

RAPPORT DE STAGE

Participation à des travaux de thèse visant à quantifier les flux d'azote induits par 10 espèces de légumineuses.

Juliana Fatima WELTER

Encadrement : Mae GUINET

Enseignant tuteur : Bernard NICOLARDOT

Dijon, juin 2016

Sommaire

1. Introduction.....	3
2. Objectifs.....	4
3. Démarche expérimentale	4
4. Expérimentations	5
4.1 Expérimentation au champ	5
4.1.1. <i>Fixation symbiotique</i> :	5
4.1.2. <i>Effet précédent</i> :	6
4.1.3 <i>Emissions de N₂O</i>	7
4.2. Expérimentation en hydroponie.....	8
4.3. Expérimentation en pots à l'extérieur	8
5. Apports personnels acquis pendant le stage.....	9
6. Références bibliographiques	10

1. Introduction

Au cours de la période de ces trois mois (10 à mars au 10 juin 2016) j'ai été accueilli par l'équipe écophysiologie du pôle Geapsi de l'UMR Agroécologie à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA-Dijon) pour réaliser un Projet tutoré en laboratoire. Pendant cette période, j'ai suivi les activités d'une thésarde et j'ai eu l'occasion de participer au congrès "1^{ères} rencontres francophones sur les Légumineuses" qui a eu lieu à Dijon.

La révolution agricole européenne a conduit à une intensification de l'agriculture, par le développement de la mécanisation et l'augmentation de l'utilisation des intrants de synthèse. Ceci est en partie responsable d'une forte diminution des surfaces de légumineuses, remplacées par des espèces assurant une meilleure rentabilité à court terme. (Schott et al. 2010). De plus, l'utilisation des intrants azotés de synthèse a entraîné l'exclusion de l'utilisation des légumineuses comme source d'azote dans les rotations des cultures (Voisin et al. 2014). Pourtant, ces systèmes agricoles intensifs rencontrent un certain nombre de limites, notamment dans les atteintes à biodiversité, et à l'environnement mais également en termes de plafonnement des rendements agricoles depuis une vingtaine d'année. Ainsi, la mise en place de systèmes agricoles plus durables semble indispensable. Les légumineuses, constituent un groupe de plantes intéressant pour tendre vers des systèmes plus agroécologiques (Voisin et al. 2014).

Les légumineuses peuvent être utilisées aussi bien pour la consommation humaine et animale. Les graines sont caractérisées par une forte teneur en protéines, et celles-ci sont complémentaires des protéines issues des céréales. D'un point de vue agronomique, les légumineuses sont particulièrement intéressantes pour leur capacité de fixer l'azote à travers la symbiose avec les bactéries du sol du type *rhizobium*. De plus, les légumineuses sont souvent de bonne tête de rotation. En effet, la minéralisation des résidus de légumineuses, riches en azotes, peut constituer un apport d'azote non négligeable à la culture suivante. Par conséquent, l'introduction de ces espèces dans les systèmes agricoles permet de réduire les intrants azotés (Carrouée et al. 2012) et les émissions des gaz à effet de serre associés, par la diminution de dioxyde de carbone (CO₂) pendant la production des engrais, par la réduction de protoxyde d'azote (N₂O) durant l'épandage des engrais azotés (Jensen et al. 2012). Enfin, l'implantation des légumineuses permet une diversification des systèmes favorisant la rupture des cycles de maladies.

Pourtant, ces espèces sont aujourd'hui peu cultivées, du fait de leur faible valorisation commerciales et leur sensibilité aux facteurs biotiques et abiotiques qui entraînent une forte variabilité de rendement.

Ainsi, en 2014, le projet Legitimes, dans lequel s'inscrit cette thèse, a été mis en place avec pour principal objectif la réintroduction des espèces de légumineuses. Ce projet cherche en partie à mieux comprendre et quantifier les services écosystémiques associées aux légumineuses afin de valoriser ces espèces.

2. Objectifs

La thèse cherche à quantifier les flux d'azote induits par 10 espèces de légumineuses aux caractéristiques morphologiques contrastées, et identifier les déterminants de ces flux. Les objectifs spécifiques consistent à : i) quantifier la fixation symbiotique en fonction du niveau du stock d'azote minéral du sol, la minéralisation de l'azote des résidus de légumineuses après enfouissement et les pertes d'azote en dehors du système sol-plante (lixiviation, émission de protoxyde d'azote), ii) identifier les « traits de plantes » explicatifs des fonctions liées à ces flux d'azote.

L'objectif du projet tuteuré était de contribuer à l'acquisition des données nécessaires à la thèse. J'ai ainsi participé à la mise en place des essais et à leur suivi en aidant à l'ensemble des mesures faites au cours de ces expérimentations.

3. Démarche expérimentale

Pour atteindre ces objectifs, une expérimentation au champ a été mise en place en 2014-2015 et reconduite sur la campagne 2016-2017, avec l'implantation d'une culture de légumineuses en première année suivie par une culture de blé en année 2 après enfouissement des résidus. Ces essais bisannuels permettent de mesurer les différents flux azotés sur une rotation de deux ans.

En parallèle, les traits des plantes, notamment racinaires, ont été caractérisés plus finement au cours d'expérimentations conduites en conditions contrôlées en serre.

4. Expérimentations

Trois différentes expérimentations ont été mises en place et suivies : au champ, en hydroponie et en pots avec substrat. L'objectif de l'essai au champ était de mesurer l'ensemble des flux azotés à l'échelle d'une rotation de deux ans. Les essais en hydroponie et en pots, cherchaient à mesurer plus finement les traits explicatifs des flux azotés, notamment les traits racinaires.

Dix espèces de légumineuses ont été étudiées : féverole, pois, lupin, lentille, vesce de Narbonne, vesce commune, haricot, soja, pois chiche et fénugrec. Elles ont été choisies pour leurs caractéristiques morphologiques aériennes et racinaires contrastées. Ces différentes espèces à graines sont utilisées pour l'alimentation animale et / ou humaine. Le fénugrec, la vesce de Narbonne la vesce commune peuvent être utilisés soit en tant que fourrage, soit comme plantes de service.

4.1 Expérimentation au champ

Les différents flux d'azote ont été quantifiés au cours d'une expérimentation au champ avec implantation d'une culture de légumineuses en première année suivie par une culture de blé en année 2 qui a été menée en 2014-2015 et sera reconduite sur la campagne 2016-2017. Les deux essais bisannuels permettent de mesurer les différents flux dans des conditions climatiques contrastées.

4.1.1. Fixation symbiotique

L'un des objectifs de l'essai au champ était de mesurer le taux de fixation symbiotique des légumineuses en fonction du niveau d'azote minéral du sol.

2014 :

Les 10 espèces de légumineuses, ainsi que 2 céréales de référence ont été semées en mars (féverole, lupin, pois, vesce commune, lentille et orge), et en mai (pois chiche, haricot, soja, fénugrec et vesce de Narbonne et sorgho). Pour chaque espèce, 4 niveaux d'azote minéral marqué au N^{15} ont été apportés (0, 50, 150 et 300 kg N/ha). Le rapport N^{14}/N^{15} des légumineuses permet de déterminer la quantité d'azote issue de la fixation symbiotique. Pour

y parvenir il est nécessaire de connaître les rapports $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ du sol, et de l'air. Le premier rapport est obtenu via la céréale de référence dont la seule source d'azote est l'azote minéral du sol. Le second correspond au rapport $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ d'une légumineuse cultivée en l'absence d'azote minéral et dont la seule source est l'azote atmosphérique.

De manière à suivre l'évolution de la quantité d'azote issue de la fixation symbiotique des prélèvements aériens ont été effectués tous les 15 jours environ.

4.1.2. Effet précédent

2014 - 2015:

Suite à la récolte et à l'enfouissement des résidus de légumineuses conduites sans azote, un blé non fertilisé a été implanté en octobre 2014. Des prélèvements ont été effectués en sortie d'hiver, à épiaison et à maturité. Ainsi, ont été comparés l'effet précédent des légumineuses et des céréales sur un blé.

2015 – 2017:

Le second essai au champ a été reconduit afin d'affiner la quantification de l'effet précédent.

Lors de la première année de la campagne, les légumineuses et les céréales fertilisées ont été semées à 3 dates :

- Octobre 2015 : pois, lupin, féverole, blé ;
- Mars 2016 : pois, lupin, féverole, fénugrec, vesce commune, lentille, orge ;
- Mai 2016 : soja, pois chiche, haricot et vesce de Narbonne.

Cette expérimentation se distingue de la précédente par l'implantation d'un blé fertilisé ou non : l'hypothèse étant qu'un blé précédé d'une légumineuse aura une meilleure efficacité d'utilisation d'azote. Les légumineuses de printemps seront aussi suivies par un colza non fertilisé afin de chercher à limiter les pertes azotées durant l'automne.

De manière à expliquer la variabilité de l'effet précédent, des prélèvements aériens et racinaires ont été réalisés au cours du cycle des cultures des légumineuses et des céréales. Un prélèvement a notamment été effectué à floraison, date à laquelle la croissance et l'absorption en azote sont supposées maximales. Le dernier prélèvement sera effectué à maturité afin de

déterminer le rendement en graines et la quantité de résidus laissée au champ. Les biomasses et les teneurs en azote seront mesurées pour ces différents prélèvements.

Afin d'estimer la biomasse racinaires des différentes espèces de légumineuses des carottages de 40cm de profondeur et 20 cm de diamètre ont été réalisés en 2014. Ces carottages ont été effectués à floraison et à maturité.

En 2016, les carottages ont à nouveau été réalisés à floraison, mais seulement sur pois, féverole et lupin. Ces prélèvements permettent de comparer les systèmes racinaires entre les variétés d'hiver et de printemps. Les espèces semées en octobre, ont subies des conditions climatiques plus froides par rapport aux variétés de printemps. Ainsi, la croissance du système racinaire risque d'être favorisée au détriment du système aérien plus exposé aux faibles températures. Ainsi, l'hypothèse est que les variétés d'hiver ont un système racinaire plus développé que les variétés de printemps. De manière à comparer les deux variétés pour chacune des 3 espèces, des mesures de biomasses de pivot, racines latérales, et nodules ont été réalisées.

4.1.3 Emission de N₂O

Les émissions de protoxyde d'azote sont suivies quotidiennement au moyen d'enceintes automatiques posées en surface sur sol pour 6 espèces de légumineuses (pois, lupin, féverole, pois chiche, haricot et soja) et 2 céréales fertilisées (orge et sorgho). Les émissions sont également mesurées l'année suivante pendant la culture de blé. Les émissions de N₂O sont essentiellement liées à la part de porosité du sol occupée par l'eau, à la température et à la quantité d'azote dans le sol. L'hypothèse est que les émissions de N₂O seront plus importantes sur les céréales fertilisées par rapport aux légumineuses. D'autre part, au cours de la succession culturale de 2 ans, les émissions risquent d'être les plus élevées au moment de la décomposition des résidus de légumineuses.

L'essai au champ permet de mesurer un certain nombre de flux induits par les cultures de légumineuses. Cependant, il n'est pas toujours facile de mesurer sur le terrain certains traits, notamment les traits racinaires. De ce fait, des essais en conditions contrôlés ont été mis en place afin d'identifier les traits de plantes associés aux fonctions impliquées dans les flux d'azote.

4.2 Expérimentation en hydroponie

Un essai en hydroponie a été mis en place entre mars et mai 2016 avec pour principal objectif, la caractérisation du niveau d'azote sur le développement aérien et racinaire des 10 espèces de légumineuses. Cet essai cherchait à identifier les différents types de réponse à l'azote selon les espèces et les stratégies mises en place.

Ainsi, 4 doses d'azote (0, 0.225, 2.5 et 5 mmol N/L) ont été testées sur les 10 légumineuses conduites dans des pots en hydroponie. Au total 6 prélèvements hebdomadaires ont été effectués, avec 5 répétitions par espèce et par dose.

Sur les plantes prélevées voici l'ensemble des mesures aériennes et racinaires effectuées :

- Evolution de la surface foliaire entre le premier et le cinquième prélèvement via des scans de l'ensemble du système foliaire ;
- Biomasse des différents compartiments aériens (tige, feuilles, graine ou cotylédons, fleur et gousse) ;
- Des mesures d'architectures racinaires : longueur du pivot, nombre de latérales, ordre de ramification, scans racinaires, nombre de nodules ;
- Biomasse des différents compartiments racinaires (nodules sur pivot, nodules sur latérales, racines latérales, pivot) ;

Des analyses d'azotes seront effectuées par la suite.

Entre le 5^{ème} et 6^{ème} prélèvement, la solution nutritive des pots a été marquée au N¹⁵ afin de déterminer la quantité d'azote provenant de la fixation symbiotique entre ces 2 dates.

4.3 Expérimentation en pots à l'extérieur

Jusqu'à aujourd'hui, les études réalisées sur l'effet précédent se sont essentiellement focalisées sur les parties aériennes des résidus. Cependant, les racines constituent un compartiment pouvant participer de manière non négligeable à la fourniture d'azote à la culture suivante.

Un second essai a été installé à partir de mars 2016 afin de mieux suivre la dynamique de dégradation des racines de légumineuses pouvant expliquer plus finement l'effet précédent des légumineuses.

Pour ce faire, 200 pots de 12 L avec du substrat (60% d'attapulгите et 40% de billes d'argile) ont été installés en extérieur de façon à ce que les conditions climatiques soient le plus représentatives de celles au champ. Les espèces de légumineuses ont été semées aux deux mêmes dates qu'au champ avec 4 graines par pot.

Cinq prélèvements sont effectués régulièrement entre floraison, date de croissance racinaire maximale, et maturité. Ces prélèvements sont basés sur le stade physiologique de la plante.

Sur les plantes prélevées des mesures de biomasse et de teneur en azote ont été effectués afin de suivre l'évolution de ces variables entre les différents compartiments de la plante (systèmes racinaire, végétatif et reproducteur). Ainsi, le stade auquel commence la remobilisation des ressources vers les parties reproductives sera déterminé.

De plus, des analyses de composition biochimique telle que la quantité de cellulose, hémicellulose et composés solubles dans les parties aériennes et racinaires seront effectués.

Enfin, des incubations seront mises en place pour caractériser la dynamique de décomposition des racines des différentes espèces et les quantités d'azote potentiellement disponibles pour la culture suivante.

5. Apports personnels acquis pendant le stage

L'expérience que j'ai eu au long de ces 3 mois fut très enrichissante tant au niveau personnel que professionnel. Depuis que j'ai rejoint le collège, c'est la première fois que j'ai l'occasion de travailler sur des cultures de légumineuses. La plupart du temps, je participe à des activités dans un laboratoire d'écophysiologie, spécialisé dans la vigne. Cette expérience m'a permis d'élargir mes connaissances en écophysiologie sur de nouvelles espèces végétales. Souhaitant devenir professeur en physiologie végétale, ce stage s'intègre parfaitement dans mon projet professionnel. Le fait d'avoir participer à des travaux de thèse au cours de ce stage m'a conforté dans mon choix de poursuivre en thèse.

Cette nouvelle expérience, me permet de découvrir de nouveaux systèmes de cultures et d'enrichir mes connaissances en agronomie. Aujourd'hui, le soja est considéré comme l'une des principales cultures produites au Brésil. Il est le deuxième producteur de soja dans le monde, et chaque année les surfaces ne cessent d'augmenter. La production brésilienne a augmenté d'environ 52 % entre 2011/12 et 2015/16. Le Brésil est également le plus grand exportateur du monde de ce produit (Conab, 2015). Cependant le système rencontre un certain

nombre de limites telles que la déforestation, ou l'utilisation massive d'intrants. Par conséquent, ce stage, m'aidera je l'espère, participer à la mise en place de systèmes agricoles plus durables. En effet, je souhaite en tant qu'ingénieur agronome chercher à concevoir des systèmes de cultures moins dépendants des produits chimiques, limitant la dégradation des ressources naturelles tout en étant rentable pour les agriculteurs.

Comme en Europe, on observe au Brésil une diminution de la diversité de légumineuses cultivées en raison de leur faible valeur commerciale. Le Brésil est internationalement connu pour ses grandes étendues de monocultures, principalement en soja. Malgré tout, il y existe encore des régions (comme le sud du Brésil) qui sont des zones non dominées par la monoculture et qui sont caractérisées par des exploitations familiales. De ce fait, ce sont des régions où des projets de développement peuvent voir le jour. Ces régions ont l'avantage de présenter des propriétés plus petites avec un plus grand nombre d'agriculteurs utilisant l'agroécologie.

Le stage que j'ai suivi m'a permis d'étudier de tels systèmes, afin d'améliorer l'utilisation des espèces de légumineuses. Cette étude m'a permis de mieux comprendre l'ensemble des bénéfices que pouvaient apporter ces espèces d'un point de vue agronomique, environnemental et nutritionnel.

6. Références bibliographiques

Brasil, Conab. Acompanhamento De Safra Brasileira. *Grãos, nono levantamento, junho/2015–Monitoramento agrícola –Brasília: Conab*, 2015.

Carrouée, B, Schneider, A, Flénet, F, Jeuffroy M, H, Nemecek, T. Introduction du pois protéagineux dans des rotations à base de céréales à paille et colza: impacts sur les performances économiques et environnementales. *Innovations Agronomiques*, 2012, vol. 25, p. 125-142.

Jensen, E, S, Peoples, M, B, Boddey, R, M, Gresshoff, H, H, Alves, B, J, R, Morrison, M, J. Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012, vol. 32, no 2, p. 329-364.

BRASIL. *Soja - Análise da Conjuntura Agropecuária Novembro 2015. [en line]*. Disponible sur :<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/Soja_2015_16.pdf>. (consulté le 16/05/2016).

Schott, C, Mignolet, C, Meynard, J, M. Les oléoprotéagineux dans les systèmes de culture: évolution des assolements et des successions culturales depuis les années 1970 dans le bassin de la Seine. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 2010, vol. 17, no 5, p. 276-291.

Voisin, A, S, Guéguen, J, Huyghe, C, Jeuffroy, M, H, Magrini, M, B, Meynard, J, M, Mougel, C, Pellerin, S, Pelzer, E. Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2014, vol. 34, no 2, p. 361-380.