

UNIVERSITY OF HOHENHEIM

Faculty of Agricultural Sciences

Institute of Crop Sciences (340h)

Prof. Dr Günter Neumann

**Fertilization Strategies to Improve the Plant Growth-
Promoting Potential of Microbial Bio-Effectors.**

Dissertation

Submitted in fulfilment of the requirements for the degree of

“Doktor der Agrarwissenschaften”

(Dr. sc. agr./Ph.D. in Agricultural Sciences)

to the

Faculty of Agricultural Sciences presented

by

Isaac Kwadwo Mpanga

Born in Atebubu, Ghana

2019

1 SUMMARY

The use of plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) as inoculants to support nutrient acquisition of crops is discussed as a promising strategy for improving fertilizer use efficiency, to enable crop production with less input of fertilizers, and to reduce detrimental environmental side effects related with high inputs of mineral fertilizers. However, the efficiency of PGPM-assisted cropping systems is still biased by the limited reproducibility of the expected effects under real production conditions. This can be attributed to the sensitivity of plant-PGPM interactions to environmental stress factors particularly during the phase of establishment and to limited knowledge on positive or negative interactions with the native soil microbiome and the application conditions required for successful rhizosphere colonization as a pre-requisite for beneficial plant PGPM interactions.

This study demonstrated that the combination with compatible fertilizers offers an option to promote the establishment of PGPM effects as a potential management option to improve the performance of PGPM-assisted production strategies. In a range of model experiments with maize with a limited inherent potential for root-induced P-solubilization, it was demonstrated that the acquisition of sparingly soluble Ca-phosphates could be synergistically improved by a combination of PGPM inoculants with ammonium fertilizers, stabilized with nitrification inhibitors (Chapter 4). The effect was demonstrated for PGPMs based on 15 different fungal (genus: *Trichoderma*, *Penicillium*) and bacterial (genus: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*) strains and strain combinations, which were largely ineffective in combination with nitrate fertilization. On average over all experiments, the PGPM-ammonium combinations with sparingly soluble Ca-P supply reached about 84% of the shoot biomass production and 80% of the shoot P accumulation as compared with positive controls fertilized with soluble P. The soil pH-buffering capacity, particularly on neutral to alkaline soils, was identified as a

limiting factor, counteracting the plant growth-promoting potential of the selected inoculants with a proven ability for Ca-P solubilization on artificial growth media. Accordingly, plants supplied with nitrate fertilization were severely P deficient and the weak host plants were unable to establish a functional association with the microbial inoculants. By contrast, stabilized ammonium fertilization triggered root extrusion of protons for charge balance of ammonium uptake, associated with rhizosphere acidification, contributing to P solubilization. This increased the P-nutritional status and vitality of the host plants, which enabled the establishment of PGPMs in the rhizosphere. Interestingly in this scenario, the contribution of the PGPM inoculants to plant P acquisition was only marginally expressed but the PGPMs stimulated root development, contributing to an improved nutrient acquisition in general (Chapter 4.1).

A closer look on the related modes of action (Chapter 4.2) revealed that ammonium fertilization stimulated the production of auxin as a key regulator for root growth, both, by the bacterial inoculants and by the roots of the host plants. While ammonium supply without PGPM inoculants had no effects on total root length, the length of the root hairs and the diameter of rhizosheaths formed by root hair-adhering soil was increased, leading to an extension of the root surface area involved in rhizosphere acidification and spatial acquisition of nutrients. Moreover, root hairs have been reported as preferential infection sites for various inoculants investigated in this study, and accordingly increased root colonization of the fungal inoculant *Trichoderma harzianum* OMG16 was recorded in combination with ammonium fertilization. By contrast, there was no evidence for increased organic acid production or a contribution of the inoculants to the acquisition of organic P sources by the release of phosphohydrolases in the investigated strains. Increased rhizosphere acidification after PGPM inoculation in combination with ammonium fertilization was observed exceptionally only in one experiment conducted on

a moderately acidic sandy soil with a low buffering capacity. However, soil pH was identified as a critical factor determining the expression of the synergistic PGPM-ammonium effects on Ca-P solubilization, which declined with increasing soil pH (Chapter 4.3). Highly-buffered calcareous soils counteracted ammonium-induced rhizosphere acidification and P mobilization as a pre-requisite for PGPM-establishment in the rhizosphere. Under these conditions, successful experiments with applications of granulated fertilizers, based on stabilized di-ammonium phosphate and PGPM inoculants, suggest that placement of starter fertilizers leading to a more concentrated ammonium effect may offer an option to overcome this problem. First field experiments suggested that beneficial effects of ammonium-assisted PGPM inoculation on P acquisition can be expected particularly on soils with low P availability and the approach was patented in 2018.

As a second approach, the combination of PGPMs with fertilizers based on products of organic waste recycling, such as municipal waste compost or composted poultry manure (PM compost), applied with the same P dose, were investigated with tomato as model plant on low P soils with contrasting pH in Ghana (Chapter 5). Interestingly, on both soils, PGPM inoculation increased the P use efficiency and early plant growth only in the combination of compost with PM but not with sole compost application. Additional supplementation with ammonium on the moderately acidic soil increased plant biomass production in PGPM inoculated plants to the same level as soluble superphosphate fertilization. Similar to the ammonium-PGPM combinations, root growth stimulation was a major PGPM effect, which improved nutrient acquisition in general. Large-scale greenhouse and open-field tomato production trials conducted in Romania and Hungary revealed reproducible effects on yield and fruit quality over three years by PGPM combinations with manure-based fertilizers (Chapter 6).

Taken together, the thesis demonstrated that the selection of compatible combinations of fertilizers and PGPM inoculants is an essential factor for the successful establishment of beneficial plant-PGPM interactions in the rhizosphere. Combinations with stabilized ammonium fertilizers or with products based on organic waste recycling, such as composted manures, have been identified as two promising examples with potential for the development of PGPM-assisted production systems.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz pflanzenwachstums-stimulierender Mikroorganismen zur Unterstützung der Nährstoffaneignung von Kulturpflanzen wird als vielversprechender Ansatz diskutiert, deren Nährstoffaneignungseffizienz zu verbessern, um den Düngemiteleinsatz zu reduzieren und schädliche Umweltwirkungen in Verbindung mit intensivem Mineraldüngereinsatz zu minimieren. Allerdings ist die erfolgreiche Anwendung von PGPMs unter Praxisbedingungen nach wie vor durch mangelnde Reproduzierbarkeit der erwarteten Effekte limitiert. Dies kann zum einen auf eine hohe Sensitivität pflanzlicher PGPM-Wechselwirkungen gegenüber umweltbedingten Stressfaktoren, besonders in der sensiblen Etablierungsphase, zurückgeführt werden, aber auch auf einen noch unzureichenden Kenntnisstand im Hinblick auf förderliche oder hemmende Wechselwirkungen mit dem nativen Bodenmikrobiom, die Wurzelexsudation verschiedener Wirtspflanzenarten und die Anwendungsbedingungen, welche eine erfolgreiche Besiedelung der Rhizosphäre begünstigen, als Voraussetzung für die Etablierung pflanzenwachstums-fördernder PGPM-Wechselwirkungen.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Auswahl kompatibler PGPM-Düngerkombinationen offensichtlich Möglichkeiten bietet, die Etablierung von PGPM Effekten zu unterstützen, als mögliche Managementoption zur Optimierung PGPM-basierter Anbausysteme. Im Rahmen verschiedener Modellversuche mit Mais als Kulturpflanzenart mit limitiertem Potenzial zur wurzelinduzierten Phosphatmobilisierung, konnte gezeigt werden, dass die Aneignung schwerlöslicher Ca-Phosphate (Ca-P) in synergistischer Weise durch die kombinierte Anwendung von PGPMs mit stabilisierten Ammoniumdüngern verbessert werden konnte (Kapitel 4). Dieser Effekt konnte für PGPM Produkte auf der Basis von 15 Stämmen pilzlicher (Gattung: *Trichoderma*, *Penicillium*) und bakterieller (Gattung: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*) Herkunft bestätigt werden, die sich dagegen in Kombination mit

Nitratdüngern als weitgehend ineffektiv erwiesen. Im Durchschnitt über alle Experimente erreichten die PGPM-Ammoniumkombinationen mit Applikation schwerlöslicher Ca-Phosphate etwa 84% der Sprossbiomasse und 80% der Spross P-Gehalte im Vergleich zu Positivkontrollen mit löslichen P Düngern. Die pH-Pufferungskapazität, besonders bei neutralen bis alkalischen Böden, wurde als limitierender Faktor identifiziert, der das pflanzenwachstums-fördernde Potenzial der ausgewählten Inokulanzen begrenzte, obwohl in allen Fällen die Lösung schwerlöslicher Ca-Phosphate auf artifiziellen Kulturmedien nachweisbar war. Wirtspflanzen mit Nitratdüngung entwickelten entsprechend deutlichen P-Mangel, und die so geschwächten Pflanzen waren offensichtlich nicht in der Lage, eine PGPM- Assoziation in der Rhizosphäre zu etablieren. Durch die stabilisierte Ammoniumdüngung wurde dagegen die wurzelinduzierte Protonenabgabe zum Ladungsausgleich der Ammoniumaufnahme stimuliert, was eine Ansäuerung der Rhizosphäre, verbunden mit der Mobilisierung schwerlöslicher Ca-Phosphate zur Folge hatte und so den P-Ernährungsstatus und damit die Vitalität der Wirtspflanzen verbesserte, die dadurch in der Lage waren, die Wurzelbesiedelung durch PGPMs zu unterstützen. Interessanterweise war dabei der direkte Beitrag der PGPMs zur P-Mobilisierung nur gering ausgeprägt. Die PGPM Inokulation führte dagegen hauptsächlich zu einer Stimulierung des Wurzelwachstums, was die Nährstoffaufnahme im Allgemeinen begünstigte (Kapitel 4.1).

Ein genauerer Blick auf die beteiligten Wirkmechanismen (Kapitel 4.2) ergab eine Ammonium-induzierte Förderung der Auxinproduktion, als hormonellen Hauptfaktor für die Regulation des Wurzelwachstums, sowohl bei den bakteriellen Inokulanzen, als auch bei der Wirtspflanze. Während die Ammoniumdüngung bei den Pflanzen ohne PGPM Inokulation jedoch keinen Effekt auf die Wurzellängenentwicklung hatte, stimulierte sie doch das Längenwachstum der Wurzelhaare und die Bildung von Wurzelscheiden aus anhaftenden Bodenpartikeln, was zu

einer Vergrößerung der Wurzeloberfläche führte, die an der Ammonium-induzierten Ansäuerung der Rhizosphäre beteiligt war und eine räumliche Erweiterung der Rhizosphäre für die Nährstoffaneignung bedingte. Darüber hinaus wurden Wurzelhaare als präferenzielle Infektionsorte für zahlreiche der untersuchten PGPMs identifiziert und entsprechend wurde z.B. bei der Inokulation mit *Trichoderma harzianum* OMG16 eine verbesserte Wurzelbesiedelung unter Ammoniumdüngung festgestellt.

Im Gegensatz dazu gab es keine Hinweise auf eine verstärkte Abgabe organischer Säuren oder einen Beitrag der untersuchten PGPM-Inokulanzen zur Aneignung organischer P Formen über die Abgabe von Phosphohydrolasen. Eine verstärkte Ansäuerung der Rhizosphäre nach PGPM-Inokulation in Kombination mit Ammoniumdüngung wurde nur in einem Ausnahmefall auf einem leicht sauren Sandboden mit geringer Pufferkapazität nachgewiesen. Jedoch wurde der Boden pH-Wert als kritischer Faktor identifiziert, der die Ausprägung der synergistischen Wirkung der PGPM-Ammonium-Kombinationen beeinflusste, deren Ausprägung mit ansteigendem Boden-pH abnahm (Kapitel 4.3). Stark gepufferte Kalkböden wirkten dabei der Ammonium-induzierten Ansäuerung der Rhizosphäre zur Verbesserung der P-Aneignung entgegen, die eine Voraussetzung für eine Etablierung der PGPM-Interaktionen darstellte. Unter diesen Bedingungen zeigten erfolgreiche Experimente mit der Applikation stabilisierter Diammoniumphosphat-Granulate mit PPGP-Inokulation einen möglichen Ansatz, diesem Problem durch platzierte Applikation als Starterdüngung zu begegnen, die einen konzentrierteren Ammoniumeffekt begünstigt. Erste Feldversuche weisen darauf hin, dass Ammonium-PGPM Kombinationen besonders auf Böden mit limitierter P Verfügbarkeit zur Aneignung schwerlöslicher Ca-Phosphate wie z.B. Rohphosphat eingesetzt werden können (Kapitel 4.1 und 6), und die Anwendung wurde im Jahr 2018 patentiert.

Als weiterer Ansatz wurde die Kombination von PGPMs mit Düngern auf Basis von Recyclingprodukten organischer Abfälle, wie Haushaltskompost und kompostiertem Geflügelmist (PM-Kompost) untersucht, die mit derselben P Dosierung appliziert wurden. Tomate wurde hier als Modellpflanze auf P armen Böden mit unterschiedlichen pH Werten in Gewächshausversuchen in Ghana verwendet (Kapitel 5). Interessanterweise verbesserte die PGPM-Inokulation die P-Nutzungseffizienz und das Pflanzenwachstum auf beiden Böden ausschließlich in der Kombination von Haushaltskompost mit PM-Kompost, aber nicht bei alleiniger Verwendung von Haushaltskompost. Auf dem moderat-sauren Sandboden (pH 5.6) führte die zusätzliche Verwendung von stabilisiertem Ammonium zu einer erhöhten Biomasseproduktion, die mit der Verwendung löslicher Superphosphatdüngung vergleichbar war. Ähnlich wie bei den Versuchen mit PGPM-Ammonium-Kombinationen wurde durch Stimulierung des Wurzelwachstums die Nährstoffaneignung im Allgemeinen gefördert. Versuche zur Gewächshauskultur und zum Feldanbau von Tomaten in Rumänien und Ungarn ergaben über drei Jahre signifikant reproduzierbare PGPM Effekte im Hinblick auf Ertragsbildung und Fruchtqualität in Kombination mit organischen Düngern auf Stallmist-, Guano-, Haar-, Feder-, und Fleischmehlbasis (Kapitel 6).

Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass die Auswahl kompatibler Düngemittel-PGPM-Kombinationen essentiell für die erfolgreiche Etablierung pflanzenwachstumsfördernder PGPM-Interaktionen in der Rhizosphäre ist. PGPM-Kombinationen mit stabilisierten Ammoniumdüngern oder mit Düngern auf Basis organischer Abfallprodukte, wie z.B. Stallmistkompost wurden als zwei aussichtsreiche Beispiele mit Potenzial zur Entwicklung PGPM-unterstützter Produktionssysteme identifiziert.