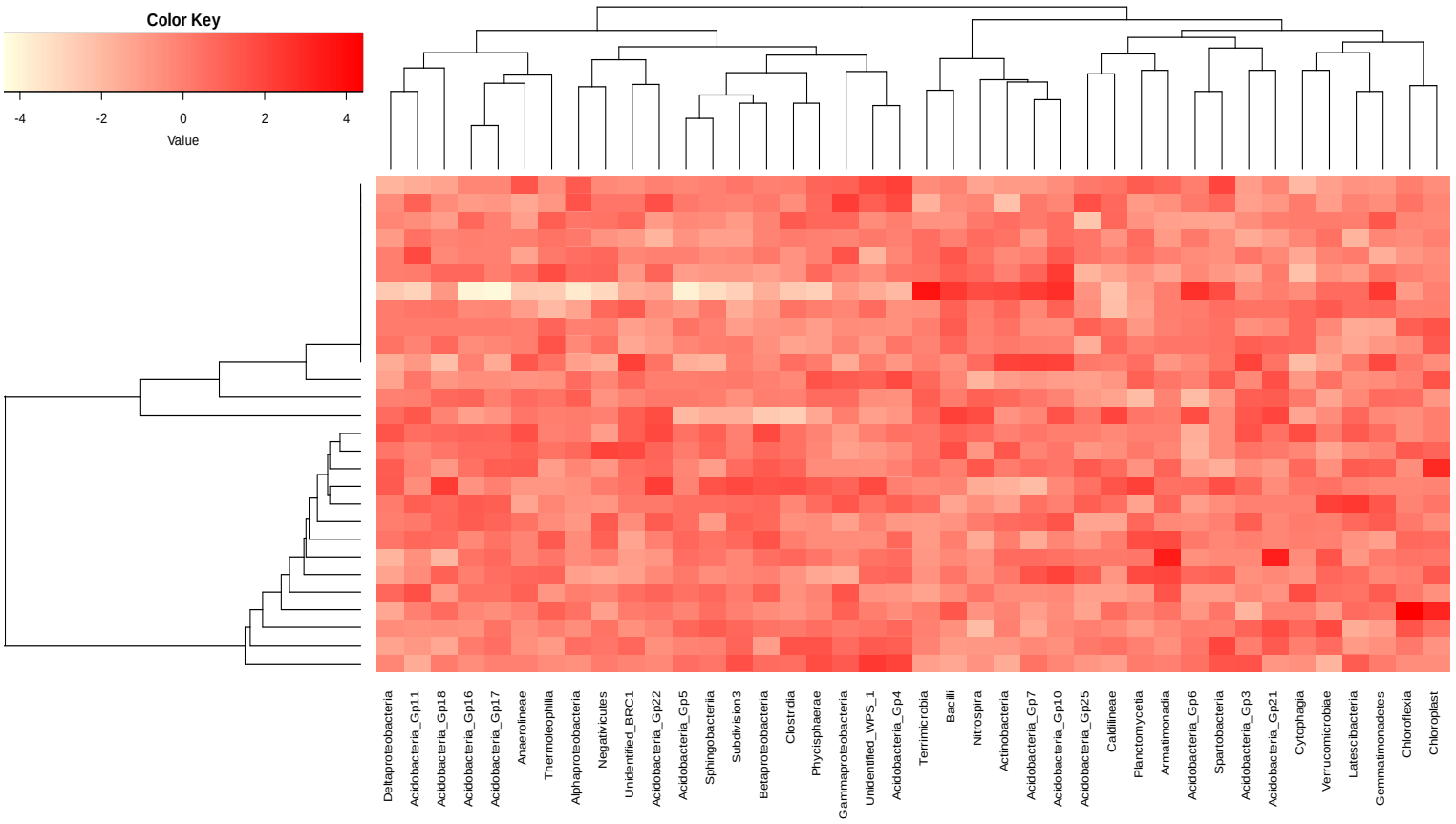


Figure S4: Heatmap of bacterial classes relative abundance obtained by Illumina sequencing realized on four replicates of soils samples, and performed following Z-score centered on the median.0P:No fertilization ; 0PF: no fertilization + F23; PQ : quarter fertilization ; PQF : quarter fertilization + F23 ; PD : half fertilization ; PDF : half fertilization + F23 ; P : total fertilization.

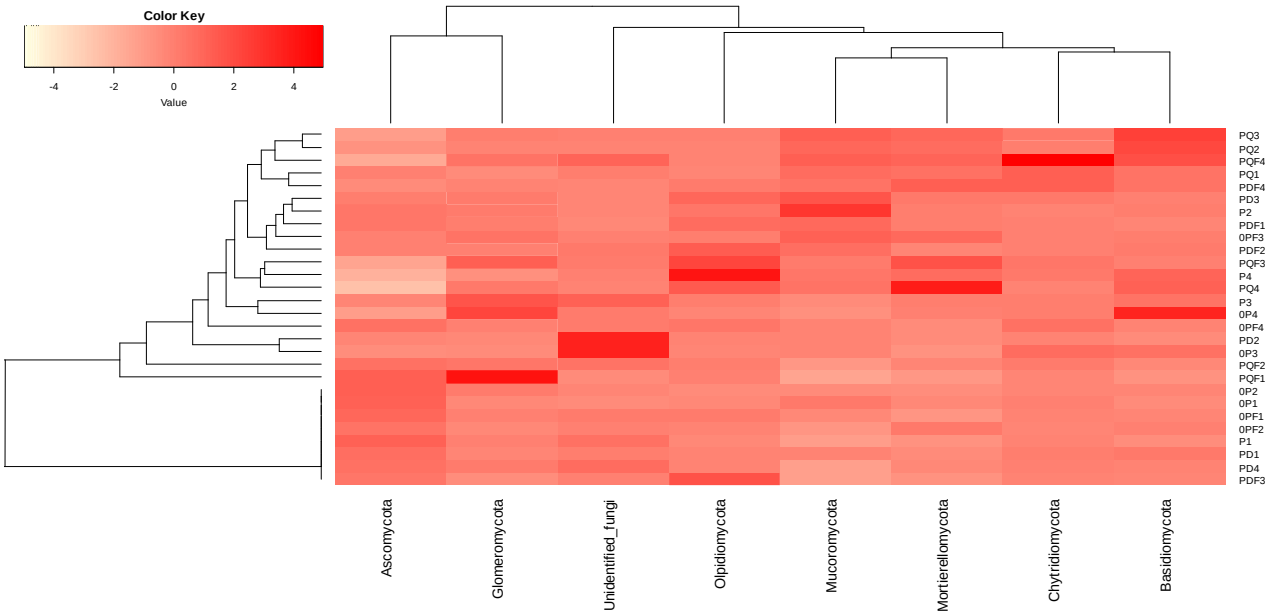


Figure S5: Heatmap of fungal phyla relative abundance obtained by Illumina sequencing realized on four replicates of soils samples, and performed following Z-score centered on the median. 0P: No fertilization; 0PF: no fertilization + F23; PQ: quarter fertilization; PQF: quarter fertilization + F23; PD: half fertilization; PDF: half fertilization + F23; P: total fertilization.

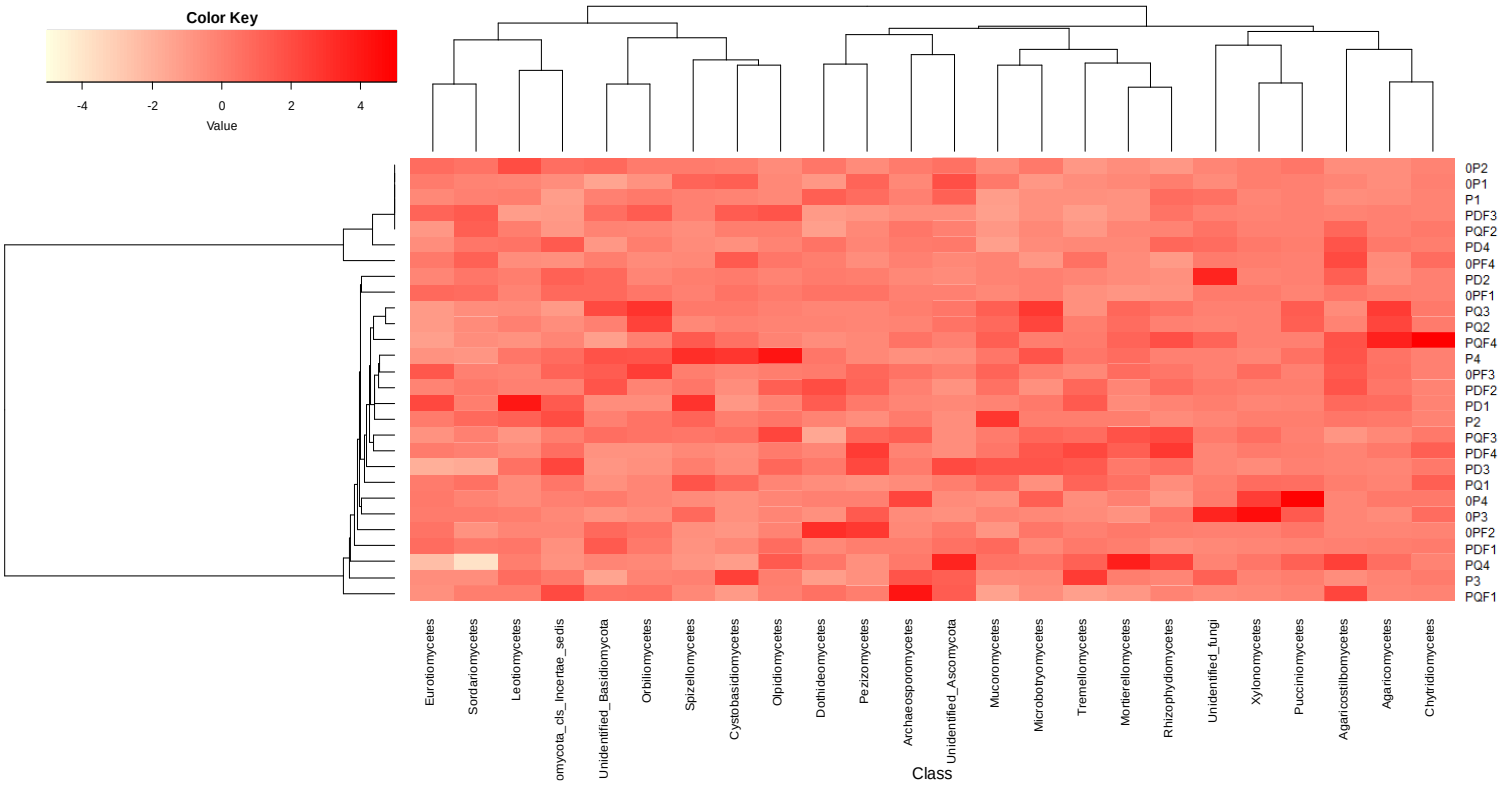


Figure S6: Heatmap of fungal Classes relative abundance obtained by Illumina sequencing realized on four replicates of soils samples, and performed following Z-score centered on the median. 0P : No fertilization ; 0PF : no fertilization + F23 ; PQ : quarter fertilization ; PQF : quarter fertilization + F23 ; PD : half fertilization ; PDF : half fertilization + F23 ; P : total fertilization

C-2 Etude de l'effet d'une souche présentant des caractéristiques PSB et PGPR sur la croissance et la composition élémentaire N et P du colza ainsi que sur ses traits racinaires, en conditions axéniques et soumises à deux ratios de fertilisation N : P.

Hypothèse : La souche ayant montré les meilleurs résultats dans l'étude précédente présente une activité PSB permettant une solubilisation de P apporté à la plante sous forme complexée. De plus, grâce à sa capacité de produire de l'auxine, la souche étudiée est aussi capable d'agir directement sur la biomasse racinaire et/ou les traits racinaires du colza.

Objectifs : Nos objectifs ici sont de confirmer les effets de la souche seule sur la croissance et l'acquisition de N et P par le colza, tout en explorant les effets potentiellement induits sur les traits racinaires, pouvant expliquer l'augmentation de la biomasse précédemment observée en sol.

Méthodologie : Une culture de colza de 10 semaines a été réalisée en serre dans des rhizotrons remplis de sable autoclavé. Les plantes ont alors reçu deux niveaux de fertilisation N (N160 et N80 correspondant à 160 et 80 mg de N par plante, respectivement) et une même quantité de P (56 mg par plante) apportée soit sous forme labile (KH_2PO_4) soit sous forme complexée (10% KH_2PO_4, 2% InsP6, 55% $Ca_3(PO_4)_2$, 23% FeP et 10% AlP) qui sera peu voire pas accessible pour la plante. A l'issue de ces 10 semaines de culture, les plantes ont été récoltées. Le système racinaire a été séparé en 2 sous-échantillons d'une part pour l'analyse élémentaire N et P et d'autre part pour l'analyse des traits racinaires en utilisant Winrhizo. Enfin, les biomasses sèches ont été déterminées.

*Principaux résultats :*Le potentiel intrinsèque de la souche F23 a pu être confirmé à nouveau *in planta* par une augmentation de la biomasse racinaire et du statut en P. En conditions de P complexé, l'application de F23 a permis la restauration d'un phénotype d'architecture racinaire comparable aux plantes ayant reçu le P sous forme labile. Néanmoins l'application d'un faible niveau de fertilisation N n'a pas permis l'expression du potentiel bénéfique de F23.

Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'article et seront prochainement soumis au journal Rhizosphere sous le titre *« Are native soil-borne Phosphate-Solubilizing Bacteria a relevant alternative to classical mineral fertilization in order to sustain plant growth ? Part III : The importance of considering the holobiont in order to optimize P and N fertilization in rapeseed".*

Regular paper

Number of Figures: 9

Title: Are native soil-borne Phosphate-Solubilizing Bacteria a relevant alternative to sustain plant growth? Part III: The importance of considering the holobiont in order to optimize P and N fertilization in rapeseed

Charlotte Amy [ab]*, Mélanie Bressan [b], Karine Laval [b], Jean-Christophe Avice [a]

[a] UMR INRA/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

*** Corresponding author:** E-mail address: charlotte.amy@unicaen.fr

Abstract: Rapeseed is a crop of major importance, characterized by appliance of large amounts of mineral fertilizers due to high nitrogen (N) and phosphorus (P) requirements. Improvement of the ecological balance of rapeseed crops using biointrants constitute a promising perspective. As bio-inoculants, Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) could (i) act on complexed-P pool in soils to increase P amount in soil solution, thus becoming available for plant nutrition, and (ii) show interesting traits of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) strains. Moreover, as the use of bio-inoculants encounters general failures when applied at field, disentangling the factors conditioning the reliability of these solutions is necessary. Because microorganisms' activities are supposed to be particularly subjected to C:N:P ratio, we hypothesize here that N fertilization level constitute a key-factor of success of PSB inoculation in early stages of rapeseed growth. In this study, F23, a promising PGPR strain belonging to *Pseudomonas* genus was inoculated on rapeseed grown in rhizotrons. F23 confirmed its PSB potential to interestingly solubilize recalcitrant P-complexed forms at the benefit of plant growth, but only when N supply is as recommended level in fields. In P-complexed environment, F23 tended to increase roots and shoots biomass, P and N contents in roots, and restored root length at a comparable level than plants fed with labile P. Conversely, a decrease in N fertilization inhibited these positive effects, except on root length. Our results highlight the importance to take into account availability of all nutrient types to ensure functioning of microbial biointrants.

Keywords: Rapeseed, PGPR, PSB, nitrogen, phosphate, fertilization

1. Introduction

Rapeseed is a major oleoproteaginous crop, worldwide spread and characterized by high phosphorus (P) and nitrogen (N) requirements (Öztürk, 2010; Rashid and Bughio, 1993) leading to the appliance of high amounts of fertilizers, often in mineral forms. These inputs are responsible of numerous environment degradation through leaching or volatilization (Grizzetti et al., 2020). Moreover, P is generally quickly complexed to soils organomineral particles after application, and so stays unavailable for plants (Helfenstein et al., 2018).

Numerous studies have focused on the use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biointrants (Kumar et al., 2012; Peix et al., 2009; Zaidi et al., 2006; Zhang et al., 2019). Among those PGPR, Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) can turn complexed P into an available form for plants in soil solution. The range of microbial strategies to access P recalcitrant forms is wide. Indeed, P can be solubilized by soil acidification through direct proton release due to NH_4 acquisition, or secretion of organic acids. P complexed to iron can be solubilized through siderophore production (Alori et al., 2017; Illmer and Schinner, 1995). Regarding this latter mechanism, bacteria aim at acquiring iron, as free iron is scarce in environment (Guerinot and Yi, 1994). Finally, organic P can also represent a variable but non neglectable proportion of total P in soils (between 20 and 80 %(Menezes-Blackburn et al., 2017). So, phosphatase and phytase activities can represent a desirable trait for efficient PSB. Independently to phosphate solubilization, other PGPR traits can also be helpful to face plant P starvation, such as enhancement of root growth. Indeed, some strains can synthetize Indole-3-acetic Acid (IAA, or auxin, key promotor of plant growth). Furthermore, some PGPR are able to degrade ACC, a precursor of ethylene (Glick et al., 2007; Spaepen et al., 2007) that is able to increase root length and allow plants to explore a higher soil volume, maximizing P prospection (Isidra-Arellano et al., 2021).

Despite this interesting arsenal to sustain plant nutrition, PGPR inoculation often encounter failures when applied in field (Basu et al., 2021). Indeed, as a prerequisite, microbial inoculants have to survive, colonize roots surface, and express their potential to actually sustain plant health and growth. Dialogue between plants and microorganisms inhabiting the rhizosphere is also primordial to act synergistically as a functional holobiont *i.e.* considering plant host and microorganism as a super-individual (Triviño and Suárez, 2020). Unravelling the factor of success to PGPR application thus represent a challenge to improve the ecological performance of rapeseed.

In this study we aimed at evaluating the proper effects of a promising PSB strain on early stages of rapeseed growth in rhizotron system, confronted to two levels of N fertilization and two forms of P (P applied in labile or complexed form). As bacteria can modulate their metabolism to nutrient availability following microbial economics (Cleveland and Liptzin, 2007), we hypothesize that N supply also plays a key-role in the expression of desirable traits of inoculated PSB.

2. Materials and methods

2.1 PSB screening and application in plants

In a previous study (Amy et al., submitted-a, Chapter IV-B), we have performed a PSB screening from soils of three crops : rapeseed, winter pea and faba bean. Several classical PSB and PGPR traits of interest were determined : solubilization on Pikovskaya and NBRIP media (Nautiyal, 1999; Pikovskaya, 1948), phytate utilization, siderophore, HCN and IAA production, ACC deaminase activity as described in Amy et al., submitted-a (Chapter IV-B). Three of these PSB strains, showing higher *in vitro* performances, were also previously tested on rapeseed growth in a first greenhouse experiment (Amy et al., submitted-b, Chapter IV-C1). Based on this previous *in planta* screening, we have selected the F23 strain, isolated from soil under the

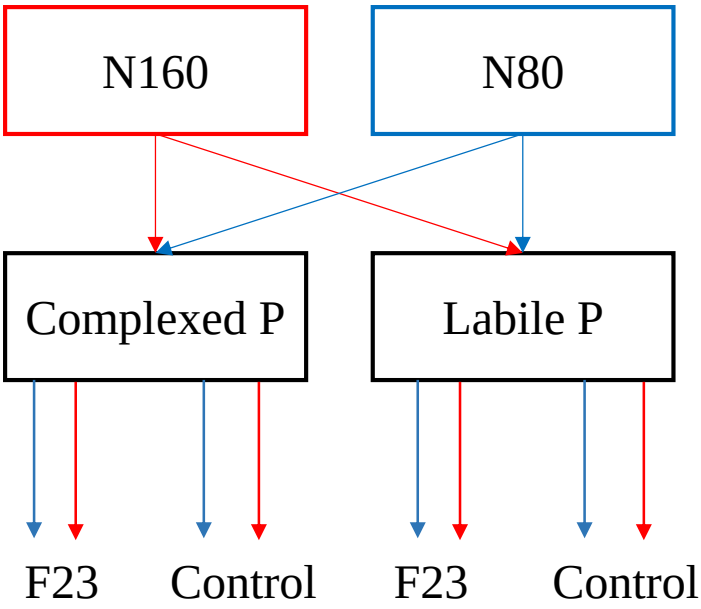


Figure 1 : Experimental design of the rhizotrons experiments. Two N fertilization levels were applied : a high (N160 : 160 mg per plant) and a lower (N80 : 80 mg per plant) N fertilization. For each N fertilization level, P (56 mg per plant) was applied in a complexed or a labile form. Every combination of N and P fertilizations was inoculated with the F23 strain or received NaCl 0.9% as control treatment.

influence of a Faba bean culture that belongs to the *Pseudomonas* genus. for further analysis of its effects on root traits and rapeseed growth in axenic conditions. For plant application, F23 was cultured 24 h at 30°C in Luria Broth. Bacterial concentration was evaluated by optical density measure at 580 nm. Bacterial culture was then centrifuged, and pellet was resuspended in NaCl 0.9 % in order to inoculate $1x10^6$ bacteria in 1 mL directly around the crown of plants. Control plants received 1 mL NaCl 0.9 %.

2.2 Greenhouse experiment

Rapeseeds (*Brassica napus* L. cv Aviso) were sown directly in rhizotrons (30 x 20 x 1 cm) filled with autoclaved sand previously sieved at 200 µm and moisturized at 10 % with distilled water. Rhizotrons were placed in bins with top apertures allowing to keep them inclined at 30°. Details about the fertilization modalities are summarized in the experimental design given in Figure 1. Plants received two different levels of NH_4NO_3: a high N fertilization (N160: 160 mg N per plant) or a limited N fertilization (N80 : 80 mg N per plant). Plants also received 56 mg of P in a labile form (LP : KH_2PO_4) or in a complexed form (CP : 10 % KH_2PO_4 , 2 % phytate, 55 % $Ca_3(PO_4)_2$, 23 % FeP and 10 % AlP). Half of plants received 1 mL of a suspension of $1x10^6$ bacteria mL^{-1} of the PSB strain F23. The control plants received 1 mL of NaCl 0.9 %. Additionally, a total of 3.6 L of modified Hoagland solution, containing neither N nor P was brought per rhizotrons in bins (0.5 mM $MgSO_4$, 0.2 mM EDTA+ 2 NaFe, 1.25 mM $CaCl_2$, 1.5 mM KCl, 14 µM H_3BO_3, 5 µM $MnSO_4$, 0.765 µM $ZnSO_4$, 0.316 µM $CuSO_4$ and 0.5 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0.1 µM $CoCl_2$). Thirty milliliters of nutritive solution were distributed from bins to the top of rhizotrons in a closed circuit three times / day. The surface of rhizotrons was covered with a strip of Whatman paper in order to ensure a homogenous horizontal distribution of the solution. Natural light was complemented, if necessary, to maintain a PAR (Photosynthetically Active Radiation) of 400 µmol s^{-1} m^{-2} at the canopy by high-pressure sodium lamps.

After 2 months of culture, plants were harvested. Aerial biomass and roots were separated. Half of the rooting system was conserved in a solution composed of 100 mL 95° ethanol, 50 mL acetic acid and 850 mL distilled water, at +4°C for further root traits analysis. Leaf area was determined using a Li-Cor3100 area meter (Li-Cor inc. Lincoln, NA, USA). Aerial parts and roots were dried in an oven at 60°C, weighed and ground using the system Retsch MM200 (Eragny sur Oise, France) to fine powder for further elemental analyses.

2.3 Elemental analyses in plants

Phosphorus content in shoots and roots was directly measured on powders using X-Ray Fluorescence (XRF, S1 Titan, Bruker, Billerica, MA, USA). To determine carbon and nitrogen content, powdered root and shoot samples were weighed, placed into tin capsules and then assayed by elemental spectroscopy (Flash*Smart* CHN, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4 Determination of root traits using Winrhizo™

Previously conserved roots were placed in transparent tanks fulled with distilled water and were disentangled before analyses. Tanks were placed in a scanner (Epson Expression 10000 XL) coupled to the WinRhizo™ software (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada) to obtain roots length, average roots diameter, roots area and roots length per volume.

2.5 Statistical analyses

All data were analyzed using Rx64 software (4.0.2 version). One-way analysis of variance (ANOVA) of the "multcomp" package was performed for every assay and plant measurements, followed by post-hoc LSD Fisher test using the function LSD.test from the R package "agricolae". Two-ways ANOVA were performed to assess effects of PSB application, N fertilization level, P fertilization form and interaction of these three parameters using aov

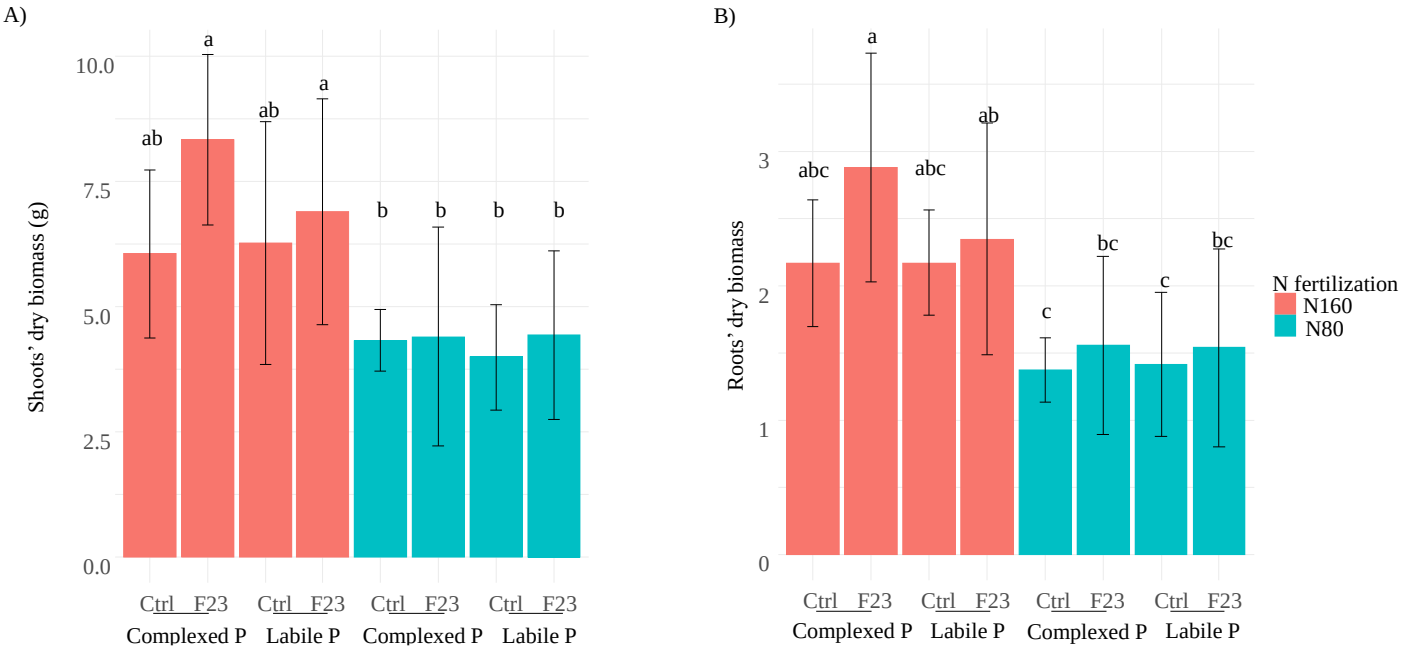


Figure 2 : Shoots (A) and roots (B) dry biomasses according to the high (N160, red) or low (N80, blue) N fertilization with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

function of the "multcomp" package. P values < 0.05 were considered as significant. Principal Component Analysis of plant profiles were obtained using the Factoshiny package. Missing data were imputed through a 2 dimensions PCA model.

3. Results

3.1 Characterization of PGPR and PSB traits of the strain F23

In vitro solubilization abilities of F23 strain (Table S1) on Pikovskaya medium showed a solubilization index (SI) at 2.3 and 1.4 on NBRIP medium. Quantification of solubilization performance were 152.1 µg P mL^{-1} in liquid Pikovskaya medium, associated to a pH at 6.7 ±0.1 and 49.3 µg P mL^{-1} in liquid NBRIP medium associated to a wide pH decrease (3.8 ± 0.2). The F23 strain was able to produce gluconic acid in both media (11.0 µmol. mL^{-1} in Pikovskaya medium and 8.3 ± 0.1 µmol. mL^{-1} in NBRIP medium). F23 was also able to solubilize phytate and showed a SI of 3.5 on PSM medium. Moreover, this strain produced siderophores on CAS medium, IAA (in average 18.8 ± 3.7 ng μL^{-1}) and showed an ACC deaminase activity. In contrast, no HCN production could be highlighted.

3.2 Morphometric traits of rapeseed plants according to N fertilization, P forms and F23 inoculation

After two months, significant differences were found regarding shoots and roots dry biomasses (Figure 2). These differences were mainly strongly influenced by N fertilization (Table S2), and despite not significant through two-ways ANOVA, tended to be reinforced by F23 inoculation. As expected, shoot dry biomass was globally lower for N80 (in average 4.29 ± 1.40 g, Figure 2-A) compared to N160. Moreover, F23 adjunction combined with N160 showed significantly higher shoot dry biomass compared to all N80 modalities, whatever the P forms of P applied (in average 7.61 ± 2.02 g). Interestingly, considering F23 addition combined with N160 treatments, shoot dry biomass tended to be higher than without F23 strain, and particularly in the case of complexed P-forms (Figure 2A). Similarly, root dry biomass was

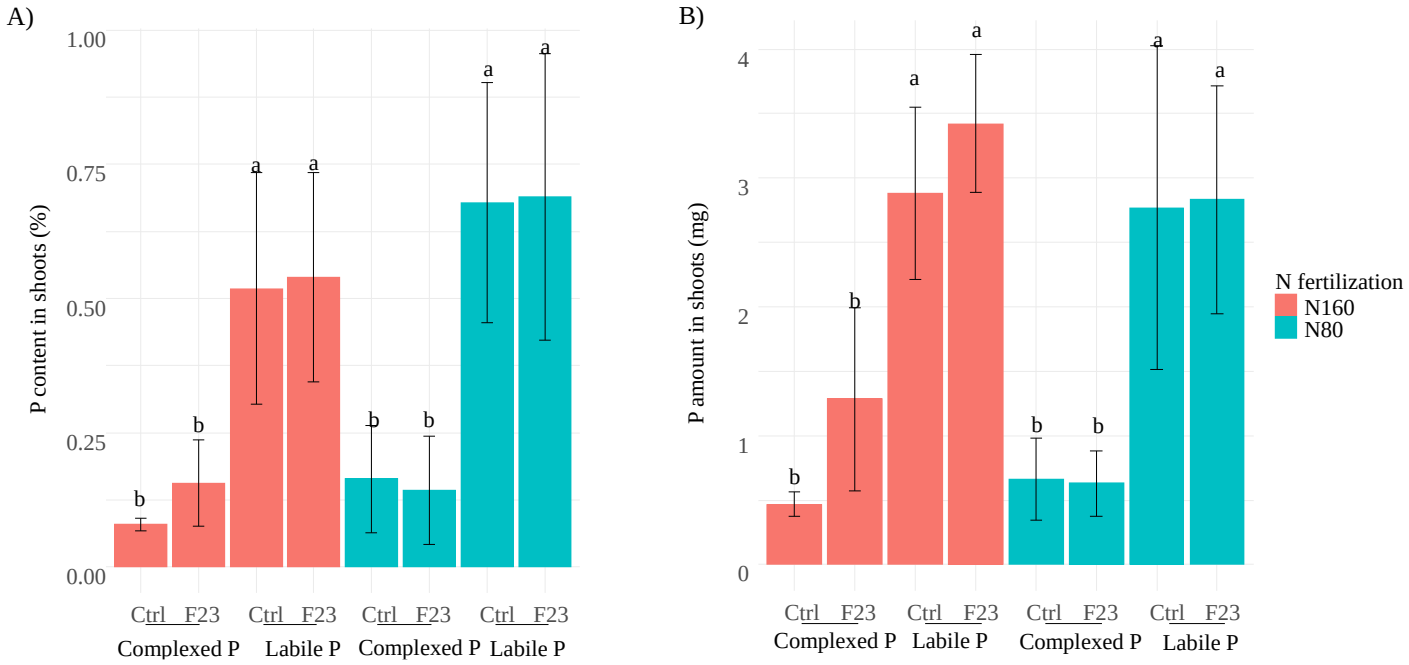


Figure 3 : Relative P content (A) and P amount (B) in shoots according to the high (N160, red) or low (N80, blue) N fertilization with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

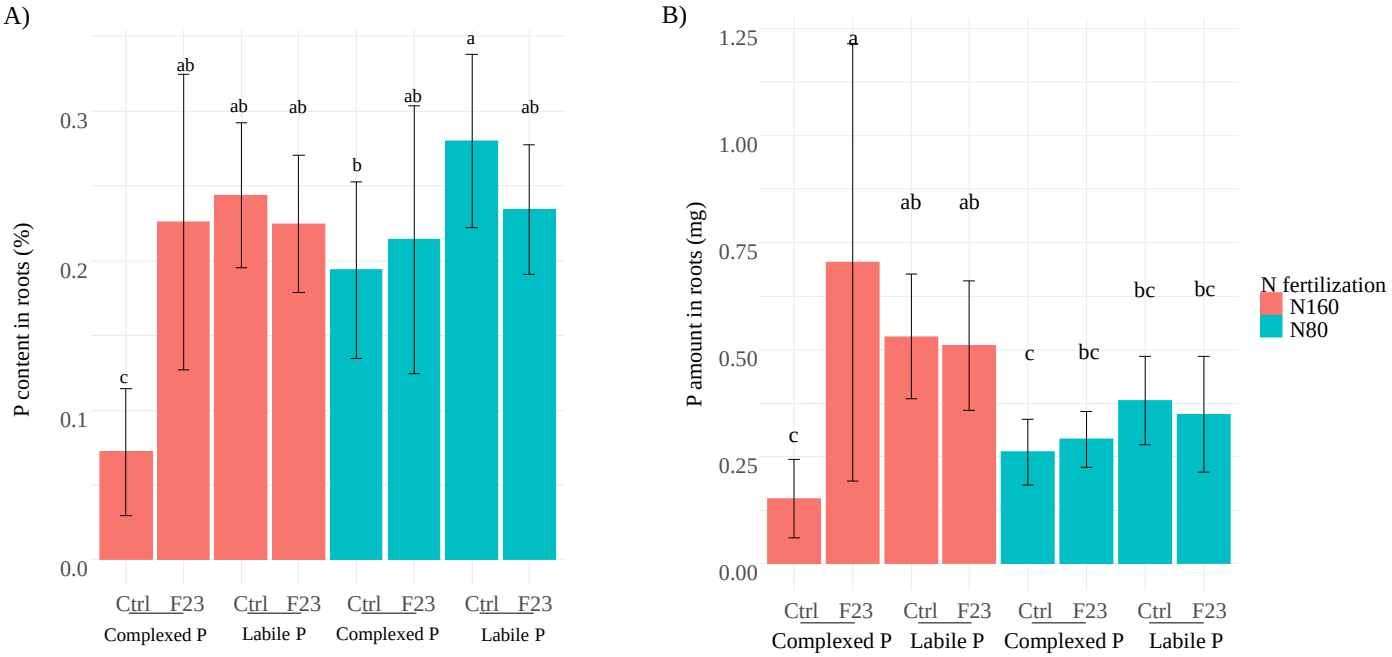


Figure 4 : Relative P content (A) and P amount (B) in roots according to the high (N160, red) or low (N80, blue) N fertilization with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

globally lower for all N80 modalities (in average 1.47 ± 0.53 g, Figure 2-B) compared to N160 modalities, particularly with F23 addition. As previously described, considering F23 application combined with N160 treatments, root dry biomass tended to be higher than without F23, and particularly when P was added in a complexed form (2.88 ± 0.85 g, Table S3) (Figure 2-B). Leaf areas were lower for N80 modalities compared to N160 (253.89 cm^2 and 418.39 cm^2 respectively, supplemental Figure S1). No difference could be observed for plants inoculated with F23 strain.

3.3 P and N status of rapeseed plants according to N fertilization, P forms and F23 inoculation

P content and amount in shoots were obviously impacted by the form of applied P (Figure 3, Table S2). P content in shoots was widely lower when P was applied in a complex form (in average 0.16 ± 0.15 %) compared to the labile P form (0.61 ± 0.22 %) (Figure 3-A). This effect was also observed even when the PSB strain is applied (Figure 3-A). In the same way, P amount in shoots was lower when P was in complexed forms (in average 0.79 ± 0.49 mg versus 2.98 ± 0.85 mg for the labile P, Figure 3-B). Nevertheless, in N160 fertilization, addition of F23 tended to promisingly increase P amount in shoots, slightly in labile P condition (2.88 ± 0.67 mg for control compared to 3.42 ± 0.54 mg with F23, Table S3) and more widely in complexed P (0.47 ± 0.10 mg for control compared to 1.28 ± 0.71 mg with F23, Table S3). No such tendencies were found for N80. Roots responded differently than shoots in their P content and amounts. As previously described in shoots, P content was mainly influenced by P form but also in interaction with PSB application and N fertilization (Table S2). The highest P content in roots was found for the control labile P + N80 (0.28 ± 0.06 %, Figure 4-A and Table S3) and the lowest one was found in plants receiving N160, combined with P in complexed form and no PSB (0.07 ± 0.04 %). Whatever the level of N fertilization and the P form, F23 application allowed plants to restore a P content in roots similar to P-labile control plants (Figure 4-A).

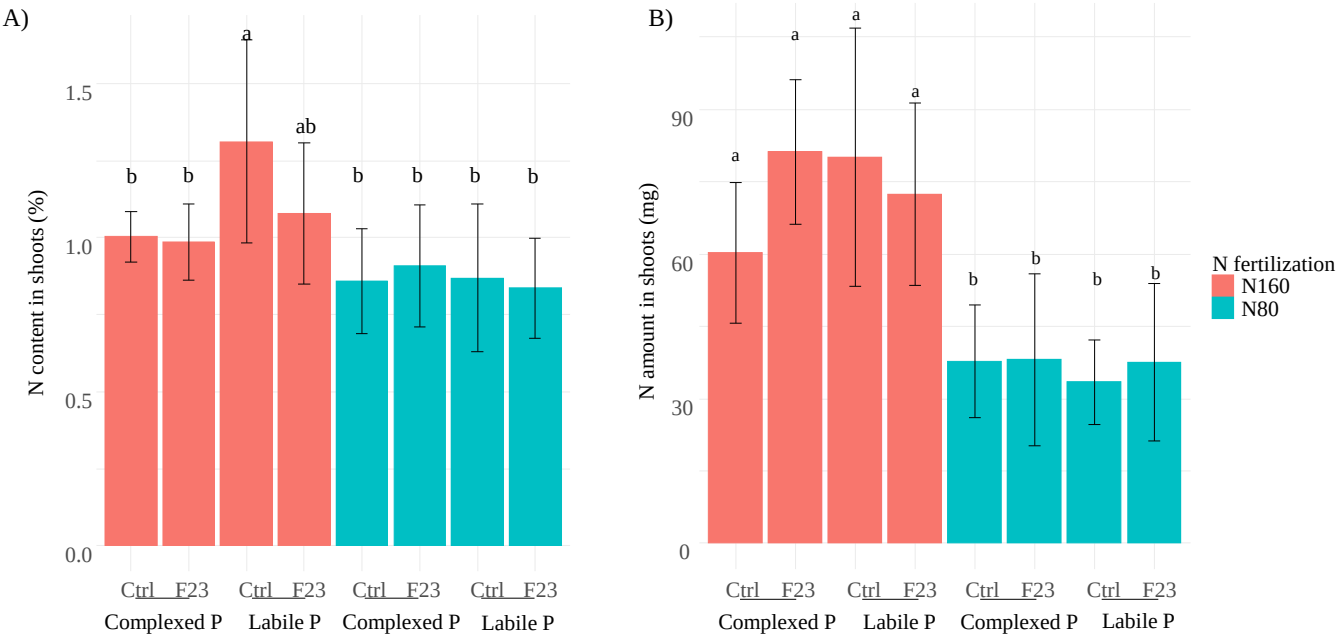


Figure 5 : Relative N content (A) and N amount (B) in shoots according to the high (N160, red) or low, (N80, blue) N fertilization with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

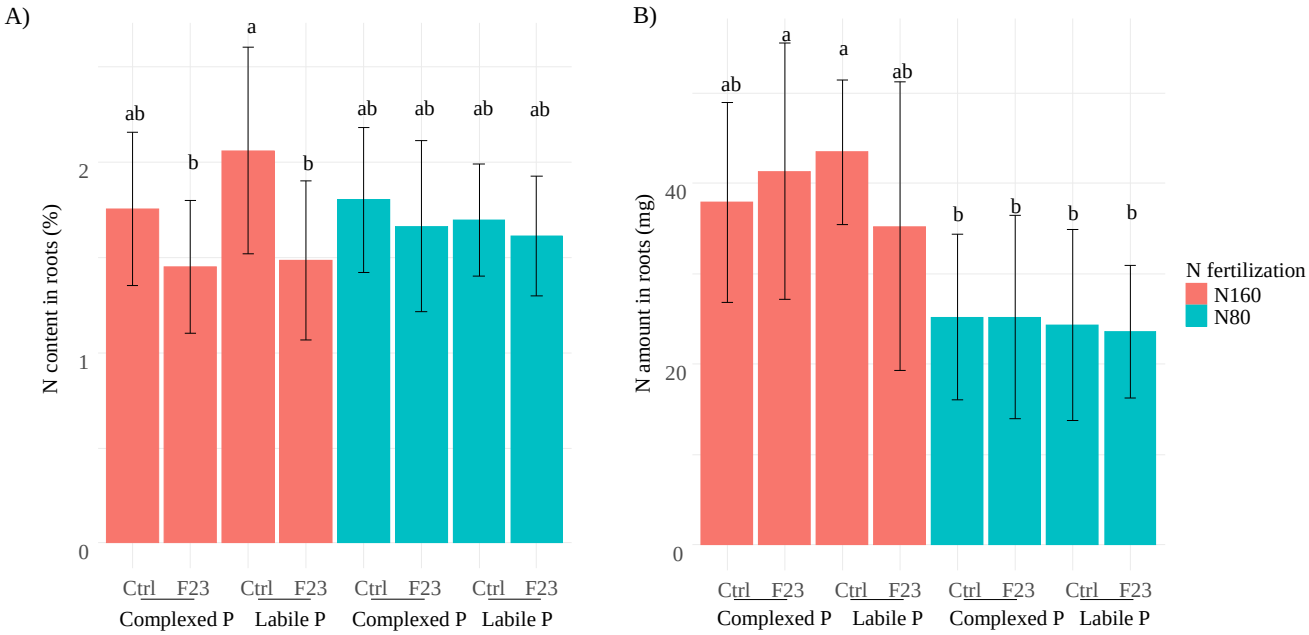


Figure 6 : Relative N content (A) and N amount (B) in roots according to the high (N160, red) or low (N80, blue) N fertilization with P fertililization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

Regarding roots P amounts, for N160 treatments, higher values were observed when P was supplied in labile form, with in average 0.52 ± 0.14 mg (Figure 4-B) compared with those observed with complexed P with no PSB inoculation (0.15 ± 0.09 mg) (Table S3). Interestingly, when plants were subjected to N160 and complexed P form, F23 adjunction increased more than 4-fold the P amount in roots compared to control and allowed to reach the same values than with labile P (in average 0.59 mg, Figure 4-B).

Relative N content in shoots was similar across all N and P fertilizations (around 0.93 ± 0.09 %), except in N160-Labile P control which shows the highest value (1.31 ± 0.33 %, Figure 5-A, Table S3). As expected, a clear effect of N fertilization level was found on N amount in shoots (Table S2). Indeed, N amount was significantly higher in N160 compared to N80 (73.48 ± 19.80 mg and 36.71 ± 13.14 mg respectively, Figure 5-B). No impact of F23 addition could be noticeably highlighted. On the contrary, N content in roots (Figure 6-A) tended to be slightly influenced by PSB application (Table S2). Indeed, in N160 modalities, F23 inoculation led to a decreased of N content compared to control treatments, and even in a significant way for labile P (control: 2.06 ± 0.54 % and F23: 1.48 ± 0.42 %). When comparing N amounts in roots, as observed in shoots, N fertilization effect was predominant (Table S2). Roots N amount was significantly higher in N160 compared to N80 (39.78 ± 12.07 mg and 24.59 ± 8.92 mg respectively, Figure 6-B).

3.4 N,P fertilization and PSB effects on rapeseed root traits

Root length was significantly influenced by PSB application (Table S2). In either N160 or N80 fertilization, PSB application led to lowered root lengths, reaching similar values than the P-labile control (Figure 7-A). In complexed P-forms without F23 inoculant, an increase of root length was observed for both N fertilization levels, (Figure 7-A, Table S4).

Roots average diameter varied according to the level of N fertilization (Table S2). Indeed, roots diameter decreased when N80 fertilization was applied (0.41 ± 0.05 mm versus 0.50 ± 0.08 mm

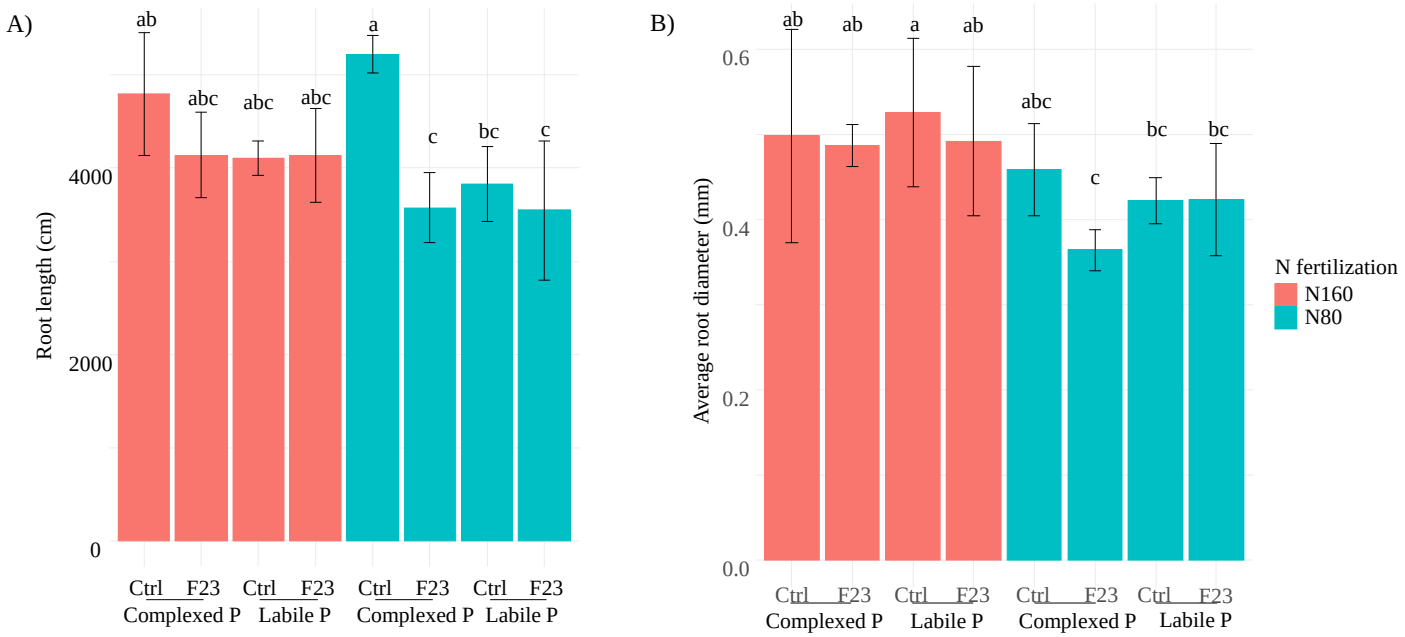


Figure 7 : Root length (A) and average root diameter (B) according to the high (N160, red) or low (N80, blue) N fertilization with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

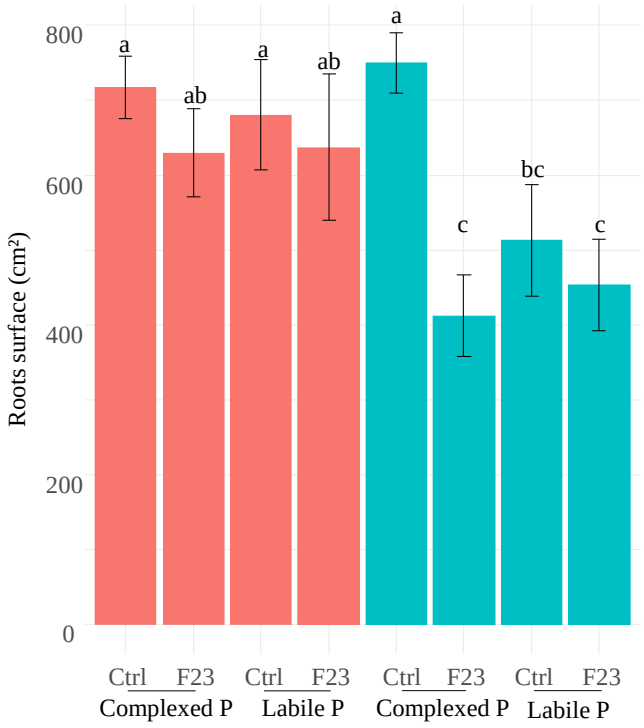


Figure 8 : Root surface according to the high (N16, red) or low (N80, blue) N fertilization with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

for N160, Figure 7-B). For N80 treatments, F23 inoculation tended to decrease roots diameter when P was supplied in a complexed form, (0.36 ± 0.02 mm) compared to other N80 treatments with labile P (0.43 mm in average).

Root area was influenced by both PSB application and N fertilization independently (Table S2). N80 fertilization decreased root area (511.00 ± 155.38 cm²) compared to N160 (670.38 ± 112.25 cm², Figure 8). For N80, F23 application significantly decreased root surface when P is in its unavailable complexed form (412.12 versus 749.73 cm² for the control), reaching a similar value as plants grown with labile P (Table S4, Figure 8).

3.5 General plants profiles

PCA of overall mentioned plant measurements (Figure 9) showed that plants grown in labile P conditions are grouped in the top of individual topology (Figure 9-A). As expected, these plants were characterized by high values in P contents and amounts in both belowground and aboveground parts. On the contrary, plants grown in complexed P conditions showed low values in these variables and were characterized by higher values in root length and area. No clear separation between controls plants and those with F23 inoculation could be found. However, interestingly, when P was supplied in complexed forms, plants tended to reach a similar profile than plants grown in labile P conditions, particularly for N160.

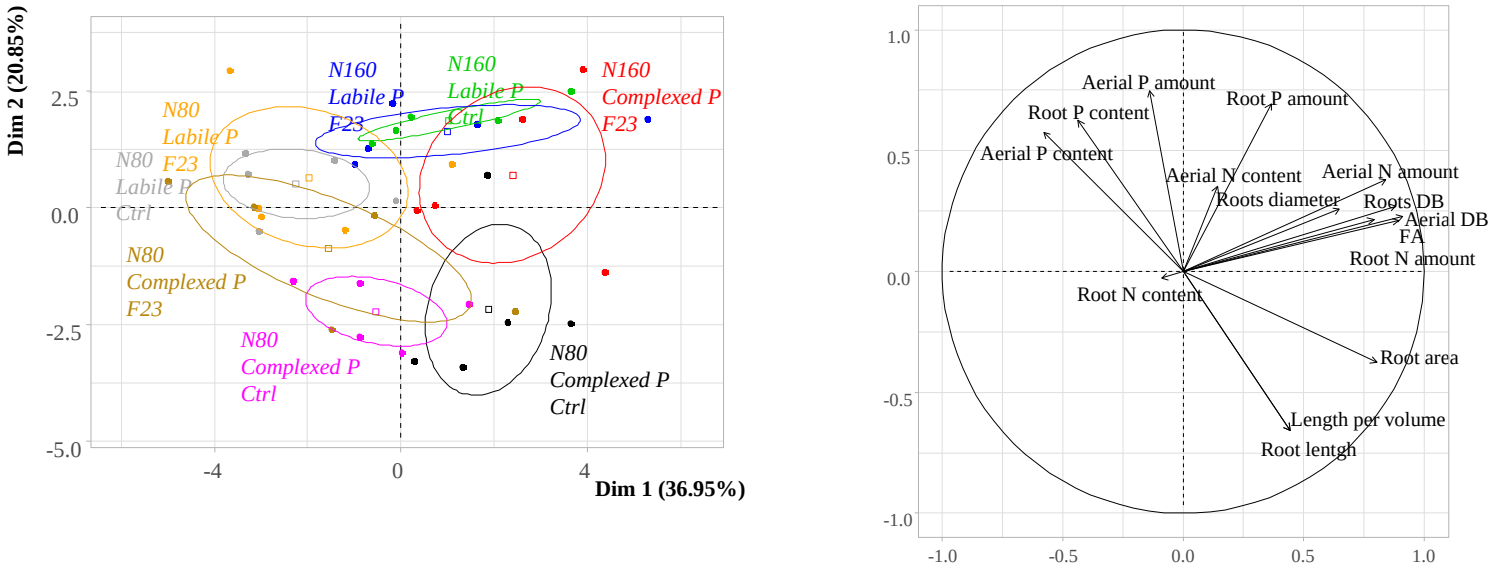


Figure 9 : Pricincipal Component Analysis of (A) plant profiles, obtained with two N fertilization levels (N160 or N80) and two P forms (labile or complexed) with PSB application (F23) or not (Ctrl : control). Dimension 1 = 36.95 %, dimension 2 = 20,85 %. (B) Correlation circle of studied variables. DB : Dry Biomass, FA : Foliar Area.

4. Discussion

4.1 Effects of PSB application on rapeseed growth and nutrient uptake

In this study, F23 inoculation confirmed its PGPR potential on rapeseed growth, and more particularly its PSB ability, by providing access to non-available phosphate to plants. Evidence of phosphate solubilization were found considering the higher P content and P amount in roots for F23 treatments compared to uninoculated control (Figure 4). Furthermore, for both level of N fertilizations, root length was reduced similarly to those obtained for labile P condition. Indeed, P starvation is known to lead to root traits remodeling, and particularly root elongation allowing the plant to prospect a wider soil volume (Dissanayaka et al., 2021). This phenotype (root elongation) was observed in both uninoculated controls when P was supplied in complexed form but returned to a phenotype closed to the one observed for roots receiving a labile P source when F23 was inoculated (Figure 4).

Regarding N uptake, the benefit of deploying F23 appeared to be more tenuous. As N content was quite similar between all modalities, the principal observed effect to explain higher N amount in presence of F23 rests a higher shoot biomass. Similarly, root biomass decreases combined with stable N amount, per level of N fertilization, led to an apparent decrease in N content with F23 inoculation. But this decrease in N content is probably only due to a dilution phenomenon and not to an adverse effect of the PSB strain or to competition for N uptake. Indirectly, by helping adequate P uptake in non-available P situation, inoculation with F23 allowed also to maintain N uptake and so the equilibrium of the ratio N:P (de Groot et al., 2003).

These overall results thus confirm the promising potential of F23 as a PGPR and more interestingly PSB strain, as previously observed in Amy et al., submitted-b (Chapter IV-C1).

These results are consistent with previous studies concerning the deployment of such microbial biointrants, on numerous plants species (Asaf et al., 2017; Islam et al., 2016; Ma et al., 2009; Makarova et al., 2016; Tajini et al., 2012; Wang et al., 2017), confirming the powerfull potential of PGPR/PSB utilization. This study also demonstrates that beneficial effects observed on plants are directly due to F23 inoculation, as rapeseed were grown in axenic conditions, and here independent of associated soil microbial community structure in soil surrounding roots.

F23 was also described as able of synthesize IAA and degrade ACC. These PGPR traits, probably expressed here, could modify IAA : ethylene ratio in favor to auxin, which sustain increase of biomass of inoculated plants. Nevertheless, this increase of biomass is neither explained by a higher number of leaves, nor by longer or thicker roots. So, besides the real direct effect of F23 strain on P uptake, a possible positive effect linked to classical PGPR traits on inherent P acquisition mechanisms could not be totally excluded. For example, plants are able to exude organic acids to access insoluble P pool or to increase phosphatase activity (Gerke, 2015; Plaxton and Tran, 2011), abilities which could be promoted through simple PGPR action.

4.2 N effects as a key factor of success of plant-PSB association

In this study, effects of N fertilization level on rapeseed growth and N uptake were observed. A decrease in N fertilization was frequently described as leading to smaller plants with lower N amounts (Christensen et al., 1985; Khan et al., 2018; Leleu et al., 2000).

Interesting results were observed regarding F23 performances to sustain growth of rapeseed. However, all positive effects on plant biomass, N and P uptake were observed only at N160 but not observed in N-deprived condition. However, F23 inoculation allowed to modify root architecture with a reduction of root diameter, length, and surface. In the same way to P starvation, N limitation leads rather to an increase of roots length, thickness and volume (Qin et al., 2019), which was mitigated here with F23 adjunction, or with labile P.

Several assumptions could be put forward to explain these differences of plant growth promotion linked to N level. Low N fertilization could have directly impeded the multiplication of F23 in culture substrate. Indeed, N limitation constitute a substantial factor that could restrict bacterial growth in soil (Aldén et al., 2001; Kamble and Bååth, 2016). Colonization of the rhizosphere by the beneficial bacterial agent constitutes a critical pre-requisite conditioning the success of biointrant inoculation (Dutta and Podile, 2010). The possible low resulting density of F23 would not lead to enough P solubilization allowing beneficial effect of plant P nutrition. Observed effect on plant growth could also result from an indirect impact on bacterial density and/or the expression of their functional PSB/ PGPR traits through the modification of rapeseed root exudation, principally carbon and nitrogen compounds. In P-complexed condition, N level appears essential for positive interaction between plant and microorganism.

Indeed, N availability could play a critical role for an efficient expression of the PGPR/PSB arsenal of F23 strain, resulting in the pursued synergy with the plant. Most of PGPR mechanisms rely on amino acids transformation and depend on N availability. More precisely, IAA can be synthetized from tryptophan or its precursors by microorganisms (Spaepen et al., 2007). Tryptophan can be exuded by plants (Badri and Vivanco, 2009) or directly synthetized by *Pseudomonas* (Crawford and Gunsalus, 1966). In the same way, pyoverdine, a common siderophore in *Pseudomonas*, is composed of a chromophore derived from 2,3 di-amino dihydroxyquinoline, on which is attached a peptidic functional group containing from 6 to 12 amino acids. In *Pseudomonas*, pyoverdin production is a multistep process implying more than 11 different proteins (Gasser et al., 2015). Finally, ACC exuded by plants in the rhizosphere is synthetized from S-adenosyl methionin (SAM) derived to methionin, a sulfur (S) amino acid (Glick et al., 2007).

As access to N is more limited in N80, its use by both plants and microorganisms could be preferentially oriented in protein synthesis, plant growth and maintenance of bacterial multiplication rather than in plant exudation and expression of PGPR traits. As exudation reflects the nutritional status of plants (Nguyen, 2003), cooperation and establishment of beneficial interaction between rapeseed and beneficial microorganisms could have been prevented in N-limiting condition. Carvalhais et al. (2011) showed a decrease in amino acids exudation in maize in N deprivation conditions. As amino acids provide a N, C and S source to microorganisms, an additional repression of PGPR / PSB traits could be due to a C allocation to growth or survival mechanisms.

Moreover, a N effect has been demonstrated on some enzymatic activities, such as phytase in lichens (Higgins and Crittenden, 2015). Authors have found a decrease in phytase activity along with N availability in these complex microorganisms, for which phytate degradation is generally attributed to the fungal part of lichens. We can hypothesize here that this result could be transposable to bacterial phytase activity. Taken together, these results highlighted the primordial role of N on the interaction between plants and bacteria. Indeed, lower N availability could have turn plant-bacteria mutualism into individual behaviors for both protagonists.

More generally, obtained results highlighted the necessity to consider the effects of fertilization practices at the field scale to ensure the success of PGPR/PSB deployment, rhizosphere colonization but also more globally on the perenity of plants-microorganisms dialogue. These observations pointed out the importance to consider crop production and so fertilization practices not just through only the classically considered plant needs but more with an holistic point of view, targeting holobiont's functioning.

For example, considering that one of the several proposed solubilization mechanism relies on proton excretion accompanying ammonia respiration of some PGPR, including *Pseudomonas* strains (Illmer and Schinner, 1995), and that rapeseed preferentially absorb nitrate (Schjoerring, 1986), the use of ammonitrate can be a relevant fertilization practice for the global holobiont.Further works are now needed to focus on the comprehension of *in-situ* mechanisms that sustain plants-microorganisms cooperation through the exploration of rapeseed exudates, by tracing F23 strain and *in situ* evaluation of relevant microbial activities, such as siderophore production or determination of phosphatase activity by zymography (Heitkötter and Marschner, 2018; Razavi et al., 2019; Spohn and Kuzyakov, 2014).

5. Conclusion

In this study, F23 strain, a previously tested PSB was inoculated on rapeseed grown in rhizotrons with contrasted N fertilization levels and P applied under labile or complexed forms. When combined with higher N fertilization level, F23 confirmed its potential as PGPR and PSB strain by enhancing biomass and root P content, combined with a return to a non-P-starved roots phenotype (*i.e.* to lower root length, similar to plants fed with labile P). Reverse results were obtained with a lower level of N fertilization. N limitation could have been a determining factor avoiding resources sharing between plants and microorganisms, and establishment of beneficial interaction. Moreover, most of PGPR traits, including auxin, siderophore productions and ACC deaminase activity are highly dependent of amino acids transformation. Similarly, phytase activity could also have been decreased in a context of N limitation. So, these results suggest that soil nutritional potential, especially the N/P balance, is a key factor for the full expression of PGPR/PSB potentialities as well as plants-microorganism beneficial cooperation.

Funding: This research was funded by the Region Normandie which supported the projects RIN EPURE (Enhancing Plant nutRition and Health), RIN Normandy Plant Technologies and the regional funding for the PhD thesis of Charlotte Amy.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support provided by the region Normandy, the University of Caen-Normandy and the SFR Normandie Végétal (FED4277). The authors want also to acknowledge the technical staff of Unilasalle, Platin' (Plateau d'Isotopie de Normandie) and UMR INRAe/UCN EVA for their help in the realization of these experiments.

References

Aldén, L., Demoling, F., Bååth, E., 2001. Rapid Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1830–1838. https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1830-1838.2001

Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Front. Microbiol. 8, 971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971

Amy, C., Avice, J.-C., Laval, K., Bressan, M., submitted. Are native soil-borne Phosphate-Solubilizing Bacteria a relevant alternative to sustain plant growth ? Part I : When screened PSB profiles met plant requirements. Rhizosphere.

Amy, C., Avice, J.-C., Laval, K., Bressan, M., submitted. Are native soil-borne phosphate-solubilizing bacteria a relevant alternative to sustain plant growth? Part II: Impact of three PSB strains on rapeseed subjected to a gradient of phosphate fertilization. Rhizosphere.

Asaf, S., Khan, A.L., Khan, M.A., Imran, Q.M., Yun, B.-W., Lee, I.-J., 2017. Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with Sphingomonas sp. LK11 and exogenous trehalose. Microbiol. Res. 205, 135–145. https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.009

Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. Plant Cell Environ. 32, 666–681. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x

Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., El Enshasy, H., 2021. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. Sustainability 13, 1140. https://doi.org/10.3390/su13031140

Carvalhais, L.C., Dennis, P.G., Fedoseyenko, D., Hajirezaei, M.-R., Borriss, R., von Wirén, N., 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. J. Plant Nutr. Soil Sci. 174, 3–11. https://doi.org/10.1002/jpln.201000085

Christensen, J.V., Hennig, A.M.F., McKenzie, J.S., Legge, W.G., DePauw, R.M., Siemens, B., Thomas, J.B., 1985. Effect of seeding date, nitrogen and phosphate fertilizer on growth,yield and quality of rapeseed in northwest alberta. Can. J. Plant Sci. 65, 275–284. https://doi.org/10.4141/cjps85-040

Cleveland, C.C., Liptzin, D., 2007. C : N : P stoichiometry in soil: is there a "Redfield ratio" for the microbial biomass? Biogeochemistry 85, 235–252. https://doi.org/10.1007/s10533-007-9132-0

Crawford, I.P., Gunsalus, I.C., 1966. Inducibility of tryptophan synthetase in Pseudomonas putida. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 56, 717–724.

de Groot, C.C., Marcelis, L.F.M., Lambers, H., 2003. Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth 12.

Dissanayaka, D.M.S.B., Ghahremani, M., Siebers, M., Wasaki, J., Plaxton, W.C., 2021. Recent insights into the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. J. Exp. Bot. 72, 199–223. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa482

Dutta, S., Podile, A.R., 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. Crit. Rev. Microbiol. 36, 232–244. https://doi.org/10.3109/10408411003766806

Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., Schalk, Isabelle.J., 2015. Cellular organization of siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa: Evidence for siderosomes. J. Inorg. Biochem., 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 12) in Zurich, Switzerland, August 24-28, 2014 148, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.017

Gerke, J., 2015. The acquisition of phosphate by higher plants: Effect of carboxylate release by the roots. A critical review. J. Plant Nutr. Soil Sci. 178, 351–364. https://doi.org/10.1002/jpln.201400590

Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B., 2007. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. Crit. Rev. Plant Sci. 26, 227–242. https://doi.org/10.1080/07352680701572966

Grizzetti, B., Billen, G., Davidson, E.A., Winiwarter, W., de Vries, W., Fowler, D., Howard, C.M., Bleeker, A., Sutton, M.A., Lassaletta, L., Garnier, J., 2020. Global Nitrogen and

Phosphorus Pollution, in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Bleeker, A., Hicks, W.K., Masso, C., Raghuram, N., Reis, S., Bekunda, M. (Eds.), Just Enough Nitrogen.

Springer International Publishing, Cham, pp. 421–431. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58065-0_28

Guerinot, M.L., Yi, Y., 1994. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. Plant Physiol. 104, 815–820. https://doi.org/10.1104/pp.104.3.815

Heitkötter, J., Marschner, B., 2018. Soil zymography as a powerful tool for exploring hotspots and substrate limitation in undisturbed subsoil. Soil Biol. Biochem. 124, 210–217. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.021

Helfenstein, J., Tamburini, F., von Sperber, C., Massey, M.S., Pistocchi, C., Chadwick, O.A., Vitousek, P.M., Kretzschmar, R., Frossard, E., 2018. Combining spectroscopic and isotopic techniques gives a dynamic view of phosphorus cycling in soil. Nat. Commun. 9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05731-2

Higgins, N.F., Crittenden, P.D., 2015. Phytase activity in lichens. New Phytol. 208, 544–554. https://doi.org/10.1111/nph.13454

Illmer, P., Schinner, F., 1995. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-Solubilization Mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27, 257–263. https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C

Isidra-Arellano, M.C., Delaux, P.-M., Valdés-López, O., 2021. The Phosphate Starvation Response System: its role in the regulation of plant-microbe interactions. Plant Cell Physiol. https://doi.org/10.1093/pcp/pcab016

Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, Md.T., Hossain, Md.M., 2016. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360

Kamble, P.N., Bååth, E., 2016. Comparison of fungal and bacterial growth after alleviating induced N-limitation in soil. Soil Biol. Biochem. 103, 97–105. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.015

Khan, S., Anwar, S., Kuai, J., Noman, A., Shahid, M., Din, M., Ali, A., Zhou, G., 2018. Alteration in yield and oil quality traits of winter rapeseed by lodging at different planting density and nitrogen rates. Sci. Rep. 8, 634. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18734-8

Kumar, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., 2012. Bacillus strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. Microbiol. Res. 167, 493–499. https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002

Leleu, O., Vuylsteker, C., Têtu, J.-F., Degrande, D., Champolivier, L., Rambour, S., 2000. Effect of two contrasted N fertilisations on rapeseed growth and nitrate metabolism. Plant Physiol. Biochem. 38, 639–645. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00784-1

Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H., 2009. Inoculation of plant growth promoting bacterium Achromobacter xylosoxidans strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by Brassica juncea. J. Environ. Manage. 90, 831–837. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.01.014

Makarova, L.E., Dudareva, L.V., Petrova, I.G., Vasil'eva, G.G., 2016. Secretion of Phenolic Compounds into Root Exudates of Pea Seedlings upon Inoculation with Rhizobium leguminosarum bv. viceae or Pseudomonas siringae pv. pisi. Appl. Biochem. Microbiol. 52, 205–209. https://doi.org/10.1134/S0003683816020095

Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, T.S., Blackwell, M., Stutter, M., Shand, C., Lumsdon, D., Cooper, P., Wendler, R., Brown, L., Almeida, D.S., Wearing, C., Zhang,

H., Haygarth, P.M., 2017. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. Plant Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3362-2

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170, 265–270.

Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23, 375–396. https://doi.org/10.1051/agro:2003011

Öztürk, Ö., 2010. Effects of Source and Rate of Nitrogen Fertilizer on Yield, Yield Components and Quality of Winter Rapeseed (Brassica napus L.). Chil. J. Agric. Res. 70. https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000100014

Peix, A., Lang, E., Verbarg, S., Sproeer, C., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Rodriguez-Barrueco, C., Velazquez, E., 2009. Acinetobacter strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of Acinetobacter calcoaceticus. Syst. Appl. Microbiol. 32, 334–341. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.03.004

Pikovskaya, R., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologia 362–370.

Plaxton, W.C., Tran, H.T., 2011. Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants. Plant Physiol. 156, 1006–1015. https://doi.org/10.1104/pp.111.175281

Qin, L., Walk, T.C., Han, P., Chen, L., Zhang, S., Li, Y., Hu, X., Xie, L., Yang, Y., Liu, J., Lu, X., Yu, C., Tian, J., Shaff, J.E., Kochian, L.V., Liao, X., Liao, H., 2019. Adaption of Roots to Nitrogen Deficiency Revealed by 3D Quantification and Proteomic Analysis. Plant Physiol. 179, 329–347. https://doi.org/10.1104/pp.18.00716

Rashid, A., Bughio, N., 1993. Evaluating internal phosphorus requirement of rapeseed, chickpea, lentil, and wheat by seed analysis. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 24, 1359–1369. https://doi.org/10.1080/00103629309368882

Razavi, B.S., Zhang, X., Bilyera, N., Guber, A., Zarebanadkouki, M., 2019. Soil zymography: Simple and reliable? Review of current knowledge and optimization of the method. Rhizosphere 11, 100161. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100161

Schjoerring, J.K., 1986. Nitrate and ammonium absorption by plants growing at a sufficient or insufficient level of phosphorus in nutrient solutions. Plant Soil 91, 313–138.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31, 425–448. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x

Spohn, M., Kuzyakov, Y., 2014. Spatial and temporal dynamics of hotspots of enzyme activity in soil as affected by living and dead roots—a soil zymography analysis. Plant Soil 379, 67–77. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2041-9

Tajini, F., Trabelsi, M., Drevon, J.-J., 2012. Combined inoculation with Glomus intraradices and Rhizobium tropici CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic

nitrogen fixation in common bean (Phaseolus vulgaris L.). Saudi J. Biol. Sci. 19, 157–163. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.11.003

Triviño, V., Suárez, J., 2020. Holobionts: Ecological communities, hybrids, or biological individuals? A metaphysical perspective on multispecies systems. Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci. 84, 101323. https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2020.101323

Wang, Jingjing, Wang, H., Yin, T., Xu, S., Zhao, W., Wang, Jin, Huang, Z., 2017. The persistence and performance of phosphate-solubilizing Gluconacetobacter liquefaciens qzr14 in a cucumber soil. 3 Biotech 7, 294. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0926-z

Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B.R., Musarrat, J., 2006. Significance of Bacillus subtilis strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in Brassica juncea. Chemosphere 64, 991–997. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.057

Zhang, L.-N., Wang, D.-C., Hu, Q., Dai, X.-Q., Xie, Y.-S., Li, Q., Liu, H.-M., Guo, J.-H., 2019. Consortium of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strains Suppresses Sweet Pepper Disease by Altering the Rhizosphere Microbiota. Front. Microbiol. 10, 1668. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01668

Supplementary data

Table S1 : In vitro characterization of PGPR traits for the tested PSB isolate: P solubilization and pH on Pikovskaya and NBRIP media; production of gluconic acid on both media; phytate solubilization; siderophores, HCN (Hydrogen cyanide) and IAA (indole-3-acetic acid) productions. Results are expressed as the mean value ± standard deviation. SI : Solubilization Index

	Pikovskaya medium				NBRIP								
Strain designation	SI	solubilized P (µg/mL)	medium pH	Gluconic acid production (µmol/mL)	SI	solubilized P (µg/mL)	medium pH	Gluconic acid production (µmol/mL)	Phytates SI	Siderophore production	HCN production	IAA production (ng/µL)	ACC deaminase activity
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	+

Table S2: Two ways ANOVA p-values of plant traits according to their N fertilization, P form and PSB application. AVONA were performed using the aov function of the « multcomp » package of R (4.0.2) software.

	PSB	P form	N fertilization	P form x PSB	P x N	N x PSB	N x P x PSB
Aerial DB	0.142	0.507	6.60E-05	0.579	0.689	0.300	0.383
Aerial P content	0.420	2.33E-08	0.050	0.583	0.600	1.000	0.929
Aerial P amount	0.100	1.95E-11	0.231	0.762	0.703	0.166	0.753
Aerial N content	0.367	0.197	0.001	0.260	0.083	0.310	0.613
Aerial N amount	0.412	0.777	9.89E-08	0.256	0.469	0.685	0.142
Aerial C content	0.641	0.154	0.249	0.576	0.150	0.289	0.503
Aerial C amount	0.185	0.660	5.21E-05	0.610	0.865	0.405	0.422
Roots DB	0.145	0.531	5.96E-05	0.465	0.490	0.474	0.557
Roots P content	0.394	0.001	0.032	0.024	0.254	0.154	0.413
Roots P amount	0.124	0.082	0.067	0.056	0.661	0.120	0.142
Roots N content	0.037	0.728	0.966	0.676	0.334	0.204	0.521
Roots N amount	0.703	0.831	2.15E-04	0.393	0.891	0.778	0.449
Roots C content	0.712	0.138	0.661	0.227	0.554	0.750	0.027
Roots C amount	0.135	0.323	4.28E-04	0.284	0.332	0.446	0.204
Roots length	0.043	0.063	0.365	0.104	0.634	0.246	0.546
Roots area	0.001	0.171	0.001	0.088	0.407	0.088	0.137
Roots diameter	0.052	0.536	0.001	0.556	0.958	0.621	0.254

P value
0.050
0.010
0.001

Table S3: Morphometric and elemental CNP plants profiles, according to the level of N fertilization (N160 or N80) and P added in complexed or labile form. Results are expressed as mean ± SD (n=4). Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package "agricolae" (p-value < 0.05).

		High N fertilization (N160)								Low N fertilization (N80)							
		Complexed P				Labile P				Complexed P				Labile P			
		ctrl		F23		ctrl		F23		ctrl		F23		ctrl		F23	
Shoots	Foliar area (cm²)	629.77 ± 101.54	a	716.90 ± 72.53	a	637.18 ± 169.69	ab	680.37 ± 126.80	a	412.12 ± 94.57	c	749.73 ± 68.75	bc	453.85 ± 105.93	c	512.69 ± 129.50	bc
	Dry biomass (g)	6.06 ± 1.67	ab	8.33 ± 1.70	a	6.27 ± 2.42	ab	6.90 ± 2.25	a	4.33 ± 0.62	b	4.40 ± 2.19	b	3.99 ± 1.05	b	4.43 ± 1.69	b
	P content (%)	0.08 ± 0.01	b	0.16 ± 0.08	b	0.52 ± 0.22	a	0.54 ± 0.19	a	0.16 ± 0.10	b	0.14 ± 0.10	b	0.68 ± 0.22	a	0.69 ± 0.27	a
	P amount (mg)	0.47 ± 0.10	b	1.28 ± 0.71	b	2.88 ± 0.67	a	3.42 ± 0.54	a	0.67 ± 0.32	b	0.63 ± 0.25	b	2.77 ± 1.25	a	2.83 ± 0.89	a
	N content (%)	1.00 ± 0.08	b	0.98 ± 0.12	b	1.31 ± 0.33	a	1.08 ± 0.23	ab	0.86 ± 0.17	b	0.91 ± 0.20	b	0.87 ± 0.24	b	0.84 ± 0.16	b
	N amount (mg)	60.24 ± 14.59	a	81.24 ± 15.01	a	80.04 ± 26.75	a	72.38 ± 18.91	a	37.72 ± 11.73	b	38.11 ± 17.87	b	33.44 ± 8.75	b	37.58 ± 16.40	b
Roots	Dry biomass (g)	2.17 ± 0.47	abc	2.88 ± 0.85	a	2.17 ± 0.39	abc	2.35 ± 0.86	ab	1.38 ± 0.24	c	1.56 ± 0.66	bc	1.42 ± 0.53	c	1.54 ± 0.73	bc
	P content (%)	0.07 ± 0.04	c	0.23 ± 0.10	b	0.24 ± 0.05	ab	0.22 ± 0.05	ab	0.19 ± 0.06	ab	0.21 ± 0.09	ab	0.28 ± 0.06	a	0.23 ± 0.04	ab
	P amount (mg)	0.15 ± 0.09	d	0.70 ± 0.51	a	0.53 ± 0.15	ab	0.51 ± 0.15	abc	0.26 ± 0.08	cd	0.29 ± 0.07	bcd	0.38 ± 0.10	abcd	0.35 ± 0.13	abcd
	N content (%)	1.76 ± 0.40	ab	1.45 ± 0.35	b	2.06 ± 0.54	a	1.48 ± 0.42	b	1.80 ± 0.38	ab	1.66 ± 0.45	ab	1.69 ± 0.30	ab	1.61 ± 0.31	ab
	N amount (mg)	37.90 ± 11.09	ab	41.34 ± 14.16	a	43.45 ± 8.04	a	35.24 ± 15.96	ab	25.22 ± 9.14	b	25.22 ± 11.26	b	24.31 ± 10.56	b	23.61 ± 7.32	b

Table S4: Root traits according to the level of N fertilization (N160 or N80) and P added in complexed or labile form. Results are expressed as mean ± SD (n=4). Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package “agricolae” (p-value < 0.05).

N fertilization	P form	PSM	Root length (cm)				Roots surface (cm²)				Roots average diameter (mm)				Length per volume (cm , m-3)			
			mean	±	sd		mean	±	sd		mean	±	sd		mean	±	sd	
N160	complexed	Ctrl	4 797.00	±	1 134.22	ab	716.90	±	72.53	a	0.50	±	0.12	ab	4 797.00	±	1 134.22	ab
		F23	4 141.75	±	789.36	abc	629.77	±	101.54	ab	0.49	±	0.02	ab	4 141.75	±	789.36	abc
	labile	Ctrl	4 109.57	±	323.06	abc	680.37	±	126.80	a	0.53	±	0.09	a	4 109.57	±	323.06	abc
		F23	4 142.07	±	872.84	abc	637.18	±	169.69	ab	0.49	±	0.09	ab	4 142.07	±	872.84	abc
N80	complexed	Ctrl	5 222.35	±	342.48	a	749.73	±	68.75	a	0.46	±	0.05	abc	5 222.35	±	342.48	a
		F23	3 576.18	±	646.20	c	412.12	±	94.57	c	0.36	±	0.02	c	3 576.18	±	646.20	c
	labile	Ctrl	3 830.52	±	688.11	bc	512.69	±	129.50	bc	0.42	±	0.03	bc	3 830.52	±	688.11	bc
		F23	3 551.02	±	1 292.69	c	453.85	±	105.93	c	0.42	±	0.07	bc	3 551.02	±	1 292.69	c

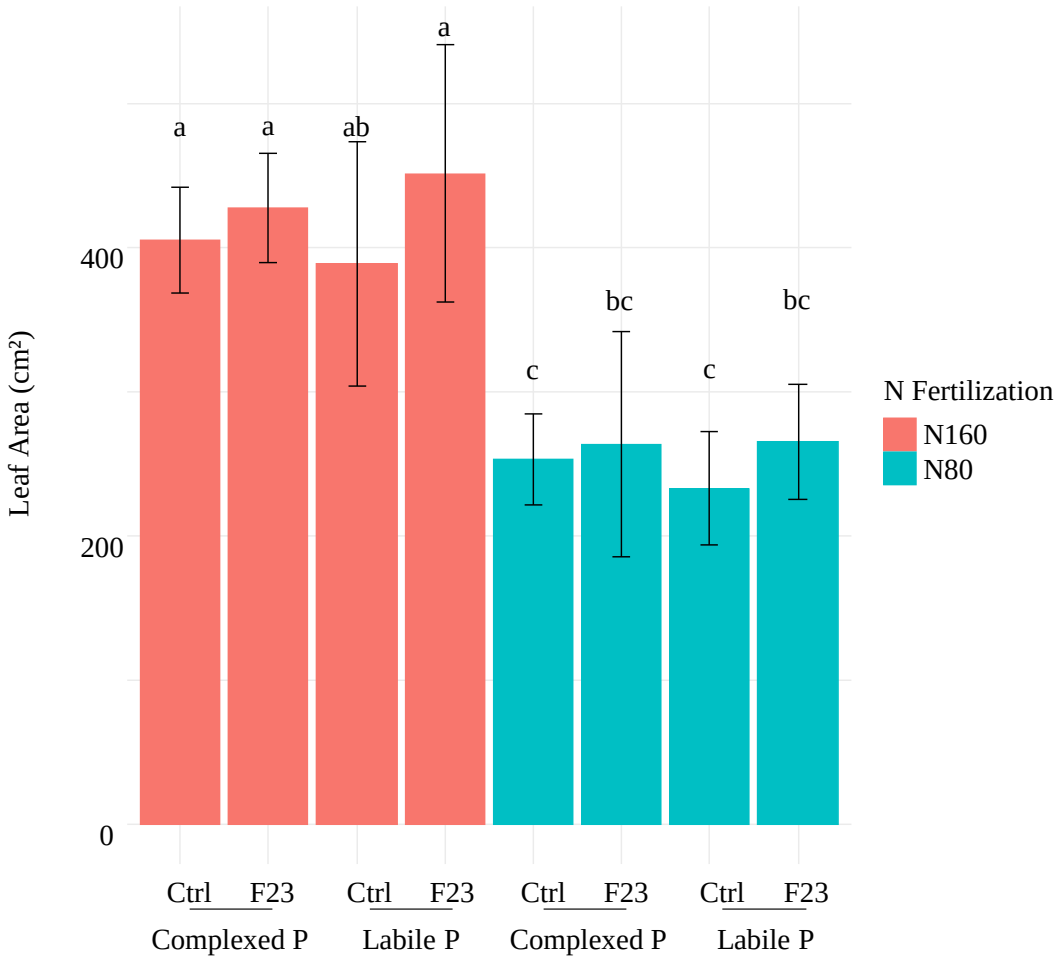


Figure S1 : Leaf area of plants subjected to high (N160, red) or low (N80, blue) N fertilization, with P fertilization added in complexed or labile form. Letters indicate significant differences obtained by post-hoc LSD Fischer test from the R package « agricolae » (p.value < 0.05)

Chapitre V : Discussion générale et perspectives

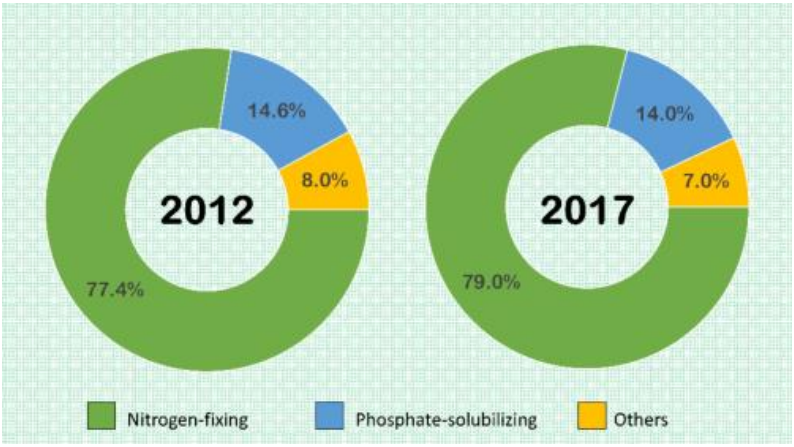


Figure 44 : Partage du marché des biointrants (tous microorganismes confondus) par typologie de produits proposés (Basu et al., 2021).

Le colza, en tant que 2nde oléo-protéagineuse cultivée dans le monde après le soja (USDA, 2021) est caractérisé par ses fortes exigences en azote et en phosphore. Celles-ci conduisent à l'utilisation importante d'engrais, souvent apportés sous forme minérale, responsables de dommages environnementaux (Grizzetti et al., 2020). Pour faire face à la pollution engendrée par l'utilisation de ces engrais, de nombreuses études se sont penchées sur le raisonnement de la fertilisation, notamment azotée en travaillant sur les formes apportées, les doses et/ou le fractionnement (Brennan et al., 2000; Christensen et al., 1985; Morel et al., 2011; Öztürk, 2010; Rathke et al., 2005; Seepaul et al., 2016). Depuis plusieurs années, des solutions de type biointrants ont été commercialisées en tant qu'alternatives prometteuses, bien que représentant seulement une très faible part du marché des fertilisants. Les biointrants, d'origine microbienne, proposés actuellement sont en grande majorité des microorganismes fixateurs d'azote, suivis par des microorganismes solubilisateurs de phosphates (Figure 44, Basu et al., 2021). Ces solutions, une fois appliquées au champ, présentent souvent des efficacités variables ou insuffisants, limitant leur utilisation ultérieure par défiance de la part des agriculteurs. En effet, une souche apportée dans un nouvel environnement doit pouvoir s'implanter, se multiplier, être recrutée par la plante pour pouvoir coloniser l'espace rhizosphérique et aussi exprimer son potentiel PGPR (Podile et al., 2014). Chacune de ces étapes peut être entravée par de nombreux facteurs environnementaux tels que les variations climatiques, la salinité du sol, son acidification ou alcalinisation mais également la disponibilité des nutriments. L'introduction de microorganismes exogènes est conditionnée par la compétition existante entre l'ensemble des organismes hébergés par les sols et leurs interactions trophiques (Dutta and Podile, 2010; Riah et al., 2014; Strigul and Kravchenko, 2006). Améliorer le bilan agro-environnemental du colza par l'utilisation de biointrants de type PSM, semble être une stratégie prometteuse mais pour l'instant peu efficiente en l'état actuel des connaissances (Dutta et Polti, 2010).

Plusieurs études ont démontré l'impact de carence en phosphore dans le sol sur l'absorption de l'azote ainsi que de déficience en azote sur l'efficience d'usage du phosphore par les plantes (de Groot et al., 2003). Le rôle des éléments minéraux essentiels et leurs interactions sur la croissance, l'efficience d'usage des nutriments et *in fine* l'élaboration du rendement et de la qualité des graines de colza demeurent une question scientifique d'intérêt majeur.

Dans ce travail, des expériences ont été conduites dans l'objectif de déterminer l'effet de différentes modalités de fertilisations N : P sur le cycle complet de culture du colza et caractériser ainsi leurs interactions sur l'efficience d'usage de ces nutriments, les composantes du rendement et la qualité oléique et protéique des graines. Parallèlement, afin d'estimer le rôle des microorganismes dans la nutrition du colza et d'identifier d'éventuels organismes bénéfiques présentant *in vitro* des phénotypes d'intérêt, la diversité bactérienne associée à différents couverts (colza, pois, féverole) a été explorée et caractérisée. Ce travail a permis l'identification de 3 souches prometteuses (C12, F23 et P2, respectivement isolées sous couvert de colza, féverole et pois d'hiver). La mise en œuvre de ces souches *in planta* a démontré la capacité de la souche F23 à promouvoir la croissance du colza en conditions variées de fertilisation N et P, en condition non limitante équivalente en carbone.

A. Impacts de la fertilisation N et P sur les composantes du rendement et la qualité grainière du colza

Les travaux réalisés en conditions contrôlées (Chapitre IV-A), ont permis de suivre le comportement de la variété Aviso, génotype de colza d'hiver caractérisé par sa capacité à optimiser sa NUE et à maintenir son rendement en cas de limitation en N (Girondé et al., 2015a, 2015b), face à 12 niveaux de fertilisations contrastées en N et P.

Un résultat inattendu de cette expérimentation réside dans le fait que les différentes modalités de fertilisations (ratio N:P dans la matrice sable) testées ont conduit à des modifications des statuts N:P dans la plante au cours du cycle de culture et ont *in fine* impacté l'élaboration du potentiel de rendement et la qualité grainière. En particulier, le statut nutritionnel en N des colzas observés à la sortie de la vernalisation et de la phase végétative a impacté :

- le niveau d'accumulation en huile et en protéines des graines. En effet, les graines obtenues à partir de colzas ayant un faible statut azoté au début de la phase reproductive (à cause d'un niveau de nutrition en N insuffisant au cours de la phase végétative) étaient caractérisées par une plus grande teneur en huile. A l'inverse, les graines produites par des colzas caractérisés par un fort statut azoté au début de la phase reproductive étaient plus riches en protéines. Dans la mesure où l'azote est principalement stocké et exporté sous forme d'acides aminés, une augmentation de la fertilisation azoté conduit fréquemment à une augmentation de la teneur en protéines dans les graines (Aminpanah, 2013), ainsi qu'à une diminution de la synthèse des acides gras, due à l'utilisation du carbone des photosynthétats pour la synthèse des acides aminés (Rathke et al., 2005).
- la qualité grainière (ratio de certains acides gras insaturés et niveau de phytate). En effet, les graines obtenues des plantes à faible statut N, non seulement contenaient plus d'huile, mais également présentaient un ratio ω6 : ω3 plus intéressant du point de vue nutritionnel pour la santé humaine (Simopoulos, 2016, 2010) et donc pour la consommation en tant qu'huile de table. La production de ces acides gras dépend de l'activité de désaturases qui sont ATP-dépendantes (Ohlrogge and Browse, 1995; Suresha et al., 2013). Dans la mesure où le N est un facteur limitant de la photosynthèse (Gao et al., 2018), la modification du ratio des acides gras

polyinsaturés peut être expliquée par un changement dans les activités des désaturases spécifiques de la synthèse des ω3 et ω6. Une augmentation de la quantité de phytate était attendue avec l'augmentation de la fertilisation P, ce qui n'a pas été observé ici. En revanche l'augmentation de la fertilisation N tend à diminuer la teneur en phytate, probablement en relation avec un effet de dilution déjà observé par Raboy et al. (1991).

L'ensemble de ces travaux, qui devront être confirmés en conditions de plein champ et chez d'autres variétés de colza, suggèrent qu'il serait possible de mettre en place des schémas de fertilisation N et P qui pourraient orienter la culture vers les filières industrielles de valorisation des huiles ou des protéines végétales du colza. Outre l'implication de ces résultats dans les débouchés industriels du colza, ceux-ci soulignent également l'importance de la nutrition et du suivi de la vigueur des plantules avant la période hivernale. En effet, Bouchet et al. (2016) ont montré que l'élaboration du potentiel de rendement, qui comprend les stades phénologiques de la germination au début de la floraison, regroupe de manière logique les flux d'azote provenant du pic de minéralisation automnale, et des apports effectués à la reprise de croissance post-vernalisation. L'acquisition de nutriments provenant de ces apports au sol est primordial dans la mesure où la floraison va ombrager les feuilles, et donc diminuer drastiquement l'activité photosynthétique. Cette baisse des capacités photosynthétiques pourrait limiter l'absorption du N en affectant l'activité des transporteurs de nitrate ainsi que le fonctionnement du complexe Nitrate Réductase (NR), Glutamine Synthase et Glutamine Oxoglutarate AminoTransférase (GS/GOGAT), et ce jusqu'à l'apparition des siliques (Bouchet et al., 2016; de Groot et al., 2003; Gniazdowska and Rychter, 2000). Nos résultats renforcent l'idée que l'acquisition de nutriments à l'automne serait déterminante pour la vigueur du colza au cours de la phase végétative et ses performances à la reprise de croissance au printemps.

Dans la mesure où la fertilisation automnale est très limitée par la directive Nitrates (*Directive nitrates*, 1991), l'enfouissement de résidus de culture riches en azote, par exemple issus d'une culture de légumineuses, et/ou une meilleure disponibilité du N et du P minéral dans le sol (via l'activité du microbiome du sol) constituent un apport essentiel au bon développement de la culture et de son statut nutritionnel. Ces résultats mettent donc en avant l'importance de la vigueur de colza qui va définir en grande partie son statut nutritionnel au cours de la phase végétative.

Suite à ces observations, une des perspectives à envisager serait de vérifier si la prise en compte du statut nutritionnel du colza à l'entrée d'hiver et/ou à la sortie d'hiver pourrait être ainsi un indicateur idoine du pilotage de la fertilisation à la reprise de croissance printanière afin de pouvoir orienter la culture vers une production accrue en huile ou en protéines.

Compte tenu de ces résultats, l'ensemble des travaux a été focalisé sur des expérimentations menées aux stades jeunes, afin de déterminer si l'usage de biointrants par la valorisation du potentiel microbien des sols pouvait être bénéfique à la culture du colza, notamment en promouvant l'acquisition de P par la plante et en lui permettant d'atteindre un ratio optimal de nutrition N et P.

B. Impact du ratio de fertilisation N :P sur l'efficience d'usage du N et du P, les relations plantes-microorganismes et l'expression de traits PGPR d'intérêts

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit peut être discuté au travers du prisme des différents ratios N : P de fertilisation testés et de l'augmentation progressive de la complexité du compartiment biologique étudié.

Trois expérimentations ont été menées : 1) la plante seule a été soumise à 12 niveaux de fertilisation N et P (en matrice de culture sable) afin de mettre en évidence la résultante sur les composantes du rendement ; 2) la plante inoculée par la souche F23 a été cultivée sous deux ratios N : P, avec une source P appliquée soit sous forme labile soit sous forme complexée (en matrice de culture sable), dans l'objectif d'évaluer l'expression d'une coopération directe entre une souche PSM et les jeunes plantules de colza ; et 3) à un ultime niveau de complexité, quatre ratios N : P ont été mis en œuvre en combinaison avec l'inoculation de trois souches potentiellement PSM en sol et ont permis d'observer les effets conjoints sur la croissance du colza et sur la structuration des communautés microbiennes natives associées. Les effets de la fertilisation vont donc être décrits ci-après en fonction de la complexité croissante du système, intégrant le rôle de la microbiodiversité rhizosphérique depuis le fonctionnement individuel jusqu'à une vision plus holistique.

B-1 Impact du ratio de fertilisation N : P sur les phénotypes individuels de la plante

Au cours de deux expériences en serre (Chapitre IV-A), distinctes par deux niveaux d'azote apportés aux stades végétatifs du colza (N+ et N-), six niveaux de fertilisation N et P ont été apportés (deux niveaux d'azote : LN et HN et trois niveaux de phosphore : LP, MP et HP). Ces cultures ont permis de générer des plantules de ratios N : P variés. Des corrélations fortes (Chapitre IV-A Annexe, Tableau 3) entre ces ratios et diverses composantes agronomiques d'usage du N et P ont été trouvées. En effet, ces ratios ont montré de fortes corrélations positives avec les efficiences d'absorption du N et du P, et également avec l'efficience d'usage du P.

La relation de causalité entre l'absorption de l'azote et le ratio N : P de la plante semble évidente dans la mesure où lorsque davantage d'azote est absorbé, ce ratio sera plus élevé. Le rôle du P dans cette efficience semble être très réduit, ce qui a été confirmé par les analyses statistiques d'ANOVA. Ces résultats confirment le statut de « pompe à nitrate » du colza, qui présentent une forte capacité à prélever de l'azote dans son environnement, (Sausse et al., 2012).

Inversement, une même corrélation positive entre l'efficience d'absorption du P et le ratio N : P des colzas semble moins évidente dans la mesure où l'absorption d'une plus grande quantité de P est censée diminuer ce ratio. Le niveau en P des racines a révélé un effet lié à la nutrition azotée. En effet, une teneur plus élevée en P a été observée en conditions de faible N. L'azote est généralement considéré comme impactant peu l'absorption du P du fait que ces deux éléments n'interviennent pas dans la composition des mêmes macromolécules (de Groot et al., 2003). Cependant Medici et al., (2019) ont montré chez *Arabidopsis thaliana,* chez le riz et chez le blé un effet inhibiteur de la limitation en N sur l'activité des transporteurs de phosphate, ce qui pourrait expliquer un défaut de translocation du P dans les autres organes de la plante. Ainsi une accumulation racinaire du P pourrait avoir inhibé à son tour l'absorption de cet élément pourtant disponible dans l'environnement racinaire. Cependant les analyses ANOVA ne mettent pas en évidence un effet significatif de la fertilisation N sur cette composante de la PUE.

Enfin, l'efficience d'usage du P est positivement corrélée au ratio N : P de la plante. Cela peut s'expliquer par un effet du niveau de la fertilisation en P sur la proportion du P représenté par le compartiment graines. En effet, nos résultats ont montré que malgré une quantité croissante de P dans les graines selon le niveau de fertilisation P, le PHI reste constant quel que soit le niveau de fertilisation apportée. Cela se traduit par une PUE inversement proportionnelle au P apporté. Ainsi plus la quantité de P dans la plante augmente, plus le ratio N : P diminue et moins la PUE est élevée.

Ce lien entre ratio N : P et PUE a déjà été observé chez le cynodon, le lierre, la potentille et la canne à sucre, sans pour autant avoir été explicités (He et al., 2010; Teixeira et al., 2020).

Inversement, le statut N : P des plantes se révèle être anti-corrélé avec l'indice de récolte azoté (NHI), phosphaté (PHI) et l'efficience d'utilisation de l'azote (NUtE). Les indices de récoltes ont, dans nos expérimentations, variés en fonction de la fertilisation apportée avant vernalisation. En effet, l'expérimentation conduite en fort azote (plantes N+) a généré des plants de statut N :P élevés et celle conduite en faible azote (plantes N-) a généré des plants de statut N : P plus faibles. Les valeurs de PHI et de NHI les plus faibles ont été trouvées pour les plantes N+. Cette culture est également caractérisée par une utilisation des nutriments pouvant être considérée comme une « consommation de luxe » dans la mesure où l'apport de nutriments n'a pas engendré d'augmentation ni du rendement, ni de la quantité de N ou de P exportés. Le reste des nutriments absorbés est principalement resté dans les péricarpes, les feuilles chutées, et, dans une moindre mesure, les tiges.

Ces résultats semblent donc indiquer qu'une limitation des apports en N et P sans affecter le rendement est possible via l'ajustement des fertilisations N et P. Même si ces limitations conduisent à des plantes présentant de faible statut N : P, le rendement peut être maintenu via l'augmentation des performances agroenvironnementales en termes de NUE et PUE. Ces résultats soulignent la plasticité de la physiologie de cette espèce végétale pour assurer un rendement constant même en conditions de faibles intrants.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées suite à ces observations :

1. L'exploration des données obtenues au cours du marquage au ^{15}N pourrait apporter des informations complémentaires sur les dynamiques de l'azote au cours des stades reproducteurs du colza.
2. Ces données mériteraient d'être vérifiées au champ afin de confirmer dans des conditions non contrôlées les observations faites en serre. En effet, la croissance de plants en sol, en présence d'une communauté microbienne native associée, en conditions pédoclimatiques variées et en fonction du contenu des autres éléments minéraux (soufre, magnésium, etc.) pourrait largement impacter l'efficience d'usage de N et P.
3. Dans la mesure où l'élaboration du potentiel de rendement prend fin avec la floraison de la plante, rechercher un statut N : P cible à atteindre à ce stade semble être pertinent pour aider à raisonner la fertilisation.

B-2 Impact du ratio de fertilisation N : P sur la coopération du colza et de la souche PSM F23

Au cours de l'expérimentation menée en rhizotrons (Chapitre IV-C2), les effets de la souche PSB F23 (*Pseudomonas* sp.) ont été testés sur la croissance du colza au stade rosette. Cette étude a été réalisée en conditions axéniques (matrice de culture sable stérile), en milieu Hoagland modifié, sans apport de sources carbonées externes et en présence de différentes sources de P, sous forme labile ou complexée. A la lumière des résultats précédents obtenus sur la croissance du colza seul, la fertilisation N et P a été conçue en suivant deux ratios correspondant aux recommandations habituelles de fertilisation en N et P (quantités non limitantes) de la culture de colza, et à une diminution de 50 % de la fertilisation en N. Ces recommandations induisent des ratio N:P évalués respectivement à 6,32 et 3,20.

Comme attendu, l'application de ces deux ratios de fertilisation a montré des effets sur la croissance du colza. De la même façon, des effets de la souche PSB F23 ont également pu être révélés. En effet, avec le ratio de fertilisation N : P le plus élevé, dans le cas d'un apport de P complexé, l'application de F23 permet une augmentation de la biomasse racinaire, ainsi que de la teneur et de la quantité de P dans la plante entière (particulièrement significatif au niveau racinaire) et la restauration des traits racinaires. Les profils obtenus sont alors comparables aux plantes ayant reçu du P sous forme labile. En revanche les résultats obtenus en diminuant de moitié l'apport de N ne montrent aucun effet de la souche sur les paramètres morphométriques et le statut N ou P de la plante.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : 1) les effets observés sont la résultante directe d'un impact de la limitation en azote sur la biomasse de la souche F23, comme précédemment observés dans les sols (Aldén et al., 2001; Kamble and Bååth, 2016). Dans ces conditions, la quantité de phosphore complexé solubilisé est donc moindre, sans effet bénéfique sur la croissance de la plante ; 2) les effets observés sont la résultante d'un impact indirect sur la biomasse de la souche F23 et/ou l'expression de ses traits fonctionnels PSB/PGPR via la modification des exsudats racinaires de la plante (composés carbonés, azotés, etc.). Lorsque le phosphore est complexé, l'azote joue un rôle primordial dans les interactions entre la plante et la souche F23. Lorsque qu'il est présent en condition limitante, les deux protagonistes pourraient alors avoir un mode de vie apparemment plus « individuel » que synergique concernant l'absorption du phosphore.

Dans la mesure où les exsudats reflètent la composition des tissus végétaux, une limitation en N pourrait alors entrainer une diminution de l'exsudation des composés azotés, et par là même des acides aminés (Badri and Vivanco, 2009), précurseurs majeurs dans la synthèse de nombreuses molécules à effet PGPR.

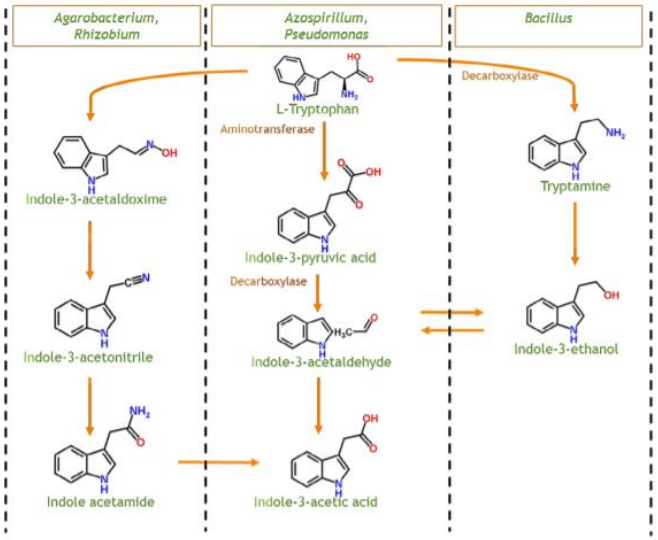


Figure 45 : Voies de synthèse de l'IAA à partir de tryptophane chez des souches bactériennes possédant des caractéristiques PGPR (Goswami et al., 2016).

Parmi ces molécules, nous retrouvons l'IAA (Figure 45) synthétisée à partir de tryptophane (Spaepen et al., 2007), ou la pyoverdine, sidérophore majeur des *Pseudomonas*, dont la synthèse implique 11 protéines différentes (Gasser et al., 2015). De même, la plante pourrait exsuder moins d'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid), dont la synthèse nécessite de la SAM (S-adénosyl methionine) étant un dérivé de la méthionine. Or l'ACC est le substrat de l'ACC déaminase bactérienne des microorganismes PGPR (Glick et al., 2007). Ces réductions potentielles de synthèse d'auxine, combinées avec une réduction de l'activité ACC déaminase pourraient expliquer la diminution de longueur racinaire observée en conditions de faible N avec l'inoculation de F23. Le métabolisme de la souche étant dédié à son maintien dans le milieu, les interactions avec la plante deviennent limitées, expliquant la non-démonstration de sa potentialité PGPR.

L'implication des acides aminés dans les relations plantes-microorganismes a par ailleurs été déjà observée chez les Poacées. Zhalnina et al. (2018) ont en effet montré un fort effet de sélection de microorganismes rhizosphériques dont le génome comporte une grande proportion de transporteurs dédiés à l'acquisition d'acides aminés et d'acides organiques. Par ailleurs cette étude montre également que ces microorganismes représentent un véritable compartiment « puits » pour ces macro-molécules puisqu'elles sont réellement davantage consommées. De plus, l'étude temporelle de l'exsudation des Poacées montre une réelle dynamique des molécules impliquées dans la communication entre la plante et son microbiote. En effet, le recrutement des microorganismes débuterait par l'émission d'homosérines (impliquées dans le quorum-sensing), puis par une exsudation plus importante d'acides aminés et organiques, pour enfin privilégier l'exsudation d'IAA.

La modification de l'exsudation racinaire peut également induire d'autres impacts sur les interactions plante-microorganismes. À titre d'exemple, la colonisation racinaire efficiente, à travers la constitution d'un biofilm bactérien, peut être impacté par des conditions de stress

abiotiques pour la plante. Il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* que ces conditions de stress peuvent provoquer une accumulation de γ-hydroxybutyrate (GHB) (Allan, 2010). Lorsqu'il est exsudé, le GHB peut inhiber le quorum sensing d'*Agrobacterium tumefaciens*. Dans la mesure où la proportion des composés exsudés reflète les proportions observées dans les tissus végétaux (Nguyen, 2003), l'exsudation de GHB pourrait augmenter en conditions limitantes en N. Le quorum sensing étant la première étape incontournable de la formation de biofilms (O'Loughlin et al., 2013), la souche F23 pourrait ne pas avoir été en mesure de coloniser l'environnement racinaire du colza.

L'ensemble de ces hypothèses ne s'excluent pas nécessairement et peuvent expliquer certains mécanismes du basculement entre un mode de vie coopératif et un mode de vie individuel, où chacun des deux protagonistes préfère utiliser les nutriments à disposition pour sa propre croissance (synthèse protéique, réplication chromosomique, production de biomasse) plutôt qu'opter pour un partage des ressources mutualiste et l'expression de fonctions non-liées à la production de biomasse et au maintien dans le milieu (Manzoni et al., 2017).

L'ensemble de ces résultats ouvre de nombreuses perspectives :

1. Étudier le rôle des exsudats qui pourraient être impliqués dans les interactions colza-F23. L'état des connaissances actuelles sur l'exsudation du colza, et les difficultés techniques pour l'étude des exsudats plus généralement représentent cependant un frein pour mieux comprendre le dialogue plantes-microorganismes. Ce travail pourrait être envisagé au sein de l'unité Aghyle, en partenariat avec les laboratoires de la SFR Normandie Végétale.
2. Étudier *in situ* des activités enzymatiques d'intérêt (phosphatase alcaline, arylamidase) par zymographie (Spohn et al., 2018) dans l'ensemble des conditions de l'expérience.

Des mises au point sont en cours mais n'ont pas permis à ce jour de réaliser ces analyses dans les temps de l'expérience. Ce travail pourrait être poursuivi en collaboration avec le Dr Yakov Kuzyakov, de l'université de Göttingen.

3. Suivre le développement de la biomasse de F23 par mesure de son abondance dans la matrice de culture (approche microbiologique classique, de biologie moléculaire de microscopie par la mise en œuvre d'une souche transformée) pour la compréhension du mécanisme en lien avec la dynamique de la solubilisation du phosphore complexé dans le milieu et selon le stade de développement de la plante.
4. Suivre l'expression de gènes de fonction liés à l'acquisition et la solubilisation du P par analyses de biologie moléculaire (RT-PCR suivi de PCR en temps réel). Il s'agit ici de pouvoir explorer les conditions nécessaires à l'expression de traits PSB et PGPR.

B-3 Impact du ratio de fertilisation N : P sur le fonctionnement de l'holobionte constitué de l'association entre le colza et les communautés rhizosphériques sous l'influence de l'inoculation de la souche PSB F23

L'expérience en serre (Chapitre IV-C1) mise en œuvre avait pour objectif de mesurer l'effet de l'inoculation de la souche F23 sur la croissance du colza mais également la résultante sur les communautés microbiennes autochtones. Pour cela, un gradient de fertilisation P décroissant par rapport à la dose recommandée par le COMIFER (COMIFER, 1995) a été appliqué sur un sol présentant à l'origine une faible disponibilité en P. Ce gradient de fertilisation P a permis de générer des ratios de fertilisation pour N et P non limitant, de 4,4, 2,2 et 1,1 (pour respectivement une fertilisation en P optimale, réduite de 50 % ou de 75 %, mais également sans fertilisation P). Les effets positifs de l'apport de la souche PSB F23 sur le colza n'ont été observés que pour les plantes recevant une fertilisation en P réduite de 50 % (en condition non limitante en N et en C).

En effet, dans ces conditions, les propriétés physico-chimiques résultantes du sol se révèlent alors semblables à celles d'une fertilisation optimale, et les plantes se caractérisent par une plus grande biomasse et une plus grande quantité de P racinaire. L'analyse de la structure des communautés microbiennes du sol, obtenue par séquençage Illumina montre que l'adjonction de la souche F23 entraine une modification des communautés bactériennes comparées aux modalités témoin. Un facteur explicatif de ces modifications semble pouvoir être attribué directement ou indirectement à la présence de F23 et/ou ses effets induits sur les caractéristiques du sol et de la plante. Ces résultats mis au regard des résultats obtenus sur la croissance de la plante illustrent la constance des effets de F23 sur les communautés bactériennes associées au colza et l'importance du ratio de fertilisation N : P dans l'expression du potentiel bénéfique de ces microorganismes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les effets positifs de telles réorientations dans la rhizosphère sont conditionnés par un seuil minimum de P disponible dans la solution de sol, comme observé dans une méta-analyse regroupant les effets de différents paramètres abiotiques sur l'efficacité de souches PSM (Schütz et al., 2018).

Par ailleurs, l'analyse fine des populations bactériennes présentes dans la rhizosphère suite à l'inoculation de F23 chez les plantes recevant 50 % de fertilisation P permet d'observer une décroissance d'abondance de genres bactériens liés à un potentiel biocontrôle (et d'un genre fongique pathogène) et en parallèle l'augmentation de genres bactériens liés à la nutrition (notamment soufrée) et la promotion de la croissance végétale. Ce constat permet d'émettre l'hypothèse d'un changement de spécialisation du microbiote associé. Dans cette configuration, l'immunité de la partie végétale de l'holobionte pourrait alors ne plus reposer que sur ses propres moyens, notamment par la production de glucosinolates, en lien avec le métabolisme du soufre (Siebers et al., 2018; Zhao et al., 1997), et non plus par le recrutement d'un microbiote protecteur.

Les Brassicacées expriment une forte pression de sélection sur les microorganismes de leur rhizosphère par l'intermédiaire des glucosinolates et des isothiocyanates résultants de leurs dégradations (Bressan et al. 2009). Il a déjà été démontré que ces molécules sont un facteur clé de l'augmentation de la quantité de PGPR, mais également de la diminution de l'abondance de *Pseudomonas* (Siebers et al., 2018). Néanmoins, Gkarmiri et al. (2017) ont montré que les *Pseudomonas* représentaient la majorité des ARN bactériens de la rhizosphère, indiquant la très grande activité de cette communauté. Ainsi, la souche F23 pourrait avoir franchi cette barrière de sélection, puis son activité pourrait avoir été favorisée par l'influence du colza lorsque les conditions de fertilisation P étaient favorables. Cette activité a alors provoqué une réorientation dans le profil des microorganismes PGPR recrutés.

Ces premiers travaux sur les effets de l'inoculation de F23 sur la croissance du colza et les modifications des communautés microbiennes autochtones en réponse à un gradient de fertilisation P soulèvent de nouvelles questions et permettent d'envisager les perspectives suivantes :

1. Evaluer l'effet de la souche F23 dans d'autres contextes pédologiques, sols avec des caractéristiques physico-chimiques contrastées, en écosystèmes miniaturisés en serre et en conditions de plein champ.
2. Tester d'autres génotypes de colza ayant des comportements différents en terme (i) d'efficience d'usage du N et/ou du P, ou (ii) de réponse à une limitation de la disponibilité en P que le génotype Aviso.
3. Réaliser des analyses transcriptomiques et/ou protéomiques ciblées sur les gènes ou les protéines impliqués dans la solubilisation du P et l'expression de traits PGPR dans l'objectif de mieux comprendre les mécanismes d'action de la souche F23
4. Révéler les effets de l'ajout de la souche F23 sur les interactions entre les populations microbiennes au sein de l'écosystème rhizosphériques, notamment au travers d'analyses en réseau de co-occurrence (« network analysis », Barberán et al., 2012).

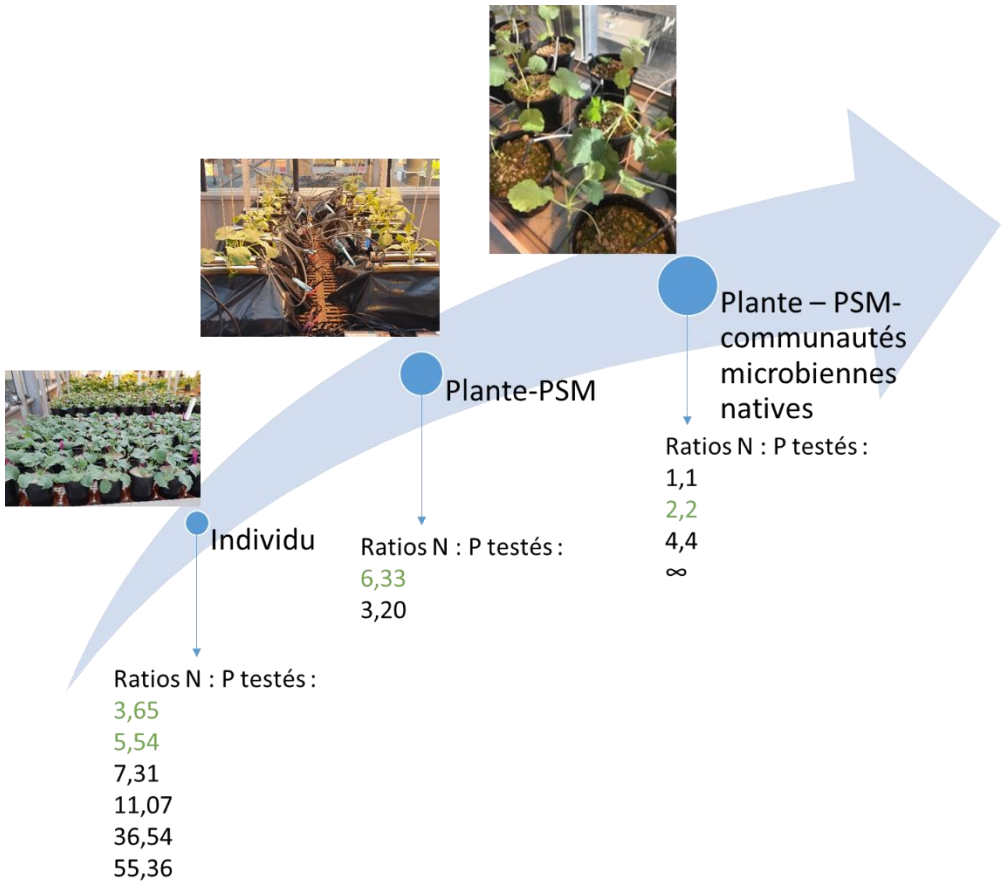


Figure 46 : Ratios de fertilisation N : P testés à l'échelle de l'individu, du couple colza-F23 ainsi que du phytobiome. En vert, les ratios pour lesquels les meilleures performances agronomiques et de coopération plante-microorganismes ont été trouvées.

B-4 Conclusion intermédiaire

Au cours de l'ensemble de ces expériences, différents ratios de fertilisation N : P ont donc été testés sur la croissance du colza et la qualité des relations que cette culture entretient avec les microorganismes rhizosphériques (Figure 46). Les meilleures performances agronomiques pour le colza, seul, ont été obtenus pour les ratios les moins élevés. En effet, bien que les plantes soient capables d'absorber plus de nutriments pour des ratios de fertilisation N : P plus élevés, les performances agronomiques de la variété étudiée (cv. Aviso) n'en sont pas pour autant améliorées. Néanmoins, les autres expériences incluant l'usage de biointrants et le recrutement d'un microbiote rhizosphérique d'intérêt ont permis d'affiner les niveaux de fertilisation N et P pour définir un ratio permettant un fonctionnement optimal de l'holobionte colza-microorganismes rhizosphérique. En effet, un ratio de fertilisation N : P trop faible serait soit le signe d'une quantité de P disponible ne nécessitant pas le recrutement de PSM, soit le signe d'une carence en azote, qui serait susceptible de rompre le dialogue entre les deux compartiments de l'holobionte. Au contraire, un ratio de fertilisation N : P trop élevé, signe d'une limitation possible en P disponible, pourraient entraîner des phénomènes de compétition. Les ratios de fertilisation N : P obtenus lors des cultures sur sable (à l'échelle de l'individu (Chapitre IV-A) et de la coopération plante-PSM (Chapitre IV-C2), Figure 46) diffèrent de ceux obtenus en sol dans la mesure où la fertilisation P apportée peut avoir été rapidement adsorbée aux particules de sol et ne reflètent pas les conditions observées en sable. De plus, la présence d'une abondante communauté microbienne native modifie intrinsèquement le fonctionnement général du système. En condition axénique, un ratio de fertilisation N : P aux alentours de 6 semble être idéal, et pourrait de fait plutôt correspondre à un ratio de fertilisation aux alentours de 2 en culture sur sol.

Cette hypothèse nécessite d'être vérifiée par la répétition de l'expérience en utilisant des sols présentant des paramètres physicochimiques variés, mais aussi être testée au champ.

Ces considérations pourraient être la base d'une réflexion pour de nouvelles recommandations de fertilisation basées sur la prise en compte de l'holobionte du colza, et non plus en considérant la plante seule. En effet, pour un rendement de 35 quintaux par hectare, il est aujourd'hui évalué que le colza doit absorber 245 unités d'azote (à raison de 7 U par quintal de rendement, Terres Inovia, 2019a) et 90 unités de P_2O_5 (Terres Inovia, 2019b), ce qui correspond à un ratio de fertilisation N : P de 13,8. Dans une perspective de production de colza plus durable, l'usage de PSM en tant que biointrant d'avenir pourraient permettre un abaissement de ce ratio et conduire à une réduction concomitante des niveaux de fertilisations N et P, en augmentant la proportion de P disponible dans la solution de sol.

C. *Le pilotage de la culture de colza par ingénierie écologique : de la souche à la graine*

C-1 Impacts de l'exigence en P sur la sélection de PSM de profils distincts

Un screening de souches PSM a été réalisé à partir de sols prélevés sous trois couverts distincts : une culture de colza, de pois d'hiver et de féverole. Alors que le colza est connu comme exigent vis-à-vis du phosphore, les légumineuses ont quant à elles des exigences plus modérées (Bolland et al., 1999; Bolland and Brennan, 2008). De manière intéressante, la culture du colza semble avoir conduit à la mise en place d'un micro-environnement caractérisé par une plus grande proportion de souches de plus grande efficience de solubilisation du P. Des travaux précédents menés sur la culture d'aubergine (Li et al., 2019), ont démontré de la même façon la plasticité et la modulation du recrutement de souches PSM au cours du développement de cette espèce végétale, pour atteindre un potentiel maximal au stade phénologique nécessitant le plus de P.

De plus, deux profils distincts d'action des souches PSM ont pu être mis en évidences. Un profil dit de solubilisation directe, caractérisé par de plus grands indices de solubilisation sur milieu Pikovskaya, et par la production d'acide gluconique a été principalement trouvé parmi les souches isolées sous colza. A l'inverse, les souches trouvées sous les légumineuses, de profil plus indirect, sont caractérisées par une plus grande proportion de souches produisant des sidérophores et de l'auxine. Les souches présentant les efficiences les plus élevées en conditions de N et P plus stringentes se sont révélées avoir un métabolisme plus large, mais aussi une plus grande capacité d'utilisation du phytate et de l'ACC en tant que source d'azote.

En réponse à une carence en P, le colza va généralement miser sur une élongation racinaire, tandis que les légumineuses auront davantage tendance à sécréter des phosphatases et à acidifier le milieu dans le but d'accéder aux ressources P du sol (Honvault et al., 2020).

Nos résultats suggèrent que les plantes auraient ainsi tendance à sélectionner des microorganismes PSM déployant des fonctionnements complémentaires à leur propre stratégie intrinsèque, ce qui pourrait constituer une opportunité à saisir pour modeler une communauté microbienne des sols, potentiellement transmise à la culture suivante (Bakker et al., 2018). Cet héritage microbien serait alors remobilisable au fil des cycles de culture, permettant une diminution des intrants et contribuant à améliorer la performance environnementale des grandes cultures.

Dans la continuité de ces travaux, plusieurs perspectives sont à envisager :

1. Elargir ces observations à l'ensemble de la communauté rhizosphérique par une approche génomique (PCR quantitative ciblée) permettant de suivre l'expression de fonctions d'intérêts dans la rhizosphère de plantes dont les besoins en N et P sont variables.
2. Obtenir des profils d'exsudats racinaires de multiples espèces végétales et variétés dans des conditions nutritionnelles contrastées afin de mieux comprendre les facteurs explicatifs de la composition des exsudats et l'impact sur le recrutement de microorganismes.

C-2 Prise en compte du métabolisme global des souches PSM : une nouvelle piste pour un screening de souches plus efficientes ?

L'un des principaux écueils rencontrés lors de l'usage de biointrants repose sur la capacité des souches testées à se maintenir dans un nouveau milieu dans lequel règne une forte compétition avec les communautés microbiennes natives, ainsi que l'ensemble de la chaine trophique (protozoaires, nématodes bactérivores, phages …). Une fois cette première étape franchie, le microorganisme apporté doit être capable de reconnaître les signaux de recrutements émis par la plante, se mouvoir par chimiotactisme, coloniser l'environnement rhizosphérique et enfin exprimer un phénotype promouvant la croissance végétale (Trivedi et al., 2020).

Nos résultats ont souligné le rôle primordial de la sélection des microorganismes d'intérêt par la plante, afin de subvenir à ses exigences nutritionnelles. Ainsi, prendre en compte le couvert végétal et son stade de développement dans le but d'isoler des souches PSM pourrait se révéler être une alternative prometteuse. Cependant, l'origine d'une souche ne garantit pas à elle seule le succès de l'expression de son potentiel sur la croissance végétale lors de son inoculation sur la même plante, ni même sa capacité à pouvoir coloniser un environnement équivalent à celui dont elle est issue. En effet, ici, la souche isolée sous colza (C12), qui était la plus prometteuse des trois souches testées, n'a pas montré d'effet sur la croissance de cette même espèce végétale ou l'acquisition de nutriments.

Les stratégies expérimentales de recherche de PSM reposant sur l'isolement de microorganismes à partir d'environnements adaptés peuvent constituer une voie privilégiée. Les résultats de nos travaux offrent une perspective différente qui repose sur l'évaluation des capacités métaboliques des isolats en temps qu'indicateurs de leur potentiel de réimplantation dans les sols. La comparaison des résultats obtenus sur la croissance des plantes et les profils métaboliques potentiels de dégradation de substrats carbonés des PSB testés (plaques GEN III Biolog®) suggère un lien entre l'expression de l'effet bénéfique de ces souches et la capacité à utiliser certains composés susceptibles d'être exsudés par le colza.

Seules les souches F23 et P2 (issues respectivement de la féverole et du pois) ont montré des effets positifs sur la croissance du colza, ayant permis une réduction de la fertilisation phosphatée de 50 %. Cependant, la souche P2 a montré des effets particulièrement délétères lorsque la fertilisation P était insuffisante. Ces deux souches étaient capables d'utiliser le malate, qui a été démontré comme étant un acide organique jouant un rôle-clef dans le recrutement de microorganismes PGPR dans la rhizosphère (Rudrappa et al., 2008).

F23 se distingue par sa capacité à métaboliser un plus grand nombre de sources de carbone, dont de nombreux sucres tels que le cellobiose, mais principalement un grand nombre d'acides carboxyliques et d'acides aminés.

Outre le fait que l'utilisation d'un grand nombre de substrats favorise la compétitivité d'une souche bactérienne dans la colonisation d'un nouveau milieu, la capacité à utiliser des acides carboxyliques et des acides aminés pouvant être exsudés par la plante hôte représente une piste d'intérêt pour sélectionner des souches PGPR à haut potentiel. En effet, la souche F23 a montré une forte capacité à se développer en utilisant en particulier le citrate et le succinate, qui sont susceptibles d'être exsudés par le colza (Shahbaz et al., 2006). Bien que l'exsudation d'acides organiques soit très largement proposée comme un moyen inhérent à la plante de solubiliser du phosphate (Gerke, 2015), il pourrait également constituer un moyen de recruter des microorganismes solubilisateurs de phosphates dans les situations de carences.

La dégradation ou l'utilisation des acides aminés est également importante à prendre en compte dans la recherche de souches PSM dans la mesure où un grand nombre de traits PSM et PGPR recherchés utilise des acides aminés comme précurseurs, ou sont dépendant de la synthèse protéique. En effet, la synthèse d'auxine est réalisée à partir du tryptophane (Spaepen et al., 2007) et la production de sidérophores comme la pyoverdine (Gasser et al., 2015).

En conclusion, la prise en compte du métabolisme bactérien dans son ensemble, et la susceptibilité à répondre à des stimuli d'origine végétale semble être des indicateurs pertinents dans la recherche de souches PGPR. Par exemple, de nouveaux milieux de criblage pourraient être élaborés en ce sens pour évaluer la motilité en réponse aux métabolites secondaires de la plante qui sont aujourd'hui considérés comme des moyens putatifs de recrutement de microorganismes d'intérêt, comme l'IAA, l'éthylène ou certains acides organiques précités (Pang et al., 2021).

L'écueil principal à l'heure actuelle dans la mise au point de tel milieu repose principalement sur le manque d'informations relative à l'exsudation des plantes. En effet, les méthodes existantes pour étudier l'exsudation racinaire impliquent d'obtenir des plantes dont les racines sont facilement accessibles : cultures en hydroponie, en rhizotrons, techniques de split-root, de percolation ou de microsuccion … Ces techniques ne permettent pas encore de récolter la totalité des composés exsudés, étant donné la variété de ceux-ci. En effet, les exsudats regroupent des composés solubles tels que les acides organiques, des sucres, des acides aminés mais également des gaz et des composés volatiles tels que les flavonoïdes, de la camalexine ou de l'éthylène (Cotton et al., 2019; Nguyen, 2003; Oburger and Jones, 2018). La composition des exsudats racinaires est particulièrement variable dans le temps, en fonction de la texture du substrat, la présence de microorganismes, ainsi que des facteurs intrinsèques à la plante comme le génotype, le stade phénologique ou son statut nutritionnel (Wichern et al., 2008). De plus, les microorganismes présents dans l'environnement racinaire vont rapidement consommer une partie de ces rhizodépots, ou encore ceux-ci vont être finalement réabsorbés par les racines (Oburger and Jones, 2018). Les limitations énoncées ci-dessus ne concernent que les composés émis par les plantes pour recruter les microorganismes, mais il convient également d'acquérir de nouvelles connaissances sur la suite de ce dialogue inter-règne. En effet, connaître la réponse des microorganismes à ces signaux pourrait également permettre de mieux sélectionner des souches d'intérêt capables d'exprimer des phénotypes promouvant la croissance végétale.

Enfin, prendre en compte l'ensemble des éléments discutés dans ce chapitre, à savoir :

- le recrutement de microorganismes PSM dont l'efficience de solubilisation répond aux exigences de la plante
- une meilleure connaissance des composés exsudés pour recruter ces microorganismes
- La réponse de ces microorganismes à l'appel de l'hôte permettrait de créer des modalités de sélection de microorganismes ciblant spécifiquement une espèce végétale, ou à plus haut potentiel d'implantation une fois utilisé au champ.

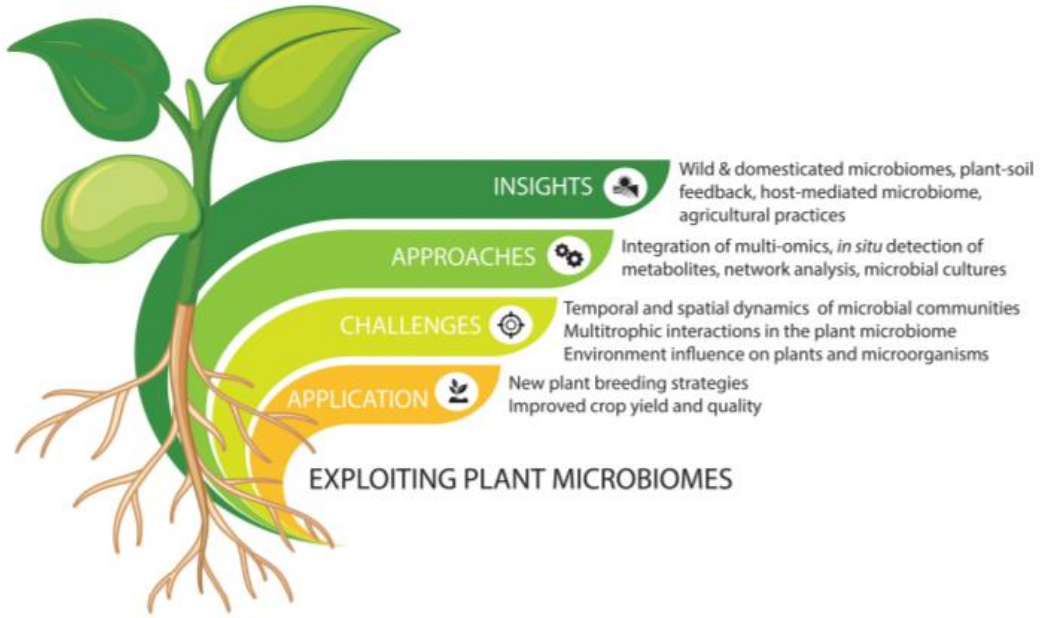


Figure 47 : Approches intégrées pour explorer et exploiter le microbiome associé à la plante pour de nouvelles stratégies agricoles (Song et al., 2020).

D. *Conclusion générale : comment modeler les sols et conditionner un état souhaitable favorable à la croissance du colza ?*

Le microbiote du sol constitue un réservoir de gènes et de fonctions bénéfiques pour soutenir la croissance et la santé des plantes. Sa manipulation représente un levier puissant pour l'amélioration de la performance des cultures (Raghavendra and Santhoshkannada, 2020; Song et al., 2020, Figure 47) et constitue ainsi une solution écologique pour une production agricole durable, par la réduction de l'apport de fertilisants d'origine chimique ou minière. La perspective de pouvoir façonner une composition désirable du microbiote racinaire pour une relation optimale entre les plantes et les microorganismes semble de plus en plus prometteuse (Verma, 2018). D'un point de vue agronomique, cette approche repose sur (Figure 48):

- La conception de systèmes de culture agroécologiques innovant par l'optimisation des successions culturales de manière à prendre en compte l'héritage du précédent ou encore l'utilisation d'une culture associée (Génard et al., 2017; Terres Inovia et al., 2019).
- L'application de biointrants, formulés en Syncoms (Synthetic Microbial Community), apportés sous forme d'enrobage ou pelliculage des semences, permettant d'obtenir des plantes avec des consortia de microorganismes associés améliorant la vigueur végétale.
- La sélection de nouvelles variétés de colza en prenant en compte les capacités de communication, de recrutement et de coopération de la plante avec des microorganismes bénéfiques.

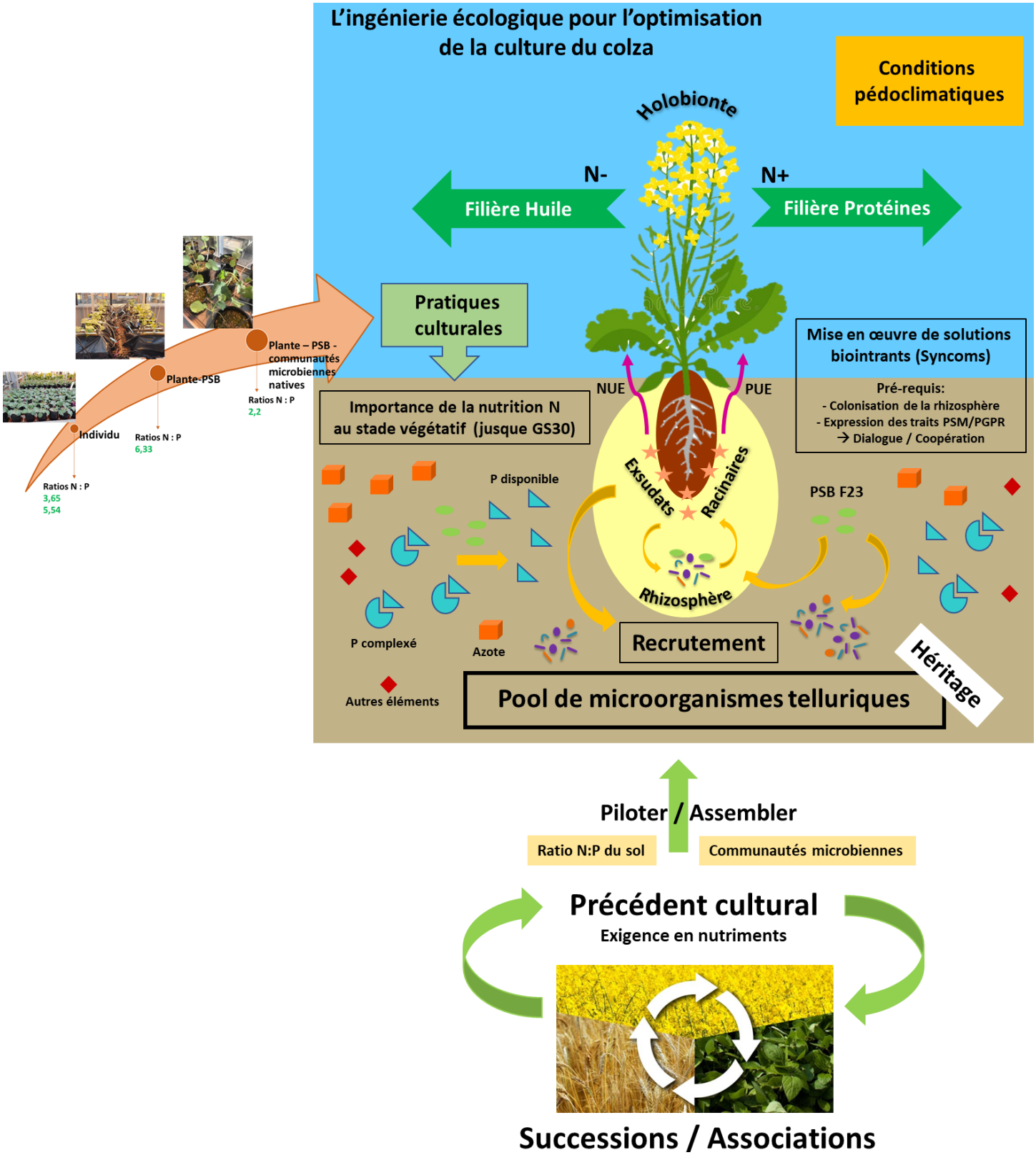


Figure 48 : schéma conceptuel du pilotage par les successions et associations des cultures, ainsi que le raisonnement des fertilisations N et P. Par le biais des exsudats racinaire permettant de recruter et d'assembler des communautés microbiennes désirables, et grâce à l'application d'un ratio de fertilisation N : P raisonné, l'instauration et la contribution de la souche F23 permet un meilleur fonctionnement des microorganismes de la rhizosphère et ainsi optimiser la croissance du colza.

L'état souhaitable d'un sol ne se résume pas uniquement à son état biologique mais également à ses caractéristiques physicochimiques. Nos résultats ont aussi démontré l'importance de la disponibilité en N et P, outre pour l'élaboration du rendement et surtout de la qualité grainière, aussi pour la mise en place d'une coopération optimale entre plantes et microorganismes. En effet, cette disponibilité doit non seulement correspondre aux besoins de la plante mais également répondre aux règles des « microbial economics » (Cleveland and Liptzin, 2007) pour assurer l'expression de fonctions bénéfiques et la coopération de tous les acteurs de l'holobionte.

A l'heure de l'agriculture de précision et du tournant vers le « smart-farming » (Hartman et al., 2018), de nouveaux outils de diagnostic et d'aide à la prise de décision au champ pourraient permettre de piloter en temps réel et d'ajuster la fertilisation en prenant en compte l'hétérogénéité de la parcelle. L'utilisation d'outils portatifs ou embarqués, voire d'imagerie satellitaire (Vaudour et al., 2019), et non destructifs permettant d'obtenir instantanément le statut N et P des plantes en croissance ou encore l'état bio-physico-chimique des sols pourrait permettre d'évaluer l'utilité et la pertinence de nouveaux apports de fertilisants et biointrants. Parmi ces outils, l'usage de capteurs basés sur des mesures de réflectance (système NIRS), de capteurs de type fluorimètre (Multiplex©) et d'analyseurs directs des teneurs en éléments minéraux (par XRF (fluorescence à rayons X) pourraient se révéler particulièrement utiles. Dans cette dynamique, en s'appuyant sur la compréhension des relations sols-plantes-microorganismes, les avancées scientifiques favoriseront la transition agroécologique de l'Agriculture.

Références bibliographiques

Agreste, 2011. Les charges en agriculture. Les Dossiers 12, 19–25.

Agridea, 2009. Colza - Culture.

Agro-BASF, 2020. Cours et marchés agricoles, prix agricoles [WWW Document]. URL https://www.agro.basf.fr/fr/aide_a_la_decision/informations_economiques/cours_et_marches/ (accessed 10.27.20).

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001

Alimentation humaine, animale, chimie verte : les débouchés du colza sont nombreux | Florilege [WWW Document], n.d. URL http://florilege.arcad-project.org/fr/dossiers/colza?page=2 (accessed 11.2.21).

Allan, W.L., 2010. Studies on the roles and regulation of two glyoxylate reductases in plants. Library and Archives Canada = Bibliothèque et Archives Canada, Ottawa.

Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Front. Microbiol. 8, 971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971

Altieri, M.A., 2002. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. Agriculture, Ecosystems & Environment 93, 1–24. https://doi.org/10.1016/S0167-8809(02)00085-3

Aminpanah, H., 2013. Effect of nitrogen rate on seed yield, protein and oil content of two canola (Brassica napus L.) cultivars / VPLIV GNOJENJA Z DUŠIKOM NA PRIDELEK SEMEN, VSEBNOST BELJAKOVIN IN OLJA PRI DVEH SORTAH OLJNE OGRŠČICE (Brassica napus L.). Acta agriculturae Slovenica 101, 1–8. https://doi.org/10.2478/acas-2013-0014

Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Kudoyarova, G.R., 2005. Ability of bacterium Bacillus subtilis to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant Soil 272, 201–209. https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x

Avice, J.-C., Etienne, P., 2014. Leaf senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (Brassica napus L.). J. Exp. Bot. 65, 3813–3824. https://doi.org/10.1093/jxb/eru177

Babu-Khan, S., Yeo, T.C., Martin, W.L., Duron, M.R., Rogers, R.D., Goldstein, A.H., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from Pseudomonas cepacia. Appl Environ Microbiol 61, 972–978.

Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. Plant, Cell & Environment 32, 666–681. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x

Bakker, P., Berendsen, R., Doornbos, R., Wintermans, P., Pieterse, C., 2013. The rhizosphere revisited: root microbiomics. Frontiers in Plant Science 4, 165. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165

Banerjee, M.R., Yesmin, L., 2004. BioBoost: a new sulfur-oxidizing bacterial inoculant for canola.

Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., El Enshasy, H., 2021. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. Sustainability 13, 1140. https://doi.org/10.3390/su13031140

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C.C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G.H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J.A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G.S., Selvin, J., Souza, R.S.C. de, van Overbeek, L., Singh, B.K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., Schloter, M., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Microbiome 8, 103. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0

Bolland, M.D.A., Brennan, R.F., 2008. Comparing the phosphorus requirements of wheat, lupin, and canola. Aust. J. Agric. Res. 59, 983. https://doi.org/10.1071/AR07430

Bolland, M.D.A., Siddique, K.H.M., Loss, S.P., Baker, M.J., 1999. Comparing responses of grain legumes, wheat and canola to applications of superphosphate 19.

Bouchet, A.-S., Laperche, A., Bissuel-Belaygue, C., Snowdon, R., Nesi, N., Stahl, A., 2016. Nitrogen use efficiency in rapeseed. A review. Agron. Sustain. Dev. 36, 38. https://doi.org/10.1007/s13593-016-0371-0

Braun, V., 1997. Avoidance of iron toxicity through regulation of bacterial iron transport. Biol Chem 378, 779–786.

Brennan, R.F., Mason, M.G., Walton, G.H., 2000. Effect of nitrogen fertilizer on the concentrations of oil and protein in canola (*brassica napus)* seed. Journal of Plant Nutrition 23, 339–348. https://doi.org/10.1080/01904160009382020

Bressan, M., Roncato, M.-A., Bellvert, F., Comte, G., Haichar, F. el Z., Achouak, W., Berge, O., 2009. Exogenous glucosinolate produced by Arabidopsis thaliana has an impact on microbes in the rhizosphere and plant roots. ISME J 3, 1243–1257. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.68

Breure, A.M., 2004. SOIL BIODIVERSITY: MEASUREMENTS, INDICATORS, THREATS AND SOIL FUNCTIONS 14.

Brundtland, C. mondiale de l'environnement et du, Brundtland, G.H., Khalid, M., 1988. Notre avenir à tous. Editions du Fleuve, Montréal, QC, CA.

Cellier, P., 2011. CASCADE DE L'AZOTE : ENJEUX POUR LA FERTILISATION. Presented at the 10èmes rencontres du COMIFER, p. 10.

CETIOM, 2015. Récupération des menues pailles de colza : état des lieux des solutions techniques 3.

Chadwick, A.V., Burg, S.P., 1970. Regulation of Root Growth by Auxin-Ethylene Interaction. Plant Physiol. 45, 192–200. https://doi.org/10.1104/pp.45.2.192

Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., 2015. La métagénomique: Développements et futures applications. Quae.

Christensen, J.V., Hennig, A.M.F., McKENZIE, J.S., Legge, W.G., DePAUW, R.M., Siemens, B., Thomas, J.B., 1985. EFFECT OF SEEDING DATE, NITROGEN AND PHOSPHATE FERTILIZER ON GROWTH, YIELD AND QUALITY OF RAPESEED IN NORTHWEST ALBERTA. Can. J. Plant Sci. 65, 275–284. https://doi.org/10.4141/cjps85-040

CITEPA, 2020. 2020-so2 [WWW Document]. Citepa. URL https://www.citepa.org/fr/2020-so2/ (accessed 10.28.21).

Cleveland, C.C., Liptzin, D., 2007. C : N : P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? Biogeochemistry 85, 235–252. https://doi.org/10.1007/s10533-007-9132-0

COMIFER, 1995. Aide au diagnostic et à la prescription de la fertilisation phosphatée et potassique des grandes cultures.

Cornah, J.E., Smith, S.M., 2002. Synthesis and Function of Glyoxylate Cycle Enzymes, in: Baker, A., Graham, I.A. (Eds.), Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 57–101. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9858-3_3

Costerton, J., 1999. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents 11, 217–221. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7

Cotton, T.E.A., Pétriacq, P., Cameron, D.D., Meselmani, M.A., Schwarzenbacher, R., Rolfe, S.A., Ton, J., 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. ISME J 13, 1647–1658. https://doi.org/10.1038/s41396-019-0375-2

de Groot, C.C., Marcelis, L.F.M., Lambers, H., 2003. Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth 12.

Demers, I., 2008. Formes et disponibilité du phosphore des composts utilisés comme amendements des sols agricoles (PhD Thesis). Université Laval.

Desbois, D., Legris, B., 2007. Prix et coûts de production de six grandes cultures: blé, maïs, colza, tournesol, betterave et pomme de terre. L’agriculture, nouveaux défis, Insee Références.

Directive nitrates, 1991. , Journal officiel de l’Union européenne.

Dissanayaka, D.M.S.B., Ghahremani, M., Siebers, M., Wasaki, J., Plaxton, W.C., 2021. Recent insights into the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. Journal of Experimental Botany 72, 199–223. https://doi.org/10.1093/jxb/eraa482

Dutta, S., Podile, A.R., 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. Critical Reviews in Microbiology 36, 232–244. https://doi.org/10.3109/10408411003766806

Elser, J.J., 2012. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? Curr. Opin. Biotechnol. 23, 833–838. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.001

Erisman, J.W., Sutton, M.A., Galloway, J., Klimont, Z., Winiwarter, W., 2008. How a century of ammonia synthesis changed the world. Nature Geosci 1, 636–639. https://doi.org/10.1038/ngeo325

FAO, Bruinsma, J. (Eds.), 2003. World agriculture: towards 2015/2030: an FAO perspective. Earthscan Publications, London.

Fetzer, A., Müller, K., Schmid, M., Eisner, P., 2020. Rapeseed proteins for technical applications: Processing, isolation, modification and functional properties – A review. Industrial Crops and Products 158, 112986. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112986

Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. PNAS 103, 626–631. https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103

Gao, L., Caldwell, C.D., Jiang, Y., 2018. Photosynthesis and Growth of Camelina and Canola in Response to Water Deficit and Applied Nitrogen. Crop Science 58, 393–401. https://doi.org/10.2135/cropsci2017.07.0406

Gasser, V., Guillon, L., Cunrath, O., Schalk, Isabelle.J., 2015. Cellular organization of siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa: Evidence for siderosomes. Journal of Inorganic Biochemistry, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC 12) in Zurich, Switzerland, August 24-28, 2014 148, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.01.017

Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B., von Wirén, N., 1999. Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. The Plant Cell 11, 937–947. https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.937

Ge, Z., Rubio, G., Lynch, J., 2012. The importance of root gravitropism for inter-root competition and phosphorus acquisition efficiency: Results from a geometric simulation model. Plant and Soil 218, 159–171. https://doi.org/10.1023/A:1014987710937

Génard, T., Etienne, P., Diquélou, S., Yvin, J.-C., Revellin, C., Laîné, P., 2017. Rapeseed-legume intercrops: plant growth and nitrogen balance in early stages of growth and development. Heliyon 3, e00261. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00261

Gerke, J., 2015. The acquisition of phosphate by higher plants: Effect of carboxylate release by the roots. A critical review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 178, 351–364. https://doi.org/10.1002/jpln.201400590

Girondé, A., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., Orsel, M., Niogret, M.-F., Nesi, N., Carole, D., Soulay, F., Masclaux-Daubresse, C., Avice, J.-C., 2015a. The contrasting N management of two oilseed rape genotypes reveals the mechanisms of proteolysis associated with leaf N remobilization and the respective contributions of leaves and stems to N storage and remobilization during seed filling. BMC Plant Biol 15, 59. https://doi.org/10.1186/s12870-015-0437-1

Girondé, A., Poret, M., Etienne, P., Trouverie, J., Bouchereau, A., Le Cahérec, F., Leport, L., Orsel, M., Niogret, M.-F., Deleu, C., Avice, J.-C., 2015b. A profiling approach of the natural variability of foliar N remobilization at the rosette stage gives clues to understand the limiting processes involved in the low N use efficiency of winter oilseed rape. Journal of Experimental Botany 66, 2461–2473. https://doi.org/10.1093/jxb/erv031

Gkarmiri, K., Mahmood, S., Ekblad, A., Alström, S., Högberg, N., Finlay, R., 2017. Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere Soil of Oilseed Rape. Appl. Environ. Microbiol. 83. https://doi.org/10.1128/AEM.01938-17

Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B., 2007. Promotion of Plant Growth by Bacterial ACC Deaminase. Critical Reviews in Plant Sciences 26, 227–242. https://doi.org/10.1080/07352680701572966

Gniazdowska, A., Rychter, A.M., 2000. Nitrate uptake by bean (Phaseolus vulgaris L.) roots under phosphate deficiency. Plant and Soil 226, 79–85.

Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food & Agriculture 2. https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500

Gregory, P.J., 2011. Crop Root Systems and Nutrient Uptake from Soils, in: Hawkesford, lcolm J., Barraclough, P. (Eds.), The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops. Wiley-Blackwell, pp. 21–45. https://doi.org/10.1002/9780470960707.ch2

Grizzetti, B., Billen, G., Davidson, E.A., Winiwarter, W., de Vries, W., Fowler, D., Howard, C.M., Bleeker, A., Sutton, M.A., Lassaletta, L., Garnier, J., 2020. Global Nitrogen and Phosphorus Pollution, in: Sutton, M.A., Mason, K.E., Bleeker, A., Hicks, W.K., Masso, C., Raghuram, N., Reis, S., Bekunda, M. (Eds.), Just Enough Nitrogen. Springer International Publishing, Cham, pp. 421–431. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58065-0_28

Grubb, C.D., Abel, S., 2006. Glucosinolate metabolism and its control. Trends in Plant Science 11, 89–100. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.12.006

Guiboileau, A., Sormani, R., Meyer, C., Masclaux-Daubresse, C., 2010. Senescence and death of plant organs: Nutrient recycling and developmental regulation. Comptes Rendus Biologies, Développement végétatif des plantes 333, 382–391. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.01.016

Gupta, S.K., Pratap, A., 2007. History, Origin, and Evolution, in: Advances in Botanical Research, Rapeseed Breeding. Academic Press, pp. 1–20. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(07)45001-7

Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy, A.C., Dangl, J.L., Knight, R., Ley, R., Schulze-Lefert, P., 2015. Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. Cell Host & Microbe 17, 603–616. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009

Hartley, T.N., Macdonald, A.J., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., 2013. Historical arsenic contamination of soil due to long-term phosphate fertiliser applications. Environmental Pollution 180, 259–264. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.034

Hawkesford, M.J., 2011. An Overview of Nutrient Use Efficiency and Strategies for Crop Improvement, in: Hawkesford, lcolm J., Barraclough, P. (Eds.), The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops. Wiley-Blackwell, pp. 3–19. https://doi.org/10.1002/9780470960707.ch1

Hawkesford, M.J., Barraclough, P., 2011. The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops. John Wiley & Sons.

Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M., 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. Soil Sci. Plant Nutr. 54, 33–45. https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x

He, W.-M., Yu, F.-H., Zhang, L.-L., 2010. Physiological integration impacts nutrient use and stoichiometry in three clonal plants under heterogeneous habitats. Ecol Res 25, 967–972. https://doi.org/10.1007/s11284-010-0724-0

Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S., 1982. Changes in Inorganic and Organic Soil Phosphorus Fractions Induced by Cultivation Practices and by Laboratory Incubations. Soil Science Society of America Journal 46, 970–976. https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600050017x

Helfenstein, J., Tamburini, F., von Sperber, C., Massey, M.S., Pistocchi, C., Chadwick, O.A., Vitousek, P.M., Kretzschmar, R., Frossard, E., 2018. Combining spectroscopic and isotopic techniques gives a dynamic view of phosphorus cycling in soil. Nature Communications 9. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05731-2

Hill, S.B., MacRae, R.J., 1996. Conceptual Framework for the Transition from Conventional to Sustainable Agriculture. Journal of Sustainable Agriculture 7, 81–87. https://doi.org/10.1300/J064v07n01_07

HILTNER, L., 1904. Uber nevere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Boden Bakteriologie und unter besonderer Beurchsichtigung der Grundungung und Broche. Arbeit. Deut. Landw. Ges. Berlin 98, 59–78.

Hinsinger, P., Marschner, P., 2006. Rhizosphere—perspectives and Challenges—a Tribute to Lorenz Hiltner 12–17 September 2004—Munich, Germany. Plant Soil 283, vii–viii. https://doi.org/10.1007/s11104-006-0057-5

Honvault, N., Houben, D., Nobile, C., Firmin, S., Lambers, H., Faucon, M.-P., 2020. Tradeoffs among phosphorus-acquisition root traits of crop species for agroecological intensification. Plant Soil 14. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04584-3

Illmer, P., Schinner, F., 1995. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates-Solubilization Mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27, 257–263. https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C

Isidra-Arellano, M.C., Delaux, P.-M., Valdés-López, O., 2021. The Phosphate Starvation Response System: its role in the regulation of plant-microbe interactions. Plant Cell Physiol. https://doi.org/10.1093/pcp/pcab016

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., Kopriva, S., 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617

Jarrige, F., Roux, T.L., 2017. La contamination du monde. Une histoire des pollutions à l'âge industriel. Le Seuil.

Kojima, S., Bohner, A., Gassert, B., Yuan, L., Wirén, N. von, 2007. AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. The Plant Journal 52, 30–40. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03223.x

Kumar, Ajay, Kumar, Amit, Devi, S., Patil, S., Payal, C., Negi, S., 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. Recent Research in Science and Technology 5.

Kuzyakov, Y., Mason-Jones, K., 2018. Viruses in soil: Nano-scale undead drivers of microbial life, biogeochemical turnover and ecosystem functions. Soil Biology and Biochemistry 127, 305–317. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.032

Lally, R.D., Galbally, P., Moreira, A.S., Spink, J., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N., 2017. Application of Endophytic Pseudomonas fluorescens and a Bacterial Consortium to Brassica napus Can Increase Plant Height and Biomass under Greenhouse and Field Conditions. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02193

Li, H., Ding, X., Chen, C., Zheng, X., Han, H., Li, C., Gong, J., Xu, T., Li, Q.X., Ding, G., Li, J., 2019. Enrichment of phosphate solubilizing bacteria during late developmental stages of eggplant (*Solanum melongena* L.). FEMS Microbiology Ecology 95. https://doi.org/10.1093/femsec/fiz023

Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C., 2016. The healthy human microbiome. Genome Med 8, 51. https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y

Lougheed, T., 2011. Phosphorus Paradox Scarcityand Overabundance of a Key Nutrient. Environ Health Perspect 119, A208–A213.

Malagoli, P., 2005. Dynamics of Nitrogen Uptake and Mobilization in Field-grown Winter Oilseed Rape (Brassica napus) from Stem Extension to Harvest: I. Global N Flows between Vegetative and Reproductive Tissues in Relation to Leaf Fall and their Residual N. Annals of Botany 95, 853–861. https://doi.org/10.1093/aob/mci091

Manzoni, S., Čapek, P., Mooshammer, M., Lindahl, B.D., Richter, A., Šantrůčková, H., 2017. Optimal metabolic regulation along resource stoichiometry gradients. Ecol Lett 20, 1182–1191. https://doi.org/10.1111/ele.12815

Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Annals of Botany 105, 1141–1157. https://doi.org/10.1093/aob/mcq028

Medici, A., Szponarski, W., Dangeville, P., Safi, A., Dissanayake, I.M., Saenchai, C., Emanuel, A., Rubio, V., Lacombe, B., Ruffel, S., Tanurdzic, M., Rouached, H., Krouk, G., 2019. Identification of Molecular Integrators Shows that Nitrogen Actively Controls the Phosphate Starvation Response in Plants. The Plant Cell 31, 1171–1184. https://doi.org/10.1105/tpc.18.00656

Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, T.S., Blackwell, M., Stutter, M., Shand, C., Lumsdon, D., Cooper, P., Wendler, R., Brown, L., Almeida, D.S., Wearing, C., Zhang, H., Haygarth, P.M., 2017. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus from agricultural soils: a review. Plant and Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3362-2

Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-Being: Desertification Synthesis.

Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2020. Plan de relance : Transition agricole, alimentation et forêt.

Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2013. Qu'est-ce que l'agro-écologie ? URL http://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-lagro-ecologie (accessed 11.29.16).

Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2012. Projet Agroécologique pour la France.

Molina-Roco, M., Escudey, M., Antilén, M., Arancibia-Miranda, N., Manquián-Cerda, K., 2018. Distribution of contaminant trace metals inadvertently provided by phosphorus fertilisers: movement, chemical fractions and mass balances in contrasting acidic soils. Environ Geochem Health 40, 2491–2509. https://doi.org/10.1007/s10653-018-0115-y

Moreau, D., Pivato, B., Bru, D., Busset, H., Deau, F., Faivre, C., Matejicek, A., Strbik, F., Philippot, L., Mougel, C., 2015. Plant traits related to nitrogen uptake influence plant-microbe competition. Ecology 96, 2300–2310. https://doi.org/10.1890/14-1761.1

Morel, C., Buttler, F., Castillon, P., Champolivier, L., Denoroy, P., DUVAL, R., HANOCQ, D., KOUASSI, A.S., KVARNSTRÖM, E., MESSIGA, A., 2011. Gestion à long terme de la dynamique du phosphore dans les sols cultivés. Les 10èmes rencontres de la fertilisation raisonnée et de l'analyse de la terre du GEMAS et du COMIFER. Reims 23.

Motavalli, P., Miles, R., 2002. Soil phosphorus fractions after 111 years of animal manure and fertilizer applications. Biology and Fertility of Soils 36, 35–42. https://doi.org/10.1007/s00374-002-0500-6

Nadeem, S.M., Naveed, M., Zahir, Z.A., Asghar, H.N., 2013. Plant–Microbe Interactions for Sustainable Agriculture: Fundamentals and Recent Advances, in: Arora, N.K. (Ed.), Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. Springer India, New Delhi, pp. 51–103. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_2

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G., 2011. Role of Phosphatase Enzymes in Soil, in: Bünemann, E., Oberson, A., Frossard, E. (Eds.), Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling, Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 215–243. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9

Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170, 265–270.

Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. Agronomie 23, 375–396. https://doi.org/10.1051/agro:2003011

Noodén, L.D., Guiamét, J.J., John, I., 2004. 15 - Whole Plant Senescence, in: Noodén, L.D. (Ed.), Plant Cell Death Processes. Academic Press, San Diego, pp. 227–244. https://doi.org/10.1016/B978-012520915-1/50018-7

Oburger, E., Jones, D.L., 2018. Sampling root exudates – Mission impossible? Rhizosphere 6, 116–133. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004

Ohlrogge, J., Browse, J., 1995. Lipid biosynthesis. Plant Cell 7, 957–970.

O'Loughlin, C.T., Miller, L.C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks Pseudomonas aeruginosa virulence and biofilm formation. PNAS 110, 17981–17986. https://doi.org/10.1073/pnas.1316981110

ONU, 2017. World Population Prospects - Population Division - United Nations [WWW Document]. URL https://esa.un.org/unpd/wpp/Graphs/DemographicProfiles/ (accessed 11.27.17).

Öztürk, Ö., 2010. Effects of Source and Rate of Nitrogen Fertilizer on Yield, Yield Components and Quality of Winter Rapeseed (Brassica napus L.). Chilean J. Agric. Res. 70. https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000100014

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., Cheng, Y., 2021. Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. Front. Plant Sci. 12. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276

Park, K.-H., Lee, C.-Y., Son, H.-J., 2009. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by Pseudomonas fluorescens RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. Lett. Appl. Microbiol. 49, 222–228. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x

Payne, S.M., 1993. Iron acquisition in microbial pathogenesis. Trends in Microbiology 1, 66–69. https://doi.org/10.1016/0966-842X(93)90036-Q

Peyronnet, C., Lacampagne, J.-P., Le Cadre, P., Pressenda, F., 2014. Les sources de protéines dans l'alimentation du bétail en France : la place des oléoprotéagineux. OCL 21, D402. https://doi.org/10.1051/ocl/2014012

Piazza, G.J., Foglia, T.A., 2001. Rapeseed oil for oleochemical usage. European Journal of Lipid Science and Technology 103, 450–454. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200107)103:73.0.CO;2-D

Pikovskaya, R., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologia 362–370.

Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., Waithaisong, K., Lesueur, D., Blanchard, E., Chapuis-Lardy, L., Hinsinger, P., 2015. Améliorer la biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol ? Innovations Agronomiques 115–138.

Podile, A.R., Vukanti, R., Ankati, S., Kalam, S., Dutta, S., Durgeshwar, P., Vaikuntapu, P., 2014. Root Colonization and Quorum Sensing are the Driving forces of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (pgpr) for Growth Promotion. Proceedings of the Indian National Science Academy 80, 407. https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/55117

Production et consommation de viande, lait, œufs | Viande : impact sur l'environnement, la santé et les animaux [WWW Document], 2020. URL https://www.viande.info/viande-lait-oeuf (accessed 9.28.20).

Qin, L., Walk, T.C., Han, P., Chen, L., Zhang, S., Li, Y., Hu, X., Xie, L., Yang, Y., Liu, J., Lu, X., Yu, C., Tian, J., Shaff, J.E., Kochian, L.V., Liao, X., Liao, H., 2019. Adaption of Roots to Nitrogen Deficiency Revealed by 3D Quantification and Proteomic Analysis. Plant Physiology 179, 329–347. https://doi.org/10.1104/pp.18.00716

Quiquampoix, H., Burns, R., 2007. Interactions between Proteins and Soil Mineral Surfaces: Environmental and Health Consequences. Elements 3. https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.3.6.401

Raboy, V., Noaman, M.M., Taylor, G.A., Pickett, S.G., 1991. Grain Phytic Acid and Protein are Highly Correlated in Winter Wheat. Crop Sci. 31, 631–635. https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100030017x

Raghavendra, M.P., Santhoshkannada, A.N., 2020. Role of Rhizomicrobiome in Maintaining Soil Fertility and Crop Production, in: Giri, B., Varma, A. (Eds.), Soil Health, Soil Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 373–401. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1_19

Raghothama, K.G., Karthikeyan, A.S., 2005. Phosphate Acquisition. Plant Soil 274, 37–49. https://doi.org/10.1007/s11104-004-2005-6

Rashid, A., Bughio, N., 1993. Evaluating internal phosphorus requirement of rapeseed, chickpea, lentil, and wheat by seed analysis. Communications in Soil Science and Plant Analysis 24, 1359–1369. https://doi.org/10.1080/00103629309368882

Rathke, G.-W., Christen, O., Diepenbrock, W., 2005. Effects of nitrogen source and rate on productivity and quality of winter oilseed rape (Brassica napus L.) grown in different crop rotations. Field Crops Research 94, 103–113. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.11.010

Reau, R., Bodet, J.-M., Bordes, J.-P., Dore, T., Ennaifar, S., Moussart, A., Nicolardot, B., Pellerin, S., Plenchette, C., Quinsac, A., Sausse, C., Seguin, B., Tivoli, B., 2005. Effets allélopathiques des Brassicacées via leurs actions sur les agents pathogènes telluriques et les mycorhizes : analyse bibliographique. Partie 1. Oléagineux, Corps gras, Lipides 12, 261–271. https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0261

Rengel, Z., Marschner, P., 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01558.x

Reta, G., Dong, X., Li, Z., Su, B., Hu, X., Bo, H., Yu, D., Wan, H., Liu, J., Li, Y., Xu, G., Wang, K., Xu, S., 2018. Environmental impact of phosphate mining and beneficiation: review. IJH 2. https://doi.org/10.15406/ijh.2018.02.00106

Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., Trinsoutrot-Gattin, I., 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. Environ. Chem. Lett. 12, 257–273. https://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2

Richardson, A.E., Barea, J.-M., McNeill, A.M., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil 321, 305–339. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2

Rijavec, T., Lapanje, A., 2016. Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. Frontiers in Microbiology 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785

Rossato, L., LaineÂ, P., Ourry, A., 2001. Nitrogen storage and remobilization in Brassica napus L. during the growth cycle: nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns 9.

Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W., Bais, H.P., 2008. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. Plant Physiol. 148, 1547–1556. https://doi.org/10.1104/pp.108.127613

Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Martin, F., Clément-Vidal, A., Marshall-Colon, A., Ruffel, S., Gaymard, F., Rouached, H., Leclercq, J., Coruzzi, G., Lacombe, B., Krouk, G., 2021. GARP transcription factors repress Arabidopsis nitrogen starvation response via ROS-dependent and -independent pathways. Journal of Experimental Botany 72, 3881–3901. https://doi.org/10.1093/jxb/erab114

Sasse, J., Martinoia, E., Northen, T., 2018. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? Trends in Plant Science 23, 25–41. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003

Sattari, S.Z., Bouwman, A.F., Giller, K.E., van Ittersum, M.K., 2012. Residual soil phosphorus as the missing piece in the global phosphorus crisis puzzle. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 6348–6353. https://doi.org/10.1073/pnas.1113675109

Sausse, C., Cerrutti, N., Hebinger, H., 2012. Impact du colza sur l'environnement : évaluation et limites méthodologiques. OCL 19, 155–163. https://doi.org/10.1051/ocl.2012.0454

Saxena, A.K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., Bagyaraj, D.J., 2020. Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. Journal of Applied Microbiology 128, 1583–1594. https://doi.org/10.1111/jam.14506

Schjoerring, J.K., Bock, J.G.H., Gammelvind, L., Jensen, C.R., Mogensen, V.O., 1995. Nitrogen incorporation and remobilization in different shoot components of field-grown winter oilseed rape (Brassica napus L) as affected by rate of nitrogen application and irrigation. Plant Soil 177, 255–264. https://doi.org/10.1007/BF00010132

Schloss, P.D., Handelsman, J., 2006. Toward a Census of Bacteria in Soil. PLOS Computational Biology 2, e92. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092

Schneider, A., Huyghe, C., 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires. Editions Quae.

Schütz, L., Gattinger, A., Meier, M., Müller, A., Boller, T., Mäder, P., Mathimaran, N., 2018. Improving Crop Yield and Nutrient Use Efficiency via Biofertilization—A Global Meta-analysis. Frontiers in Plant Science 8. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02204

Secco, D., Wang, C., Arpat, B.A., Wang, Z., Poirier, Y., Tyerman, S.D., Wu, P., Shou, H., Whelan, J., 2012. The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. New Phytologist 193, 842–851. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04002.x

Seepaul, R., George, S., Wright, D.L., 2016. Comparative response of Brassica carinata and B. napus vegetative growth, development and photosynthesis to nitrogen nutrition. Industrial Crops and Products 94, 872–883. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.054

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. Cell 164, 337–340. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013

Shahbaz, A.M., Oki, Y., Adachi, T., Murata, Y., Khan, M.H.R., 2006. Phosphorus starvation induced root-mediated pH changes in solublization and acquisition of sparingly soluble P sources and organic acids exudation by *Brassica* cultivars. Soil Science and Plant Nutrition 52, 623–633. https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00082.x

Siebers, M., Rohr, T., Ventura, M., Schütz, V., Thies, S., Kovacic, F., Jaeger, K.-E., Berg, M., Dörmann, P., Schulz, M., 2018. Disruption of microbial community composition and identification of plant growth promoting microorganisms after exposure of soil to rapeseed-derived glucosinolates. PLoS One 13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200160

Simopoulos, A.P., 2016. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. Nutrients 8, 128. https://doi.org/10.3390/nu8030128

Simopoulos, A.P., 2010. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. OCL 17, 267–275. https://doi.org/10.1051/ocl.2010.0325

Smil, V., 1999. Detonator of the population explosion. Nature 400, 415–415. https://doi.org/10.1038/22672

Sokolov, A., 1968. Determination of Reserves of Available Phosphates in Soil Their Composition and Mobility. Soviet Soil Science-Ussr 1037-.

Song, C., Zhu, F., Carrión, V.J., Cordovez, V., 2020. Beyond Plant Microbiome Composition: Exploiting Microbial Functions and Plant Traits via Integrated Approaches. Front. Bioeng. Biotechnol. 8, 896. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00896

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31, 425–448. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x

Spohn, M., Zavišić, A., Nassal, P., Bergkemper, F., Schulz, S., Marhan, S., Schloter, M., Kandeler, E., Polle, A., 2018. Temporal variations of phosphorus uptake by soil microbial biomass and young beech trees in two forest soils with contrasting phosphorus stocks. Soil Biology and Biochemistry 117, 191–202. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.019

Strigul, N.S., Kravchenko, L.V., 2006. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. Environmental Modelling & Software 21, 1158–1171. https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2005.06.003

Suresha, G.S., Kumar, S., Santha, I.M., 2013. Functional expression of Brassica juncea oleate desaturase gene (Bjfad2) in Escherichia coli. Biologia 68, 599–605. https://doi.org/10.2478/s11756-013-0212-4

Syers, J.K., Johnston, A.E., Curtin, D., 2009. Efficiency of Soil and Fertilizer Phosphorus Use: Reconciling Changing Concepts of Soil Phosphorus Behaviour with Agronomic Information. Experimental Agriculture 45, 128. https://doi.org/10.1017/S0014479708007138

Taylor, M.D., Percival, H.J., 2001. Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertiliser bin. Environmental Pollution 113, 35–40. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00170-6

Teixeira, G.C.M., Prado, R. de M., Rocha, A.M.S., Piccolo, M. de C., 2020. Root- and foliar-applied silicon modifies C: N: P ratio and increases the nutritional efficiency of pre-sprouted sugarcane seedlings under water deficit. PLoS ONE 15, e0240847. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240847

Terres Inovia, 2019a. Colza : des besoins en azote élevés [WWW Document]. Terres Inovia. URL https://www.terresinovia.fr/-/colza-des-besoins-en-azote-eleves (accessed 10.14.21).

Terres Inovia, 2019b. Fertilisation du colza : phosphore et potasse [WWW Document]. Terres Inovia. URL https://www.terresinovia.fr/-/fertilisation-du-colza-phosphore-et-potasse (accessed 10.14.21).

Terres Inovia, 2017. Stades repères du colza [WWW Document]. Terres Inovia l'agronomie en mouvement. URL http://www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/atouts-rendez-vous/stades-reperes/ (accessed 10.13.17).

Terres Inovia, Sauzet, G., Cadoux, S., 2019. Bénéfices et conduite du colza associé à des légumineuses [WWW Document]. Terres Inovia. URL https://www.terresinovia.fr/-/benefices-et-conduite-du-colza-associe-a-des-legumineuses (accessed 10.19.21).

Terres Univia, 2020a. Surfaces, rendements, productions et débouchés - Statistiques - Réglementation & marchés - Terres Univia [WWW Document]. URL http://www.terresunivia.fr/reglementation-marches/statistiques/surfaces-rendements-productions-et-debouches (accessed 10.27.20).

Terres Univia, 2020b. Culture du colza en France : toute la filière mobilisée pour garantir des perspectives durables de création de valeur et inciter les agriculteurs à faire le choix du colza.

Terres Univia, 2018. Chiffres clés : plantes riches en protéines -2017-.

Terres Univia, n.d. Graines oléagineuses - Alimentation animale - Produits/Débouchés - Terres Univia [WWW Document]. URL http://www.terresunivia.fr/produitsdebouches/alimentation-animale/graines-oleagineuses (accessed 10.27.20).

The Human Microbiome Project Consortium, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486, 207–214. https://doi.org/10.1038/nature11234

Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., Liu, X., 2021. Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. Biology 10, 158. https://doi.org/10.3390/biology10020158

Tilsner, J., Kassner, N., Struck, C., Lohaus, G., 2005. Amino acid contents and transport in oilseed rape (Brassica napus L.) under different nitrogen conditions. Planta 221, 328–338. https://doi.org/10.1007/s00425-004-1446-8

Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nat Rev Microbiol 18, 607–621. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1

U, N., Nagaharu, N., 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization.

UNIFA, 2017. Engrais azotés [WWW Document]. Parlons fertilisation. URL http://fertilisation-edu.fr/production-ressources/engrais-azotes.html (accessed 11.28.17).

UNIFA, n.d. Fiche pratique - culture du Colza- [WWW Document]. URL http://fertilisation-edu.fr/cultures-fiches-pratiques/colza.html (accessed 6.4.17).

USDA, 2021. Oilseeds: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service [WWW Document]. URL https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade (accessed 9.3.21).

Vance, C.P., 2001. Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiol 127, 390–397.

Verma, J.P., 2018. Functional importance of the plant microbiome: Implications for agriculture, forestry and bioenergy: A book review. Journal of Cleaner Production 178, 877–879. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.043

Wichern, F., Eberhardt, E., Mayer, J., Joergensen, R.G., Mueller, T., 2008. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. Soil Biol. Biochem. 40, 30–48. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.08.010

World Population Prospects - Population Division - United Nations [WWW Document], n.d. URL https://population.un.org/wpp/DataQuery/ (accessed 9.30.20).

Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U.N., Shi, S., Cho, H., Karaoz, U., Loqué, D., Bowen, B.P., Firestone, M.K., Northen, T.R., Brodie, E.L., 2018. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. Nat Microbiol 3, 470–480. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3

Zhao, F.J., Withers, P.J.A., Evans, E.J., Monaghan, J., Salmon, S.E., Shewry, P.R., McGrath, S.P., 1997. Sulphur nutrition: An important factor for the quality of wheat and rapeseed. Soil Science and Plant Nutrition 43, 1137–1142. https://doi.org/10.1080/00380768.1997.11863731

Zhao, L., Liu, F., Crawford, N.M., Wang, Y., 2018. Molecular Regulation of Nitrate Responses in Plants. International Journal of Molecular Sciences 19, 2039. https://doi.org/10.3390/ijms19072039

Zimmermann, P., Zentgraf, U., 2005. THE CORRELATION BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND LEAF SENESCENCE DURING PLANT DEVELOPMENT # 10, 20.

Annexe 1 : Communication affichée au 6ème congrès international Phosphorus in Plants and Soils (Louvain, Belgique, 2018)

Optimization of phosphorus availability in soil: impact of Phosphate-Solubilizing Microorganisms on rapeseed growth and nutrient use efficiency.

Charlotte AMY[1,2], Mélanie BRESSAN[2], Karine LAVAL[2], Jean-Christophe AVICE[1]

[1] UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), SFR Normandie-Végétal FED 4277, Université de Caen Normandie, Esplanade de la paix, F-14032 Caen, France
[2]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

Phosphorus (P) is an essential element that is necessary for plant and soil microbial development and growth, but limiting because of its low availability and mobility in soil[1]. Phosphate, the only form that plants can absorb, is largely complexed in organomineral particles[2]. The pool of soil available P is mainly supplied from organic matter mineralization and dissolution of clay-P, Fe-P and Al-P complexes. Moreover, the majority of the applied inorganic P fertilizer in soil is not available to plants. This low availability is generally balanced by excessive addition of P fertilizers, leading to environmental problems[3].

Rapeseed, an oleoproteaginous crop of interest in France and Normandy, is characterized by high requirements in P and also nitrogen (N). This specific requirement is partially due to low nutrient use efficiency in this crop. During leaf senescence, incomplete proteolysis leads to low remobilization of endogenous nutrients. To promote access to poorly available nutrients, like P, rapeseed is likely to recruit soil microorganisms through root exudation[4]. These specific microorganisms called « PSM » (Phosphate-Solubilizing Microorganisms) can improve plant nutrition by increasing organic P mineralization or with efflux of molecules directly acting on complex P forms[5]. These microorganisms of interest represent a possible efficient alternative to mineral fertilization[4].

In this context, the aim of this work is to evaluate the agronomic effect of efficient biofertilizers composed of beneficial microorganisms on rapeseed growth. Besides agronomic performance, the objective is also to apprehend direct or indirect processes implicated in P and N uptake. More particularly, the impact of microbial consortium and individual PSM, isolated from rapeseed rhizosphere, will be evaluated on plant growth and microbial dynamics linked to P and N cycles. Indeed, known reciprocal synergy between P availability and N cycle functioning, little studied, and the strong link between P and N metabolisms highlights the interest to consider the nutritional interactions P x N to improve use efficiency of these two elements.

Key words
Rapeseed, biofertilizers, nutrient use efficiency

References:
1. Vance, C. P. (2001) Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. Plant Physiology 127, 390–397.
2. Koch, M. et al. (2018) Phosphorus stocks and speciation in soil profiles of a long-term fertilizer experiment: Evidence from sequential fractionation, P K -edge XANES, and 31 P NMR spectroscopy. Geoderma 316, 115–126.
3. Syers, J. ., Johnston, A. & Curtin, D. (2009) Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information. Experimental Agriculture. 45, 128.
4. Gkarmiri, K. et al. (2017) Identifying the Active Microbiome Associated with Roots and Rhizosphere Soil of Oilseed Rape. Applied Environmental Microbiology. 83.
5. Calvo, P., Nelson, L. & Kloepper, J. W. (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. Plant Soil 383, 3–41.

Optimization of phosphorus availability in soil: impact of Phosphate-Solubilizing Microorganisms on rapeseed growth and nutrient use efficiency

Charlotte AMY[1,2], Mélanie BRESSAN[2], Karine LAVAL[2], Jean-Christophe AVICE[1]

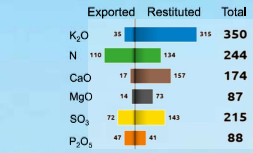
[1] UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), Université de Caen Normandie, F-14032 Caen, France
[2]UniLaSalle, unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, 4277, 3 Rue du Tronquet - CS 40118, F-76134 Mont-Saint- Aignan, France

Context and Hypotheses :

Available Phosphorus (P) is a scarce element in soils for plants and micro-organisms growth due to its quick complexation in soils to organomineral particles such as clay, Iron or Aluminium[1]. P-Solubilizing Microorganisms (PSM) are able to solubilize complexed P. To face nutrient limitations, plants and micro-organisms interact through rhizodeposition for instance to enhance availability of limiting elements[2]. Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a major oleoproteaginous crop which requires high Nitrogen (N) [3] and P inputs and presents a low N and P use efficiencies. Furthermore, little is known concerning rapeseed interactions with soil micro-organisms in relation with P and N availabilities in soils.

Our hypotheses are : i) Optimisation of P nutrition in rapeseed can enhance P and N use efficiency, ii) Rapeseed can recruit PSM through rhizodeposition iii) Changes in P availability in soils can modify N cycle dynamics.

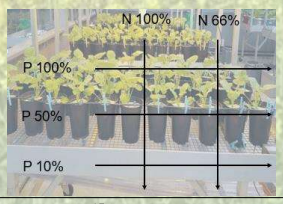
Nutrients required for a yield of 35 q/ha[4] :



Unit : kg / ha

Objectives, experimental design and preliminary results

Objective 1: Interactions of N x P nutrition in rapeseed

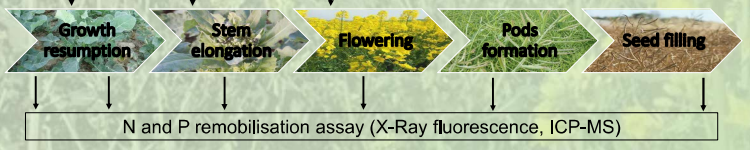


^{15}N labelling

Several N and P treatments are applied after vernalization to mimic conventional fertilization inputs.

N treatments correspond to 100% and 66% of optimal N fertilization

P treatments correspond to 100, 50 and 10% of optimal P fertilization



N and P remobilisation assay (X-Ray fluorescence, ICP-MS)

Preliminary results :

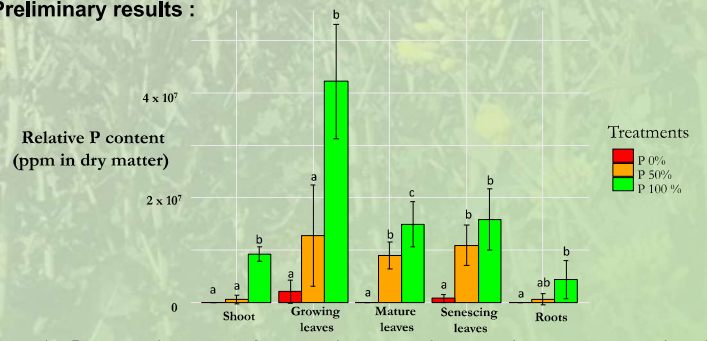
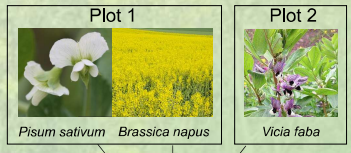


Figure 1 : P content in organs of rapeseed at vegetative stage in response to various P treatments. Plants were grown on Hoagland (3,75mM NO_3) solution. P was measured by X-Ray Fluorescence (XRF). Letters indicate significant differences between means within each organ (Tukey's test).

Objective 2: Crop effect on potential beneficial soil microorganisms



Culturable soil microbial communities

PSM screening | Siderophore production | IAA* production



Pikovskaya and NBRIP media | King B medium | * indole-3-acetic acid

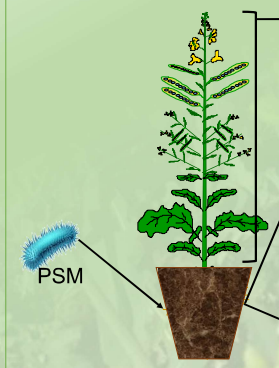
Preliminary results :

- 299 strains were isolated from soils under winter pea (*Pisum sativum*), rapeseed (*Brassica napus*) and faba bean (*Vicia faba)*
- 166 strains have shown a positive solubilization index
- Positive strains have been tested for auxin (IAA) production

Table 1 : Isolated strains presenting positive solubilization index and other potential growth promoting properties such as IAA or siderophore production.
PVK = Pikovskaya medium, NBRIP = NBRIP medium. Solubilization index = solubilization halo size / colony size

Crop	Strain	PVK solubilization index	NBRIP solubilization index	IAA production (ng/µL)	siderophore production
Pisum sativum	P21	1,176	1,297	208,400	+
	Pc12	1,000	1,698	97,200	+
Vicia faba	F46	3,674	1,600	76,300	+
	Fc30	1,368	1,314	99,700	-
	Fc48	1,210	1,000	147,600	-
Brassica napus	C17	1,000	1,401	297,126	NA
	C32	1,824	2,540	211,600	NA
	Cc15	1,468	1,885	122,900	NA
	Cc21	1,358	2,711	113,700	NA

Objective 3: Effect of PSM inoculum on rapeseed growth and N/P cycles



Morphometric and physiological traits
Biomass production, root architecture, seed yield
P and N efficiencies, changes in P and N fluxes

Biological soil properties
Real-time PCR analysis :
- Bacterial and fungal biomass
- N-cycling genes :
  - Ammonia monooxygenase : *amoA*
  - Nitrite reductase : *napA, narG, nirK, nirS*
- P-cycling genes :
  - phosphatases : *phoD, phoN*
  - Phytase : *appA*
  - Organic acid production : *gcd*
  - Bacterial P transporters : *pitA, pstS*

Abiotic soil properties Soil pH, C N P contents

Conclusions and Perspectives :

- **XRF quantification of P in dry matter is sensitive enough to measure the relative P content in starvation conditions for rapeseed**
- **N use efficiency will be assessed with various nutritive conditions also by Nitrogen Balance Index (NBI) monitoring thanks to fluorimetric method (Multiplex®)**
- **Quantitative P solubilization and organic acids production assays will be carried out in order to better discriminate PSM under each crop**
- **Other analyses will be done to test other growth promotion properties and protection against pathogens : HCN production, ACC deaminase activity, Germination test**
- **Interesting microorganisms will be identified by DNA sequencing**

Aknowledgements :
This work is supported by the Region Normandie for the doctoral fellowship OPERA and to the EPURE project. The authors thank the Federation Research Structure Normandie Végétal (FED427) and Raphaël Coquerel, Dorian Vilain for their work during their internship.

References :
[1] Koch, M. et al. (2018). Geoderma 316 ; [2] Jacoby, R. et al. (2017). Frontiers in Plant Science. 8
[3] Avice, J.-C. et al. (2014). Journal of Experimental Botany. 65. ; [4] Colza d'hiver - Éditions CETIOM - mai 2002

Annexe 2 : Communication affichée au 9ème congrès International Phosphorus Workshop (Zurich, Suisse, 2019)

Impacts of phosphate limitation and its interactions with nitrogen fertilization on the agronomic performances and nutrient use efficiencies of rapeseed

Charlotte AMY [ab], M. BRESSAN [b], K. LAVAL[b] and J.C. AVICE[a]

[a] *UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), SFR Normandie-Végétal FED 4277, Université de Caen Normandie, Caen, France*
[b] *UniLaSalle, unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, SFR Normandie-Végétal FED 4277, Mont-Saint- Aignan, France*

Phosphorus (P), and especially phosphate has been largely described as a limiting nutrient for plant growth because of its low availability and mobility in soil. The scarcity of available P is due to its quick and massive complexation and adsorption on organo-mineral particles. As a matter of fact, plant P uptake is supplied by new inorganic inputs (as fertilizers or through mineralization) and very few by desorption from legacy P.

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is a major oleaproteaginous crop in France due to high content of healthy fatty acids and a good proteic content in the meal for livestock feeding. This culture is characterized by a low Nitrogen and Phosphorus Use Efficency (NUE and PUE), leading to high fertilization levels and increasing environmental risks, such as eutrophication of aquatic environment and greenhouse gas emissions. This balance between plant requirements and associated risks can be linked to other nutrients regarding elementary ratios existing in plants. In this context, few studies have investigated P and N interactions in rapeseed.

To assess these interactions we assume that adjustment of P and N fertilizations can improve both PUE and NUE without decrease of seed yield and quality in rapeseed. To test this hypothesis, a greenhouse experiment was perfomed on winter rapeseed (cv. Aviso) subjected to 3 levels of phosphate (225, 112.5 or 22.5 mg of KH_2PO_4 per plant) combining with 2 levels of N fertilizations (525 or 350 mg KNO_3 per plant) applied at the bolting stage. A ^{15}N labelling method was used to evaluate the dynamics of N partitioning and remobilization. P allocation and remobilization in different organs were determined using X-Ray Fluorescence. Other parameters were studied such as biomass, N Balance Index, and components of seed yield and quality.

At the flowering stage, significant effects of N and P fertilization have been observed on the partitioning of P in the plant. For instance, P allocation in growing leaves was significantly lower in high N conditions (-30%). This decrease was to the benefit of reproductive organs for which P allocation was highly significantly drived by PxN interaction. Indeed, the more P fertilization was high, the less P was allocated to flowers (-11%), while improving N fertilization increased P allocation towards flowers (+18%). At the pod filling stage, there is a significant effect of N starvation on silique biomass (-31%) while level of P fertilization and PxN interactions have no significant impact. These first results suggest that in response to limitation of P fertilization, rapeseed is able to increase PUE to satisfy the requirement of P in siliques and seeds. Further analyses will bring more informations about the effect of P and N fertilizations on P partitioning, N fluxes (by ^{15}N labelling data) and seed yield and quality.

Keywords : Rapeseed, Nitrogen and Phosphorus Use Efficiency, nutrient interactions

Impacts of phosphorus limitation and its interactions with nitrogen fertilisation on the agronomic performances and nutrient use efficiencies of rapeseed

Charlotte AMY [ab], M. BRESSAN [b], K. LAVAL[b] and J.C. AVICE[a]

[a] *UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), SFR Normandie-Végétal FED 4277, Université de Caen Normandie, Caen, France*

[b] *UniLaSalle, unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, SFR Normandie-Végétal FED 4277, Mont-Saint- Aignan, France*

Context & Objectives :

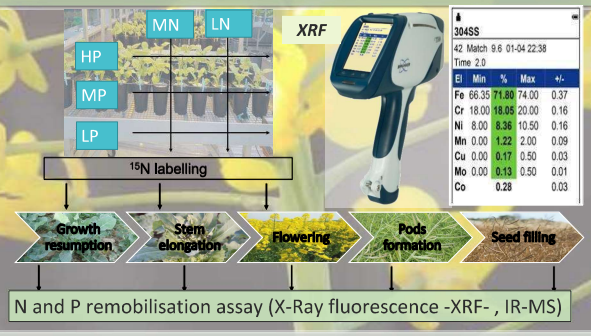
Rapeseed crops are known to have high nitrogen (N) and phosphorus (P) requirements[1]. Those nutrients, often provided through mineral fertilizers have been described as responsible of environmental issues such as greenhouse gaz emissions and eutrophication of aquatic ecosystems[2]. Since N and P are both involved in same metabolic pathways and interact at rhizosphere level[3], little is known about nutritive optimization on agronomic performances in rapeseed (*Brassica napus* L.). In this context, our objectives were to determine the impacts of crossed P and N fertilizations on agronomic performances (seed yield and N and P use efficiencies) and seed quality components.

Greenhouse experiment

Genotype: Aviso

After vernalization :

- 2 N levels : **2,5 atom%** ^{15}N labelled
  - Medium N (MN) = 210 U or 525 mg N / plant
  - Low N (LN) = 140 U or 325 mg N / plant
- 3 P levels :
  - High P (HP) = 90 U or 225 mg P / plant
  - Medium P (MP) = 45 U or 112,5 mg P/ plant
  - Low P (LP) = 9 U or 22,5 mg P / plant



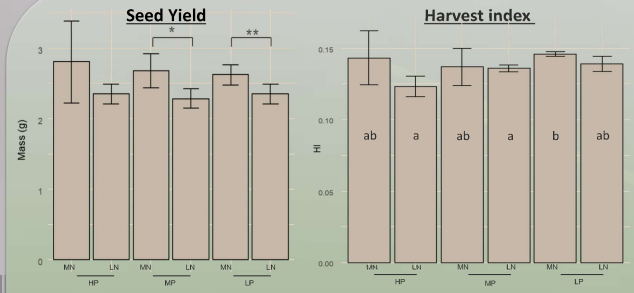
Agronomic indices

Quantitative variables :

- Seed yield
- Harvest index : seed mass / total plant mass
- NUE : seed mass / N input
- PUE : seed mass / P input

Qualitative variables (NIRS) :

- Oil and proteic contents
- Healthy fatty acid composition (ω6 and ω3 content)



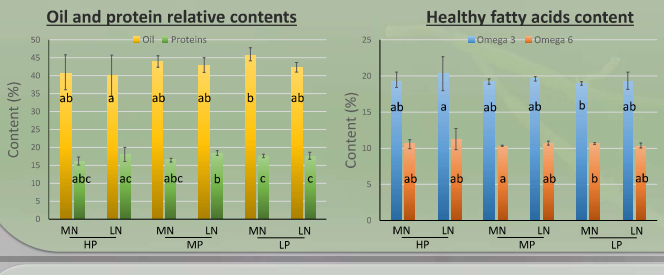
Seed Yield

- P treatments had no effect on seed yield
- Differences have been observed between N treatments for MP and LP treatments

These results suggest insufficient P nutrition enhances plant susceptibility to N deprivation

Harvest Index

- MN / LP treatment harvest index is higher than LN treatment in other high and medium P treatments



Oil and protein relative content

- Oil content was higher in LP MN treatment than in LN HP treatment
- Oil content has not been affected by other N and P treatments
- Higher proteic content was observed in MP LN treatment compared to LP treatments

Healthy fatty acids content

- Omega 3 was higher in HP LN treatment compared to LP MN treatment
- Omega 6 was higher in LP MN treatment than MP MN treatment

Taken together these results suggest a P effect on seed quality for limited P treatments

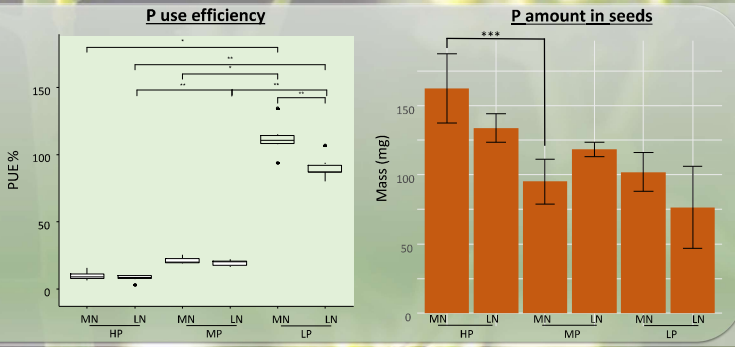
P use efficiency (PUE)

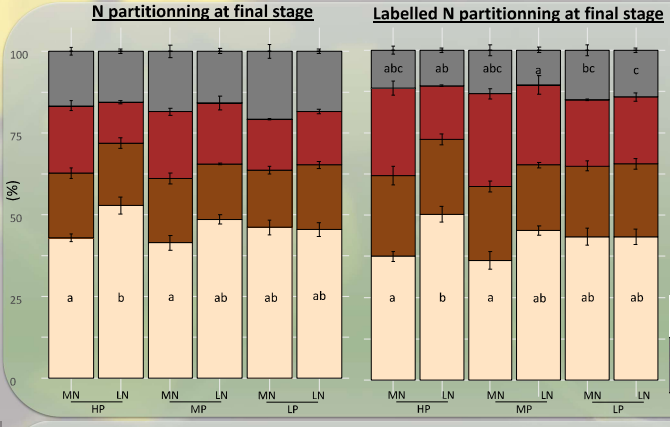
- High and Medium P treatments led to low PUE
- For LN treatments, the more P is provided, the less PUE is high
- N deprivation had a significant negative impact on PUE in LP treatment

P amount in seeds

- For MN treatments, amount of P in seeds is decreased between HP and MP treatments

PUE was dramatically increased by low P fertilization. At this fertilization level, N effect can be seen without effect on P amounts in seeds.





No significant differences have been observed for N Use Efficiency (not shown)

N partitionning at final stage

- Roots are the only organs where differences have been observed
- For HP treatment, low N significantly increased N content in roots

Labelled ^{15}N partitionning at final stage

- As well as total N, LN HP treatments increased the part of ^{15}N in roots.
- LP treatments led to higher part of ^{15}N in fallen leaves, especially for LN treatments.

These results suggest that the level of P fertilization impacts the N remobilisation efficiency which is associated with the leaf senescence process.

	Nitrogen content (mg)						Labelled nitrogen content (µg)					
	HP		MP		LP		HP		MP		LP	
	MN	LN	MN	LN	MN	LN	MN	LN	MN	LN	MN	LN
Roots	27,8 ± 4,8	36,9 ± 6,1	29,4 ± 9,8	28,9 ± 0,2	29,4 ± 4,8	27,4 ± 4,9	250 ± 35,7	286,6 ± 36	253,3 ± 71,8	235,1 ± 15,5	266,4 ± 44,2	209,3 ± 34,5
Stem	12,6 ± 0,9	13,2 ± 1,3	13,4 ± 2,3	10,1 ± 0,3	11,1 ± 1,2	11,6 ± 0,8	160,1 ± 18,7	129,1 ± 9,9	152,8 ± 17,2	103,5 ± 9,3	130,7 ± 12,7	106,2 ± 14,2
Pods	13,5 ± 3,5	8,7 ± 0,4	14,1 ± 2,7	11,1 ± 2,6	9,9 ± 0,9	9,7 ± 0,5	177,8 ± 36,1	91,9 ± 4,1	192,2 ± 34,4	127,8 ± 38,5	122,9 ± 10,5	96,9 ± 5,4
Fallen leaves	10,8 ± 2,2	10,7 ± 0,4	12,9 ± 4,5	9,3 ± 0,9	13,1 ± 1,8	11 ± 1,3	75,8 ± 9,2	61,4 ± 4,1	90,3 ± 21,9	54,8 ± 2,6	90,8 ± 12,4	68,5 ± 13,9

Conclusions and perspectives

- All these results suggest complex interactions between N and P, probably involving remobilization mechanisms to sustain development and quality of seeds.
- While results from seeds are still expected, some organs such as roots and leaves lost during senescence seem to be potential sources to improve P and N remobilization
- A way to improve P availability could be through the use of P Solubilizing Microorganisms that are susceptible to enhance plants abilities to take advantages from soil nutrients

References

[1] COMIFER

[2] Menesguen et al., 2001

[3] Fageria, 2001

Aknowledgements :

This work is supported by the Region Normandie for the doctoral fellowship OPERA and to the EPURE project. This work is also partially funded by the French National Research Agency (ANR-11-BTBR-004 RAPSODYN - Investments for the Future: Optimisation of the RAPeSeed Oil content and Yield under low Nitrogen input). The authors thank the Federation Research Structure Normandie Végétal (FED427)

Annexe 3 : Communication affichée au 4ème congrès international Biostimulants (Barcelone, Espagne, 2019)

Effect of three PSM strains isolated from three contrasted crop rhizospheres on growth and N and P use efficiency of rapeseed cultivated under various P-fertilization

Charlotte AMY [ab], K. LAVAL[b], J.C. AVICE[a] and **M. BRESSAN [b]**

[a] *UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), SFR Normandie-Végétal FED 4277, Université de Caen Normandie, Caen, France*
[b] *UniLaSalle, unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, SFR Normandie-Végétal FED 4277, Mont-Saint- Aignan, France*

Rapeseed (*Brassica napus*) is a major oleoproteaginous crop in France, characterised by high requirements in Nitrogen (N) and Phosphorus (P), leading to the use of high amounts of fertilizers. An interesting alternative is the contribution of microorganisms to improve plant nutrition, such as Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM). This strategy's success relies on ability of bacteria to colonize plant rhizosphere. As plant requirements can impact the recruitment of beneficial microorganisms we aimed to evaluate the relevance of origin-linked PSM use and its efficiency on rapeseed growth.

To address this question, a PSM screening was carried out on rhizospheric soil from rapeseed, winter pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) and PGPR abilities were assessed. For each explored rhizosphere, the highest solubilizing strain was selected for a greenhouse trial with rapeseed growing on P-deprived soil. Plants were cultivated with four P fertilization levels: an optimal fertilization (P100% corresponding to 278 mg P_2O_5/plant), P50%, P25%, P0 supplemented or not with PSM inoculation from each crop.

At P50% supplemented with the PSM isolated from faba bean, a successful growth promotion was observed. Root biomass significantly increased compared to P50% control (+70.4%) and to P100% (+83.3%) thus increasing P amount in roots (+74%). The strain isolated from pea showed no significant effect at P50% but dramatically decreased total plant biomass (-35.6%). Finally, the strain isolated from rapeseed showed no effect despite higher *in vitro* solubilization abilities. Mechanisms of action were then more deeply explored to understand observed effects.

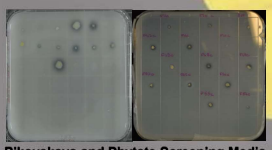
Are culturable Phosphate Solubilizing Bacteria diversity and efficiency shaped by plant cover requirements?

Charlotte AMY [1,2], Mélanie BRESSAN [2], Jean-Christophe AVICE[1] & Karine LAVAL [2]
Normandie Université, SFR Normandie Végétal.
[1] UNICAEN, INRA, UMR INRA/UCN 950 Ecophysiologie Végétale et Agronomie (EVA), Université de Caen Normandie, Caen
[2] UniLaSalle, Unité de recherche AGHYLE, UP 2018.C101, Mont-Saint- Aignan

Introduction :

As primary productors, plants need mineral elements to sustain their growth and life cycle. Nutrients are principally provided through soil microbial processes, such as degradation of soil organic matter or nitrogen (N) fixation(1). Phosphorus (P) is an essential but scarce nutrient in soils. Some microorganisms are described as « Phosphate Solubilizing Microorganisms » (PSM) and can turn P into an available form for plants (2). They could represent an alternative to inputs of mineral fertilizers.
It is well known that plants can recruit beneficial microorganisms through their root exudation(3). As different crops have different nutritionnal requirement and allellopathic specificities, we assume that both P solubilization efficiency and PSM diversity differ according to plants species and so specific P requirements.

PSM screening



Pikovskaya and Phytate Screening Media

PSM were tested on two media, with inorganic and organic P forms

Solubilization index (SI) was calculated as follow :

$$SI = \frac{Solubilisation\ halo\ diameter}{Colony\ diameter}$$

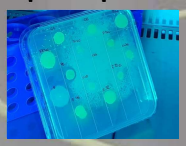
Plot 1 / **Plot 2**



Pisum sativum *Brassica napus* — *Vicia faba*

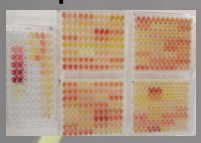
Isolation of culturable soil bacterial strains

Siderophore production



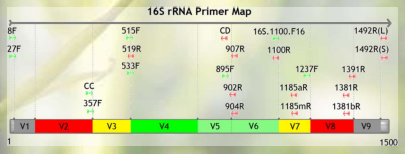
Culture on King B medium

IAA* production



IAA = IndoleAcetic Acid

Molecular identification

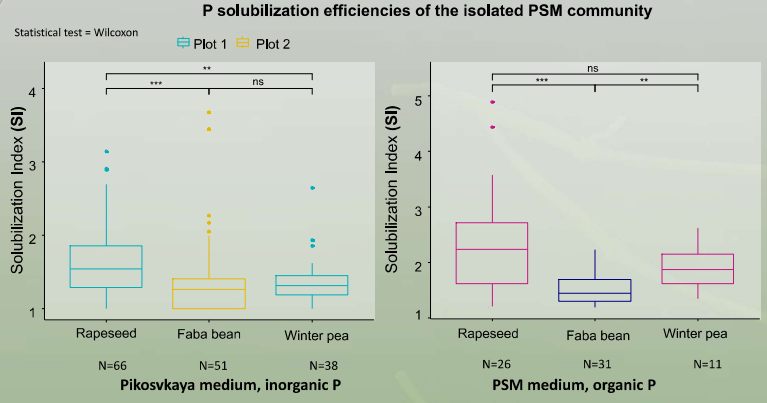


Yang et al., 2016 (4)

Sanger sequencing of ADNr 16S

Strains characterization

P solubilization efficiencies of the isolated PSM community



- For inorganic and organic forms, higher ratios were found for PSM isolated under rapeseed
- For inorganic P (Pikovskaya medium), **SI** were different for rapeseed and legumes, while no inter-plot differences were observed for legume crops
- Differences in global inorganic P solubilization efficiencies seem to follow crops specific requirements, described in the following table(5).
- For organic P (phytate) **SI** no such patterns were found. Differences exist between PSM isolated in plot 1 and plot 2 suggesting environmental influences on mineralization.

	N requirement	P requirement
Rapeseed	High	High
Winter Pea	Low	Medium
Faba Bean	Low	Medium

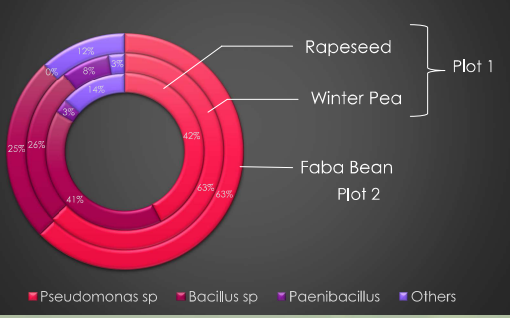
- Percentage of strains producing siderophore among PSM are close for legume crops while rapeseed seems to recruit more PSM producing siderophore.
- No such pattern is observed concerning PSM strains producing IAA
- Higher level of IAA production is measured in Rapeseed rhizosphere when considering only IAA producing strains

	siderophore producing strains (%)	IAA producing strains (%)	Average IAA production (all PSM strains) (µg/mL)	Average IAA Production (producing strains) (µg/mL)
Rapeseed	30,3 (20/66)	24,2 (16/66)	19,9 ± 6,4	74,0 ± 20 (7,7 - 297,1)
Winter Pea	23,7 (9/38)	34,2 (13/38)	18,6 ± 6,4	54,3 ± 14,4 (2,6 - 147,6)
Faba bean	23,5 (12/51)	49,0 (25/51)	20,8 ± 4,6	46,5 ± 7,1 (3,5 - 208,4)

- Abundance of PSM strains is more important (in number as well as in proportion) in Rapeseed rhizosphere. PSM proportions are similar for legumes.
- Same bacterial genera were identified for the 3 crops.

	Rapeseed	Winter pea	Faba bean
Pseudomonas sp	28	24	32
Bacillus mycoides	5	3	3
Bacillus pseudomycoides	7	2	2
Bacillus simplex	11	2	6
Bacillus sp	4	3	2
Paenibacillus	2	3	0
Others	9	1	6
total PSM strains	**66**	**38**	**51**
PSM proportion in culturable bacteria (%)	**62,86**	**42,70**	**48,57**

Partitionning of isolated PSM strains depending on crop cover



- In Faba bean and Winter pea rhizospheres, same proportions of PSM isolates belonging to *Pseudomonas* and *Bacillus* genera were found, compared to those isolated in Rapeseed rhizosphere.
- *Pseudomonas* and *Bacillus* genera are often described as PSM in the literature(2)
- PSM communities in Winter pea and Faba bean rhizospheres are more similar than those observed for the 2 crops present on the same plot (Winter pea and Rapeseed), confirming the key influence of crop on the recruitment of PSM community .

Conclusions :

Crop requirements seem to be a key factor to explain structure and efficiency of isolated PSM strains for inorganic P sources. Higher requirements in P may explain recruitment of beneficial bacteria with higher potentiality in P solubilization in Rapeseed rhizosphere. We assume root exudation is an important mechanism in this inter-kingdom communication. Crop rotation can be an important tool to manage and shape as necessary beneficial microbial community, and so to improve long-term fertility of soils .

Perspectives :

As a result of this screening, 3 strains were selected for further analyses. These PSM isolates will be tested *in planta* to assess their efficiency to sustain plant growth in complexed-P context.

Aknowledgements :
This work is supported by the Region Normandie for the doctoral fellowship OPERA and to the EPURE project. The authors thank the Federation Research Structure Normandie Végétal (FED427).

References :
(1) R. Jacoby, M. Peukert, A. Succurro, A. Koprivova, et S. Kopriva , Frontiers in Plant Science, vol. 8, sept. 2017.
(2) E. T. Alori, B. R. Glick, et O. O. Babalola, Front. Microbiol., vol. 8, p. 971, juin 2017.
(3) N. Romillac, Université de Lorraine, 2015.
(4) B. Yang, Y. Wang, et P.-Y. Qian, BMC Bioinformatics, vol. 17, no 1, p. 135, mars 2016.
(5) COMIFER, 1995.

AMY Charlotte

Thèse de l'Université de Caen Normandie au sein de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Spécialité : Sciences Agronomiques, Biotechnologies Agro-alimentaires). UMR INRAE-UCN 950 EVA (Écophysiologie Végétale, Agronomie et Nutritions NCS), Unité AGHYLE, UniLaSalle Rouen

Titre : Optimiser la nutrition azotée et phosphorée du colza pour une production durable via l'utilisation de biointrants améliorant le fonctionnement du phytobiome

Résumé : Le colza est une oléoprotéagineuse exigeante en azote (N) et en phosphore (P) mais qui estcaractérisé par une faible efficience d'usage du N (NUE), liée essentiellement à une remobilisation médiocre du N des organes sources vers les organes puits en croissance. Ces mécanismes de recyclage étant ATP-dépendants, une amélioration des conditions nutritionnelles en P est susceptible d'améliorer les performances agronomiques du colza vis-à-vis des apports en N. Faiblement disponible dans la solution du sol, le P pourrait être rendu plus accessible pour la nutrition végétale par l'usage de microorganismes solubilisateurs de P (Phosphate-Solubilizing Bacteria ou PSB). Déjà déployés aux champs, ces solutions, plus respectueuses de l'environnement se révèlent néanmoins peu efficaces. Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont d'étudier en conditions contrôlées l'impact de différentes stratégies de fertilisation N et P **(i)** sur les performances agronomiques du colza, le rendement et la qualité des graines, **(ii)** sur la capacité des plantes et de PSB isolés de sols Normands à interagir pour stimuler la croissance végétale et **(iii)** caractériser les effets propres et allélopathiques de l'introduction d'un microorganisme PSB allochtone dans un nouvel environnement liés à une amélioration de la croissance du colza (cv. Aviso). Cette étude a montré qu'un ajustement du ratio de fertilisation N et P permettant d'abaisser les apports de N peut conduire à une optimisation de l'efficience d'usage du N et du P, sans pénaliser le rendement et les critères de qualité. Il ressort également que des pratiques culturales impactant le statut N et P des plantes en fin de stade végétatif permettraient de piloter la culture de manière précoce pour modifier la qualité de la graine et l'orienter vers les filières huiles ou protéines végétales. La disponibilité du P a été améliorée par l'application de la souche bactérienne F23 (du genre *Pseudomonas*) isolée sous couvert de féverole par nos soins. En effet, en culture sur sol, l'application de cette souche a permis de diminuer de 50% la fertilisation P. L'analyse métagénomique effectuée sur les communautés microbiennes associées à l'environnement racinaire du colza a également montré une augmentation de l'abondance relative de genres bactériens impliqués dans les cycles biogéochimiques des nutriments ainsi qu'une diminution des genres liés à la lutte contre des pathogènes telluriques, indiquant un changement de spécialisation du microbiote. Enfin, testée dans des conditions axéniques, la souche F23 a confirmé son potentiel d'amélioration de la croissance végétale lorsque le niveau de N disponible n'est pas limitant. L'ensemble de ces résultats révèle les bénéfices de recourir à des pratiques innovantes de raisonnement de la fertilisation N et P et à l'utilisation le potentiel des biointrants afin d'améliorer les performances agro-environnementales du colza dans une logique d'ingénierie écologique.

Mots clés : Interactions azote/phosphore, Colza, Phosphate-Solubilizing Bacteria, Interactions plantes-microorganismes, Biointrants

Title: Optimizing nitrogen and phosphorus nutrition of rapeseed for a sustainable production through the utilization of biointrants, improving phytobiome functioning.

Abstract: Rapeseed is an oleoproteaginous crop with high nitrogen (N) and phosphorus (P) requirements but characterized by a low N Use Efficiency (NUE) largely due to a weak remobilization of N from sources organs to growing organs during senescence. As recycling processes are ATP-dependent, improving P nutrition could improve agronomic performances related to N utilization. Considering that P is scarce in soil solution, Phosphate Solubilizint Bacteria (PSB) utilization could improve P availability for plant nutrition. Such biointrants are already use in fields but often show disappointing results. In this context, the aims of this thesis were to study under controlled conditions the effects of several N:P fertilization ratios on **(i)** agronomic performances of rapeseed, seed yield and quality, **(ii)** on plants and PSB isolated from Normandy soils to interact and succeed in plant growth stimulation and **(iii)** to characterize allelopathics and proper effects of a PSB application in a new biome, correlated with the improvement of rapeseed growth. This study has shown that an adjustment of the N and P fertilization ratio allowing a reduction in N inputs, can lead to an optimization of the N and P efficiencies, without penalizing the seed yield and the quality criteria. It also emerges that cultivation practices impacting the N and P status of plants at the end of the vegetative stage would make it possible to control cultivation at an early stage in order to modify the quality of the seed and direct it towards the vegetable oils or proteins sectors. Improving P availability in soils has been possible by the use of a PSB strain named F23 (belonging to *Pseudomonas* genus), allowing a 50% decrease of P fertilization. Metagenomic analysis revealed an increase in relative abundance of bacterial genera implied in nutrients cycles and a decrease in relative abundance of genera implied in pests control. These results highlight a change in the specialization of microbial communities associated to rapeseed. In axenic conditions, F23 confirmed its potential in sustaining plant growth under non-limiting N conditions. Overall results reveal the benefits of using innovative N and P fertilization reasoning practices and the potential of biointrants in order to improve the agro-environmental performances of rapeseed through ecological engineering.

Key words: Nitrogen-phosphorus interaction, Rapeseed, Phosphate-Solubilizing Bacteria, Plants-microorganisms interactions, Biointrants