

SCIENCE ET TECHNIQUE AU SERVICE DU DÉVELOPPEMENT

AGRICULTURE TROPICALE ET SUBTROPICALE

## 2<sup>e</sup> PROGRAMME

SCIENCE AND TECHNOLOGY FOR DEVELOPMENT

TROPICAL AND SUBTROPICAL AGRICULTURE

# Projets de recherche 1987 - 1991 Research projects

## Vol. 2

Résumés des rapports finals  
Summaries of the final reports

*Textes revus & préparés par*  
*Edited by*  
S. Risopoulos



*Le Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale*

*Le Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA) est installé depuis 1983 à Ede/Wageningen au titre de la Convention de Lomé entre les Etats membres de l'Union européenne et les Etats du groupe ACP.*

*Le CTA est à la disposition des Etats ACP pour leur permettre un meilleur accès à l'information, à la recherche, à la formation ainsi qu'aux innovations dans les secteurs du développement agricole et rural et de la vulgarisation.*

*Adresse postale : CTA, Postbus 380, 6700 AJ Wageningen, Pays-Bas*

*The Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation*

*The Technical Centre for Agricultural and Rural Co-operation (CTA) operates as from 1983 under the Lomé Convention between member States of the European Union and the African, Caribbean and Pacific (ACP) States.*

*The aim of CTA is to collect, disseminate and facilitate the exchange of information on research, training and innovations in the spheres of agricultural and rural development and extension for the benefit of the ACP States.*

*Postal address : CTA, Postbus 380, 6700 AJ Wageningen, Netherlands*

1987 - 1991

Deuxième Programme  
Science et Technique  
au service du Développement

---

*Second Programme  
Science and Technology  
for Development*

Sous-programme : Agriculture Tropicale et Subtropicale  
Subprogramme : Tropical and Subtropical Agriculture

Vol. 2

*Textes revus et préparés par*  
*Edited by*  
S. Risopoulos

Direction générale XII science, recherche & développement  
Directorate-general XII science, research & development

# Introduction

Nous présentons ici le volume 2 du deuxième programme "Science et technique au service du développement" créé par la Direction Générale XII de la Commission Européenne. Le volume 1, paru en 1994, rendait compte des résultats de 50 projets de recherche agricole en conditions tropicales et subtropicales. Le présent volume propose le résumé des rapports finals de 53 projets du même type, dont 35 traitent de l'amélioration des productions agricoles (25 pour la production végétale et 10 pour la production animale), 10 de la conservation et de la mise en valeur du milieu, 5 du génie agricole et des techniques après-récolte, et 3 de systèmes de production.

Comme les publications précédentes du programme, ce livre témoigne d'une collaboration fructueuse entre les institutions scientifiques des pays en développement et celles des pays membres de l'Union Européenne. Il est publié conjointement par le Centre de Coopération Agricole et Rurale (CTA), créé dans le cadre de la Convention ACP/UE de Lomé, et par la Direction Générale XII.

*We hereby present the second volume of the second programme "Science and Technology for Development" initiated by the Directorate General XII of the European Commission. The first volume, published in 1994, gave an account of the results of 50 agricultural research projects in tropical and subtropical conditions. The present volume includes the summaries of the final reports of 53 similar projects, of which 35 deal with improved agricultural production (both plant production (25) and animal production (10)), 10 deal with conservation and better use of the environment, 5 with agricultural engineering and post-harvest technology, and 3 with production systems.*

*This volume, like the preceding publications of the first and second STD programmes, reflects the fruitful collaboration between scientific institutions in developing and EU countries. It is jointly published by the Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA), established under the ACP/EU Lomé Convention and by Directorate General XII.*



AMELIORATION  
DES PRODUCTIONS AGRICOLES  
IMPROVEMENT OF AGRICULTURAL  
PRODUCTS

PRODUCTION  
VEGETALE

—————

*PLANT  
PRODUCTION*

Amélioration des plantes - agronomie

Plant improvement - agronomy

Numéro de contrat :  
Contract number :

**TS2-A-014/015**

▼ TITRE :	<b><i>Techniques de gestion du sol et alimentation hydrique des cultures annuelles tropicales.</i></b>
Title :	<i>Soil management techniques and water use by annual tropical crops.</i>
▼ CHEF DE PROJET : Project leader :	Jean-Louis Chopart
▼ INSTITUTION-HOTE : Host institution :	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD-CA.
▼ ADRESSE : Address :	CIRAD-CA, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France.
▼ TELEPHONE :	+33-67-61 58 00
▼ FAX :	+33-67-61 59 88
▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES : Associated Institutions :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Côte d'Ivoire : Institut des Savanes, IDESSA, Département des Cultures Vivrières.</li> <li>- France : Centre National de Recherche Scientifique, Laboratoire des Transferts en Hydrologie et Environnement, CNRS-LTHE.</li> <li>- Burkina Faso : Institut d'Etudes et de Recherches Agricoles, INERA.</li> <li>- Mali : Institut d'Economie Rurale, IER, Département de la Recherche Agronomique.</li> <li>- Sénégal : Institut Sénégalais de Recherches Agronomiques, ISRA.</li> <li>- Tchad : Institut de Recherches sur le Coton au Tchad, IRCT Tchad.</li> </ul>
▼ MOTS CLES : Key words :	<p>fertilisation minérale; travail du sol; fumier; bilan hydrique; résistance à la sécheresse; racine; environnement; culture annuelle; Afrique de l'ouest; reproductibilité.</p> <p><i>mineral fertilization; soil tillage; manure; water balance; drought resistance; root systems; environment; annual crops; west africa; sustainability.</i></p>
▼ RAPPORT FINAL : Final report :	57p. Français (+ rapports des institutions associées et annexes).

# Techniques de gestion du sol et alimentation hydrique des cultures annuelles tropicales

## Objectifs de la recherche

En Afrique tropicale sèche, la variabilité de la pluviosité et de la production sont grandes, sans qu'il existe toujours de relations étroites entre celles-ci. De même, les effets des techniques culturales sur la production apparaissent fluctuants, cette variabilité étant mal expliquée, ce qui gêne l'extension des résultats.

Dans le cadre d'un projet de recherche en réseau, des expérimentations au champ ont été menées pendant cinq ans dans cinq pays d'Afrique tropicale (Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Sénégal, Tchad).

Les objectifs étaient :

- Optimiser l'utilisation de l'eau pluviale par les cultures annuelles dans les zones à risque climatique, grâce à des techniques adaptées. On cherchait, en particulier, à améliorer la croissance et le fonctionnement des systèmes racinaires.
- Etudier, pour mieux les comprendre, les interactions entre le milieu physique, les techniques culturales, l'alimentation hydrique et la production.

Le projet comprenait également des partenaires européens apportant un appui scientifique au travail réalisé sur le terrain. Les différents participants ont travaillé à l'intérieur d'un réseau de recherche, dans le but d'accroître la collaboration entre des chercheurs des Systèmes Nationaux de Recherche Agricole (SNRA) d'Afrique de l'ouest et du centre. En cela, le projet avait donc également une fonction de formation sur le terrain aux méthodes de la recherche dans le domaine concerné.

## Matériel et méthodes

Un ou plusieurs dispositifs agronomiques ont été mis en place dans chacun des cinq pays partenaires pour étudier, en réseau, l'action de trois techniques culturales : l'engrais minéral, le travail du sol, le fumier. Deux traitements étaient communs aux différents essais : un témoin en semis direct sans fertilisation et un traitement combinant engrais, labour et fumier. Les autres traitements étaient choisis en fonction de leur représentativité locale. Des mesures variées sur le sol, les termes du bilan hydrique, et la plante (parties aériennes, racines) ont été réalisées. Certaines méthodes ont fait l'objet de mises au point ou de tests de terrain, pour les adapter à la problématique du projet. Celui-ci a ainsi apporté une contribution sur le plan méthodologique dans les domaines suivants : analyse de la variabilité spatiale des dispositifs à l'aide de concepts géo-

statistiques, validation d'un modèle de simulation du bilan hydrique, évaluation des caractéristiques hydrodynamiques de la surface du sol, caractérisation de l'enracinement des cultures au champ.

## Résultats et discussion

Pendant la durée de l'expérimentation (1989 à 1992), les conditions d'alimentation hydrique ont été bonnes sur les dispositifs situés entre le 8<sup>ème</sup> et le 13<sup>ème</sup> parallèle. Plus au nord, dans le Sahel (nord de Burkina Faso), mais aussi plus au sud, au nord de la zone à deux saisons des pluies, des problèmes de sécheresse se sont vérifiés. La production et les effets des techniques sont très variables. La variabilité est au moins aussi grande, dans un même pays, d'une année à l'autre, que d'un pays à l'autre ou d'une espèce à l'autre.

Les résultats de production obtenus, pendant trois ans, sur les différents

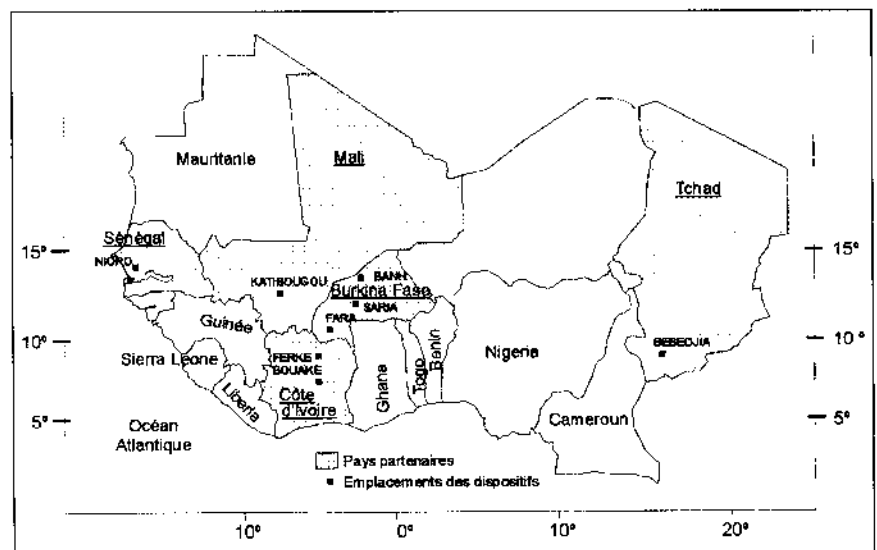
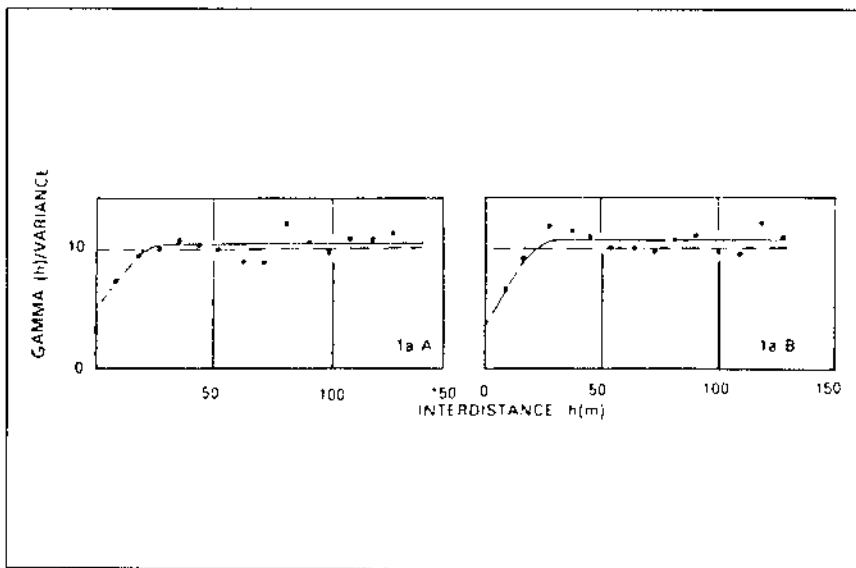


Figure 1 - Localisation des pays partenaires et dispositifs expérimentaux du projet.



Semi-variogrammes expérimentaux (.) et théoriques (-) des rendements en pailles (A) et grains (B).

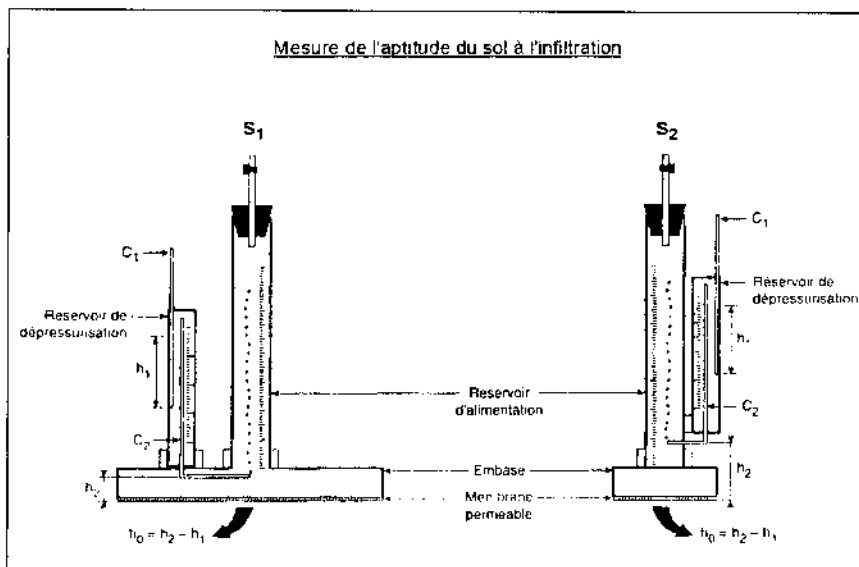
Figure 2 - Etude de la variabilité spatiale des dispositifs en première année. Exemples des semi-variogrammes de la production de la culture homogène du cotonnier à Bouaké en 1988.

dispositifs permettent d'évaluer des effets moyens par espèce. Dans la zone considérée, l'engrais permet bien une augmentation marquée de la production, en revanche, les effets directs moyens du labour et du fumier, d'environ 10 %, sont faibles. Dans certaines conditions, on peut même obtenir des effets négatifs de chacune des trois techniques d'intensification étudiées.

Compte tenu de la variabilité des données, on ne peut se contenter de l'étude des moyennes. On a tenté d'expliquer la variabilité des résultats, au moins sur certains dispositifs plus particulièrement intéressants. Il s'agit de ceux soumis à la sécheresse et ceux sur lesquels on a observé des effets négatifs des techniques. On a procédé à des mesures et analyses diverses sur

la plante et à l'établissement de relations entre les conditions d'alimentation hydrique et la production. Il apparaît que la production et les effets des techniques étudiées sont sous l'étroite dépendance des conditions d'alimentation hydrique. Celles-ci augmentent généralement le développement des parties aériennes et les besoins en eau. Ainsi, dans la zone centrale de la Côte d'Ivoire, on a obtenu les résultats suivants :

- Sur un terrain fertilisé, en semis direct, l'augmentation des besoins se fait sans augmentation parallèle du volume d'eau disponible et le risque de stress hydrique est accru dès le début du cycle. Par exemple, l'effet de l'engrais sur la production du maïs peut devenir nul à partir d'un taux de satisfaction des besoins en eau inférieur à 0.6 pendant la phase reproductive.
- Le labour améliore l'offre en eau, grâce à des effets sur le sol (infiltrabilité) et sur les racines (vitesse de croissance, occupation du sol en profondeur), mais les besoins en eau sont également augmentés. En début de cycle, l'efficacité de l'eau consommée est meilleure et les cultures supportent mieux une sécheresse modérée. Il en est de même pour la phase de reproduction, jusqu'à un taux de satisfaction des besoins de .7. Si la sécheresse est encore plus forte, la production de graines peut être très diminuée et devenir inférieure à celle d'une parcelle sans travail du sol.
- Le fumier a un effet positif sur le sol et les racines, mais, comme le labour, il fait également courir un risque accru à la culture en cas de forte sécheresse. L'action du fumier n'est pas immédiate, comme celle de l'engrais minéral ou du labour; en revanche, il existe des effets cumulatifs et résiduels plus forts sur le sol (infiltration de l'eau, racines) et sur la production.



S1 (diamètre 250mm) et S2 (diamètre 80mm)

Figure 3 - Détermination in situ des caractéristiques hydrodynamiques du sol. Schéma des infiltromètres à disques utilisés.

Dans d'autres milieux, comme dans le centre du Burkino Faso, le fumier a également un effet marqué sur la capacité du sol à retenir les cations

dans les couches superficielles du profil.

Les nombreux résultats ont permis de tirer des enseignements et de faire des propositions sur les trois plans suivants : scientifique, pratique, méthodologique.

Sur le plan scientifique, on a mis en évidence la grande variabilité des effets des techniques. Dans les zones à risque climatique, encore plus qu'ailleurs, les liaisons entre techniques culturales et production ne sont ni simples ni directes. Il faut donc concevoir, à partir de résultats de terrain, un schéma d'analyse du fonctionnement du sol et du peuplement végétal prenant en compte le bilan hydrique, pour mieux comprendre, puis modéliser les effets des pratiques culturales. Cela commence à être bien admis dans le domaine de la physique du sol, mais pas encore suffisamment dans les études de fertilisation. Certains effets nuls ou négatifs de l'engrais, observés et expliqués par des causes hydriques devraient inviter à une réflexion dans ce domaine.

Dans les zones les plus soumises à la sécheresse, l'agriculteur doit raisonner ses itinéraires techniques en fonction du risque climatique et donc du risque économique qu'il accepte de prendre. En matière de techniques culturales, il n'est donc pas souhaitable de lui donner des conseils standards applicables à de larges surfaces. Le rôle du chercheur ou de l'agent de développement ne peut être que d'aider l'agriculteur à prendre lui-même ses décisions à partir d'un référentiel local d'effets des techniques et grâce à des outils de diagnostic cultural et d'aide à la décision.

Les travaux entrepris dans le cadre de ce projet ont été l'occasion de tester, d'adapter, ou même de mettre au point quelques uns de ces outils. On a systématiquement recherché le caractère "portable" et simple de leur utilisation sur le terrain, pour les rendre opérationnels en milieu réel, sans toutefois porter préjudice à la

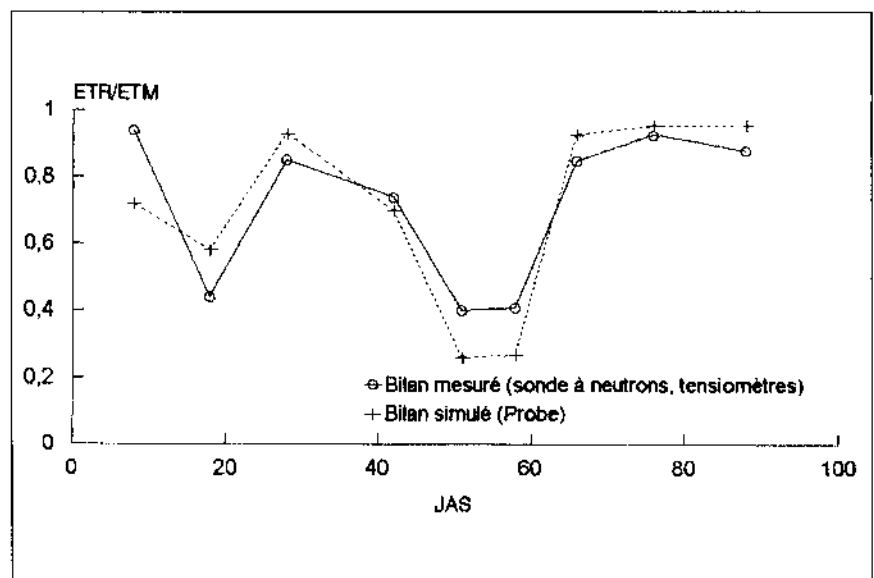


Figure 4 - Evolution des taux de satisfaction des besoins en eau du maïs à Bouaké en 1989. Comparaison des résultats du bilan hydrique par des mesures in situ avec une sonde à neutrons + tensiomètres et par le modèle de simulation PROBE.

fiabilité des résultats. On est arrivé, en particulier, à mieux caractériser plusieurs facteurs explicatifs du comportement des cultures en conditions d'alimentation en eau irrégulière. Il s'agit de l'infiltrabilité du sol, des termes du bilan hydrique (par modélisation) et des système racinaires. Ces

outils devraient maintenant pouvoir être mis en oeuvre dans des études en milieu réel comme des projets de Recherche-Développement. On pourra, en particulier, porter une attention toute particulière aux effets, très complexes, de la matière organique sous ses différentes formes de rapport.

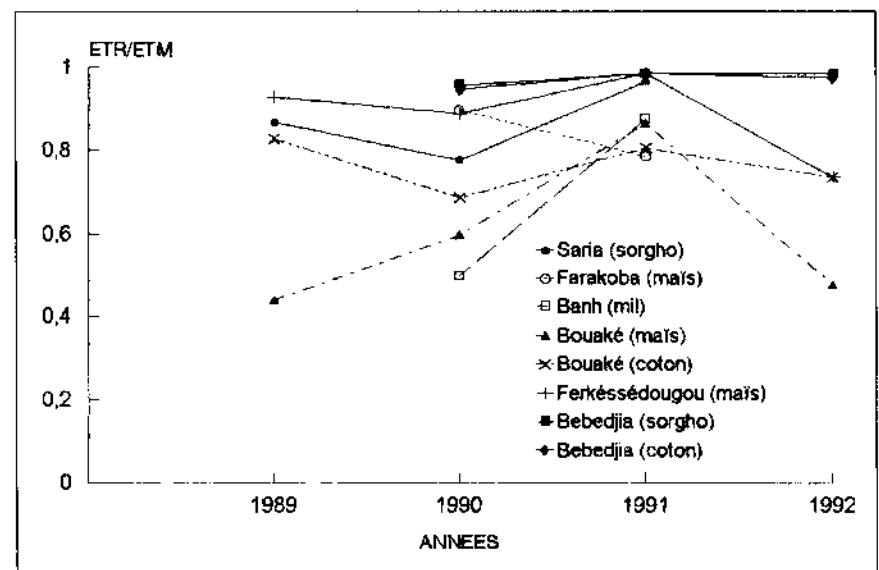


Figure 5 - Variations inter-annuelles du taux de satisfaction des besoins en eau des cultures (ETR/ETM) sur les différents dispositifs au cours de la période critique. Résultats obtenus par le modèle de simulation du bilan hydrique PROBE.

## Conclusion

On dispose maintenant, pour la région concernée par l'étude :

- d'un référentiel fiable d'effets des techniques testées,
- d'une meilleure connaissance des relations complexes entre sol, techniques culturales, alimentation hydrique et production,
- d'outils d'aide à la décision à la disposition de l'agriculteur ou des agents de développement.

L'agriculteur doit prendre en compte, lorsqu'il met en oeuvre des pratiques culturales d'intensification dans les zones à risque climatique, l'augmentation du risque financier, lié à l'augmentation du risque de stress hydrique. En effet, il est apparu que ni le labour, ni le fumier, et encore moins la fertilisation minérale, ne permettent d'améliorer la production en cas de sécheresse très sévère dont l'occurrence est à évaluer localement, comme cela a pu être fait en Côte d'Ivoire (une année sur six dans le centre du pays). On comprend donc mieux, maintenant, le fonctionnement de la parcelle cultivée dans un milieu à pluviosité irrégulière et on explique mieux la variabilité de l'effet des techniques. Le diagnostic hydrique et l'évaluation du risque climatique sont des outils précieux dans ce domaine.

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche, réalisé au champ, dans cinq pays voisins d'Afrique tropicale, sont donc une contribution à une production plus stable et plus durable, car mieux maîtrisée, des cultures annuelles dans les exploitations agricoles de ces régions tropicales concernées par les problèmes de sécheresse.

## Publications

Chopart J.L., 1990. Rôle du travail du sol sur les termes du bilan hydrique, enracinement, rendement des cultures pluviales (cas du Sénégal et de la Côte d'Ivoire). In "Agronomie et ressources naturelles en régions tropicales", CIRAD édit. Montpellier, France, 223-237.

Chopart J.L. et Vauclin M., 1990. Water balance estimation model : field test and sensitivity analysis. *Soil Science Soc. America J.*, 54, 1377-1384.

Chopart J.L., Nicou R. et Vauclin M., 1991. Le bilan hydrique : dilettantisme ou nécessité pour comprendre les relations milieu physique-culture en zone tropicale sèche? In "Soil water balance in the Sudano-Sahelian zone", IAHS Pub. n° 19. UK, 345-355.

Chopart J.L. et Kone D., 1994. Fluctuation de l'alimentation hydrique du maïs en région centre de Côte d'Ivoire. In "Bilan hydrique agricole et sécheresse en Afrique tropicale. Vers une gestion des flux hydriques par les systèmes de culture". John Libbey Eurotext Edit. France, 39-47.

Djoulet B. et Fortier R., 1994. Influence des techniques culturales sur le système racinaire du cotonnier. Conséquences sur l'alimentation hydrique et minérale. In "Bilan hydrique agricole et sécheresse en Afrique tropicale". John Libbey Eurotext Edit. France, 205-216.

Ouattara B., Sedogo M.P., Loinpo F. et Ouattara K., 1994. Effets des techniques culturales sur l'alimentation hydrique du sorgho et le bilan minéral du sol dans le plateau central du Burkina Faso. In "Bilan hydrique agricole et sécheresse tropicale. Vers une gestion des flux hydriques par le système de culture". John Libbey Eurotext Edit. France, 91-101.

Van Duivenbooden N. et Cisse L., 1993. Fertilization of millet cv. Souma III in Senegal : dry matter production and nutrient uptake. *Fert. Res.*, 35, 217-226.

Vachaud G., Vauclin M. et Cisse L., 1991. Mesure in situ de la consommation en eau des cultures pluviales par humidimétrie neutronique. In "Soil water balance in the Sudano-Sahelian zone", IAHS Pub. n° 199. UK, 275-288.

Vauclin M. et Chopart J.L., 1991. Water balance modelling of cropped soil : deterministic and stochastic approaches. In "Soil water balance in the Sudano-Sahelian zone", IAHS Pub. n° 199. UK, 471-482.

Vachaud G., Vauclin M. et Laty R., 1991. Caractérisation hydrodynamique in situ de

quelques sols Soudano-Sahéliens à l'aide d'un programme de calcul assisté par micro-ordinateur. In "Soil water balance in the Sudano-Sahelian zone", IAHS Pub. n° 199. UK, 175-185.

Vauclin M. et Chopart J.L., 1991. Méthodologie d'analyse de la variabilité spatiale de dispositifs agronomiques. In "Utilisation rationnelle de l'eau des petits bassins versants en zone aride", éd. Aupelf-Uref. John Libbey Eurotext, Paris, 307-315.

Vauclin M. et Chopart J.L., 1992. L'infiltrométrie multidisque pour la détermination in situ des caractéristiques hydrodynamiques de la surface d'un sol gravillonneux de Côte d'Ivoire. *L'Agron. Trop.*, 46-4, 11-27.

## ■ Principales communications orales

Chopart J.L., 1990. Variable effects of soil cultivation on maize production in the Ivory Coast as a function of conditions affecting water supply. In "Climatic risk in crop production : Models and management in the semi-arid tropics and sub-tropics". Poster papers from Int. Symposium Brisbane. Muchow and Bellamy CSIRO edit. Australia, 104-105.

Chopart J.L. et Siband P., 1993. A method for annual plant root system studies in the field by root mapping : advantages and problems. Poster abstract. In "Abstracts of presentations at the first Int. Symposium on the biology of adventitious root formation". USDA general technical report NC 154.

Ouattara B. et Chopart J.L., 1993. Programme R3S Facteurs agronomiques d'adaptation à la sécheresse. Un référentiel de terrain, de nouveaux outils de diagnostic et d'aide à la décision pour un choix raisonné d'itinéraires techniques. Comm. à la 6ème Conf. plénière de la CORAF, 18-19 mars 1993. Ouagadougou, Doc. mult. CIRAD bp 5035 34032. Montpellier, France, 13pp.

Vauclin M. et Chopart J.L., 1992. Field measurement of hydraulic properties of soil surface under different cultural practices. Comm. European Geophysical Society, XVII General Assembly. Edinburgh, U.K., 1pp.

Vauclin M. et Chopart J.L., 1992. Field determination of surface hydraulic properties of a tilled and untilled gravelly soil. Comm. Int. Sci. Soc. Conf. on "Operational methods to characterize soil behaviour in space and time", 16-29 July 1992, Cornell Univ., New York, USA.

Numéro de contrat : TS2-A-019  
Contract number :

▼ TITRE : ***Amélioration génétique de la résistance du blé  
à la sécheresse du milieu  
par des indices physiologiques et biochimiques. \****

Title : *Wheat breeding for drought-prone environments  
by means of physiological and biochemical indices.*

▼ CHEF DE PROJET : Dr. Abdellah Ouassou  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Institut National de la Recherche Agronomique, INRA.  
Host institution :

▼ ADRESSE : Avenue de la Victoire BP 415,  
Address : Rabat, Maroc.

▼ TELEPHONE : +212-7-25 83

▼ TELEX : 31702 M

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES : - Italie : Experimental Institute for Cereal Research,  
Associated Institutions : Section of S. Angelo Lodigiano.

▼ MOTS CLES : blé dur; résistance à la sécheresse; indice physiologique; indices  
morpho-agronomique.  
Key words : *hard wheat; drought resistance; physiological indices; morpho-  
agronomical indices.*

▼ RAPPORT FINAL : 169p. Français.  
Final report :

\* voir aussi Publication STD2-Vol. 1, 1992; projet TS2-A-011, p. 3

# Amélioration génétique de la résistance du blé à la sécheresse du milieu par des indices physiologiques et biochimiques

## Introduction

Au Maroc, la sécheresse est un des principaux facteurs limitant la productivité du blé dur (*Triticum durum* Desf.). Elle peut changer de lieu, d'intensité, de durée et même son apparition dans la saison. Ses effets peuvent être aggravés dans certaines régions par des sols de faible capacité de rétention d'eau. Lorsqu'elle intervient au début du cycle, juste après la germination, phénomène fréquent dans cette zone céréalière, elle réduit souvent le peuplement du blé. La sécheresse peut parfois durer le long du cycle de la culture, mais souvent elle est intermittente dans son apparition. Cependant, même si elle peut causer des dégâts à différents moments du cycle du blé, le stade critique commence avec l'apparition de la dernière feuille et se prolonge jusqu'à la floraison (Schmidt, 1983).

L'amélioration variétale pour la résistance à la sécheresse dans ces régions semi-arides est un problème complexe qui nécessite une approche combinant à la fois le travail empirique de l'améliorateur, qui observe la plante entière et choisit parmi des milliers de génotypes les plantes les plus performantes, alors que le physiologiste observe chaque caractère et essaie de le relier à la performance de la plante dans une situation donnée. Un des principaux empêchements à l'intégration de ces deux approches pour l'amélioration variétale à la résistance au stress est le manque de méthodes de triage simple et rapide au laboratoire, dont les résultats seront raccordés à ceux du champ.

Ce travail se propose comme objectifs d'évaluer et d'améliorer quelques tests indiqués dans la littérature comme pouvant donner des indications sur la résistance à la sécheresse des variétés de blé. Ces tests ont été menés au laboratoire et au champ pour certains traits morpho-physiologiques, afin d'identifier ceux qui peuvent être retenus comme critères de sélection dans un programme d'amélioration variétale et, si possible, définir un idiotype de variété de blé dur pour les traits retenus et pour nos conditions.

## Matériel et méthodes

L'étude a porté sur 24 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) adaptées aux conditions climatiques du Maroc.

Parmi les critères utilisés pour évaluer les plantes à l'égard de leur résistance au laboratoire, citons : la germination à différentes pressions osmotiques (PEG-300), la longueur du coléoptile, la capacité de rétention d'eau au niveau des feuilles excisées, la stabilité de la membrane cellulaire aux chocs thermiques et osmotiques, et l'analyse "osmo-mécanique" quantifiant les paramètres de résistance pour chaque catégorie cellulaire. Au champ, les 24 variétés ont été conduites dans les stations expérimentales de Deroua et de Rabat, et des caractéristiques morpho-agronomiques ont été déterminées en conditions sèches et irriguées pour évaluer l'adaptation et les potentialités du matériel végétal étudié.

## Résultats

La phase germination et émergence des plantules est fondamentale pour la réussite d'une culture. Les 24 variétés testées en conditions artificielles ont répondu différemment au stress hydrique et indiquent la présence d'une variabilité énergétique pour ce caractère. La préparation médiocre du lit de semence ajoutée aux conditions de stress hydrique du sol réduit l'émergence des graines des nouvelles variétés semi-naines productives. Les valeurs moyennes de la longueur du coléoptile obtenue chez les 24 variétés ont pu être séparées en trois grandes classes : 7 à long coléoptile (7 à 9,5 cm), 12 à moyen coléoptile (5,5 à 7,0 cm) et 5 variétés à court coléoptile (4 à 5,5 cm). L'obtention de variétés productives à long coléoptile permettra d'améliorer la réussite de la levée, facteur important dans l'amélioration des rendements dans la région semi-aride. L'étude de la capacité de germination et de la longueur du coléoptile sont des techniques de sélection importantes, surtout lorsque la sécheresse survient au début du cycle de développement du blé.

La capacité de rétention hydrique des feuilles excisées a permis de classer les 19 variétés testées et d'indiquer que les variétés résistantes à cette perte d'eau en condition de sécheresse sont les variétés locales : Oued Zenati et Zeramek suivies de la variété Sham-1.

Les résultats de la stabilité de la membrane cellulaire du tissu foliaire de blé dur après une déshydratation atmosphérique (à 50 °C) d'une part, et



une déshydratation par un agent osmotique (PEG-300 à 18 atm) d'autre part, ont donné différents classements pour les 24 variétés. Le pourcentage de dégâts est élevé au niveau des segments foliaires qui ont subi un choc thermique (79,9 %) par rapport à ceux du choc osmotique (9,9 %). Les trois variétés locales - Selbera, Zeramek et Oued Zenati - n'ont pratiquement pas eu de perte ionique suite au choc osmotique utilisé, alors que le test de thermostabilité de la membrane a été faible pour Selbera, E44, Massa et ACSAD-65. Seule Selbera présente un faible dégât dans les deux tests. Les valeurs de la stabilité de la membrane cellulaire à 18 atm sont faiblement corrélées avec celles de la germination à 10 atm (0,44), de la capacité de rétention hydrique (0,45) et inversement corrélées à celles de l'espace libre apparent (-0,87).

## Conclusions

Plusieurs corrélations non significatives sont obtenues entre les indices des tests physiologiques indiquant que les mécanismes de la tolérance à la sécheresse à différents stades de croissance sont indépendants. Ainsi, aucun

critère physiologique à lui seul ne peut être fiable pour son utilisation dans l'étude de la résistance à la sécheresse.

Tous les tests physiologiques ne sont pas strictement corrélés avec les indices morpho-agronomiques et avec le rendement. Très probablement, chaque test évalue le comportement particulier de la plante réagissant à un stress donné, au cours d'une phase de son développement.

La combinaison de certains critères est impérative pour essayer de comprendre et de choisir la plante à l'égard d'un stress qui peut survenir à n'importe quel moment de son cycle de développement (germination, stade plantule, épanouissement).

L'association des tests physiologiques avec les indices morpho-agronomiques est meilleure pour la longueur du coléoptile, la stabilité de la membrane cellulaire et même la perte d'eau des feuilles excisées par rapport à la germination en solution osmotique.

La combinaison des trois premiers tests pourrait être considérée comme

un bon critère de sélection dans un programme d'amélioration variétale. L'analyse osmo-mécanique semble aussi être une très bonne technique de sélection, mais elle nécessite d'être informatisée pour être couramment utilisée en amélioration sur une grande masse de matériel végétal.

Parmi les caractères physiologiques et morphologiques associés à un rendement élevé en sec, citons : un taux élevé de la germination corrigée à 10 atm après une période de 21 jours, un long coléoptile, une surface foliaire réduite, une transpiration articulaire faible en condition sèche, un espace libre apparent faible, une stabilité de la membrane cellulaire aux contraintes thermique et hydrique, une courte paille et une date d'épiaison précoce.

Ces caractères ont permis de discriminer les variétés étudiées et ont permis d'identifier certaines variétés qui semblent tolérer la sécheresse et être productives telles que E44, ACSAD-65, Sarif et Isly, et des variétés à caractères désirables à utiliser dans un programme de croisement.

Contract number : TS2-A-029  
 Numéro de contrat :

- |  |   |
|--|---|
| ▼ TITLE :  | <b><i>Phosphorus cycling and sustainability<br/>in agroforestry systems in the humid tropics.</i></b>   |
| Titre :  | <i>Le cycle du phosphore et la production durable<br/>dans les systèmes agro-forestiers des tropiques humides.</i>  |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                     | Bryon W. Bache  |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :                 | University of Cambridge,<br>Department of Geography.  |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                   | Downing Place,<br>Cambridge, CB2 3EN, U.K.  |
| ▼ TELEPHONE :  | +44-223-33 33 99  |
| ▼ FAX :  | +44-223-33 33 92  |
| ▼ ASSOCIATED<br>INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | - Spain : Estacion Experimental del Zaidin, CSIC, Granada 18080.<br>- Costa Rica : Centro de Investigaciones Agronomicas, Universidad<br>de Costa Rica, San Jose.   |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                               | agroforestry; alley-cropping; biomass; humid tropics; phosphorus;<br>sustainable agriculture; ultisols; costa rica.<br><i>agroforesterie; culture entre haies; biomasse; tropiques humides;<br/>phosphore; agriculture durable; ultisols; costa rica.</i> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                        | 53p. English.   |

# Phosphorus cycling and sustainability in agroforestry systems in the humid tropics

## Objectives of the research

There is an urgent need to find a stable and sustainable alternative to shifting cultivation in the tropics. Agroforestry, and especially the technique of alley cropping or hedgerow intercropping, has been seen as a hopeful new technology for small farmers, providing them with tree products and the social and economic benefits of sedentary life styles and sustainable production. Alley cropping (AC) should enable the farmer to exploit the high productivity of trees and to benefit from their nutrient-enhancing symbioses and weed suppressing effects, while at the same time allowing him to grow crops simultaneously and on a sustained basis. While the technique has been studied on seasonally-dry alfisols at IITA in Nigeria, it is unclear how successful it will be on the more typical highly-leached ultisols and oxisols which cover more than half of the humid tropics. The below-ground interactions between the tree roots, the crop roots, the mycorrhizal fungi and the soil fauna, are very poorly understood, but it seems that the immediate constraint on crop production on ultisols is phosphorus (P) deficiency, rather than nitrogen or base-action deficiency, although aluminium toxicity (which interacts with P deficiency) may also be involved. Moreover, the availability of P in P-deficient situations is intimately dependent on soil microbiological associations, particularly those involving mycorrhizae. We therefore propose that the main benefit of alley cropping over open-field cultivation should be on the recycling of P, both by tree roots, and by the effects of the tree mulch on the microbiology of the litter layer.

The specific objectives of the research then become:

to establish a comparison between an AC farming system and an open-cultivation farming system, on ultisols of the humid tropics in Costa Rica,

to examine nutrient cycling in the two farming systems, with particular reference to phosphorus and the effects of the soil biological system on its transformations and availability.

The work was done in cooperation with Centro de Investigaciones Agromónicas, University of Costa Rica (CIA-UCR) and Estacion Experimental del Ziaidin, (EEZ-CSIC), Granada, Spain.

## Materials and methods

### ■ The experimental sites

Two experimental farms have been established in separate locations about 100 km apart in the Atlantic lowlands of Costa Rica, at La Conquista in Sarapiquí province, and at Cooperativa San Juan in San Carlos province. The two sites have similar climate landforms and history of soil development. Both are located on the margins of old river terraces where the through-flow of groundwater from the annual rainfall of about 4 metres results in intensive leaching. The soils are acid infertile ultisols with a high P-fixing capacity.

The site at La Conquista has soil pH (in 5 mM CaCl<sub>2</sub>) of 3.9 at the surface and 3.7 at 20 cm. Secondary forest was cleared and burned in 1985. The experimental area was loaned by a small farmer in 1989, but he reclaimed it to grow pineapples in 1992, so the data from this site is limited. The site at Coope San Juan has soil pH 4.1 at

the surface and was cleared of secondary forest and burned early in 1989. The experimental work is continuing at this site, under EC contract TS3-CT 91-0021.

### ■ Tree and crop species

The classical alley cropping tree, *Leucaena leucocephala* does not grow well on very acid soils, so initially we chose two common hedgerow species in Costa Rica, *Glyricidia sepium* and *Erythrina fusca* and added *Inga edulis* later on. All are leguminous trees. Early in 1989 a tree nursery was established to provide 20,000 trees of the first two species. For the crops, our intention was to establish a simple, realistic and repeatable analogue of normal local practice, and so we chose the two main crops of the native subsistence farmers, maize and beans. Maize is grown over the wetter season, planted in May/June and harvested September/October. This is followed by beans, harvested during the drier period in February.

### ■ Experimental design

We chose a simple experimental design aimed at answering the main questions we are asking and that could be managed with the resources available. Large plots are necessary for four reasons: to overcome effects of soil variability on recently-burned sites, to reduce edge effects, to minimize the effects of crop damage from pests and large herbivores, and to have an experimental area similar in size to a typical family swidden so that realistic labour inputs could be estimated. At each site we laid out a 2x2 factorial trial, the two factors being AC and P additions, replicated in 4 blocks, giving a total of 16 plots, each 20 m x 20 m in size, with discards between the plots. The total managed area at each

site is therefore about 0.7 hectare. The alley tree seedlings were planted in June 1989, alternate hedges of *Erythrina fusca* and *Glyricidia sepium* aligned east-west, 0.4 m apart in the rows with a 2.5 m alley between the rows. The first maize was sown in July 1989, and the first beans in December 1989. The AC plots contain fewer crop plants than the open control plots, for maize 648 per plot compared with 864, and for beans 2,000 per plot compared with 2,400. Thus crops on the AC plots have to outyield the control plots to give a comparable yield per unit area. The P treatments consisted of addi-

tions of powdered rock phosphate to supply 20 kg/ha P in December 1989, 40 kg/ha P in December 1990 and 40 kg/ha P in December 1991, in total 100 kg/ha P.

### ■ Sampling and analysis

Soils were sampled in detail before the start of the trials using geostatistical procedures, and samples were taken from the experimental plots at each stage of growth. Their analysis has been held up because the CIA-UCR laboratory was wrecked in the earthquake of 1990, but is proceeding under

contract TS3-CT 91-0021. Extensive hedgerow tree and crop samples were taken as described below during the course of the trials, both for biomass estimates and for chemical analysis, delayed because of the laboratory problems.

### Results

To achieve a nutrient balance for this agroecosystem, the production of all the vegetation has to be monitored and analysed chemically. Quite apart from the nutrient analyses (over which there is some delay as mentioned above), the total biomass from hedgerows and crops is a vital component of the ecosystem in its own right, and most of the following results refer to this.

### ■ Hedge biomass production

This consists of three components: leaf and branch mulch, stemwood and roots. Leaf and branch mulch is produced by the prunings, and it required some trial and error to obtain a pruning regime that gave the correct balance between allowing the crops sufficient light, and leaving sufficient leaf material on the hedges for them to recover rapidly from pruning. A stable management regime was established by year 3 of the trial, and consisted of a heavy pruning before crop planting (June and December) and a lighter pruning during crop growth (July and February). This gives something close

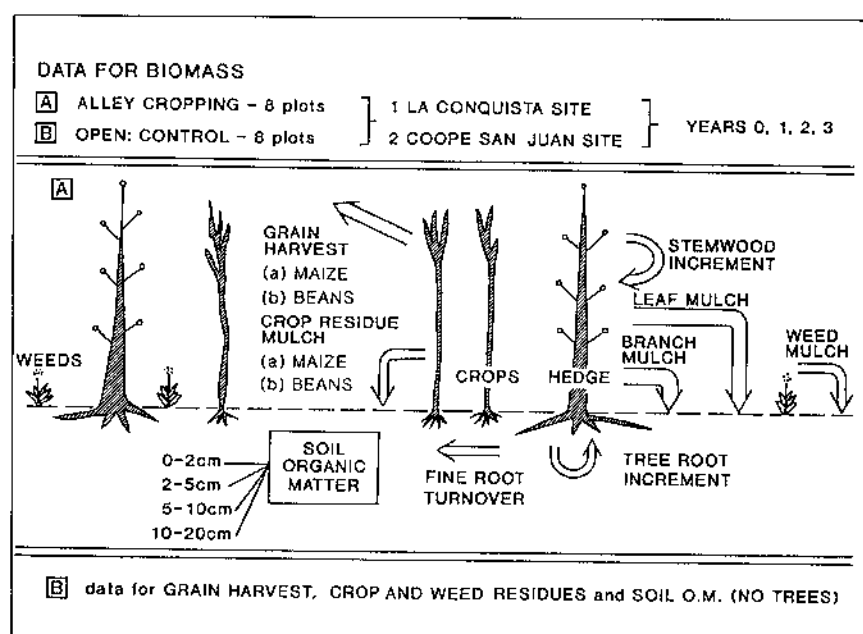


Figure 1 - Analysis of biomass production for year 3.

Sub-treatment	Glyricidia					Erythrina					AC Total		
year	prunings			stemwood roots		prunings			stemwood roots		prun.	stemw.	roots
	leaf	branch	total			leaf	branch	total					
P0													
year 1	26	27	52	97	114	60	49	110	114	74	162	211	188
year 2	197	166	363	108	121	216	149	365	69	42	728	177	163
year 3	219	147	366	80	88	149	88	237	50	33	603	130	121
P+													
year 1	26	27	52	103	120	60	49	110	153	98	162	256	218
year 2	198	178	376	125	141	272	189	461	55	35	837	180	176
year 3	211	160	371	48	57	229	138	367	55	35	738	103	92

Figure 2 - Biomass production from hedgerow trees. Coope San Juan (dry matter g/m<sup>2</sup>).

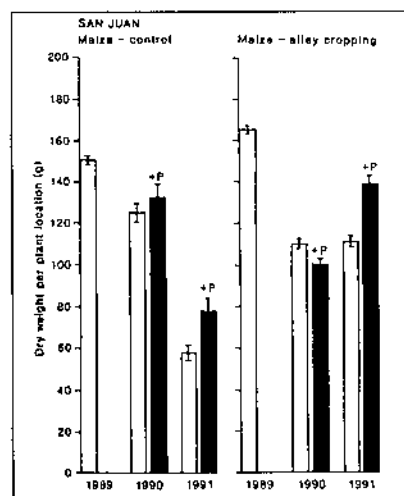


Figure 3 - Pattern of crop production - Maize.

to the maximum sustainable yield of hedgerow mulch that is compatible with the light requirements of the crops. For leaf and branch mulch production, four sets of ten adjacent trees were randomly selected from each plot for each tree species, the prunings were separated into leaf and branch material, weighed and subsampled in the field and the subsamples dried in the laboratory. Stemwood was sampled by first calculating its volume from stem circumference measurements taken at six heights, and then calibrating volume into mass by excavating a number of whole trees from the discard areas outside the plots. Root biomass production was measured on these excavated trees and correlated with above-ground stemwood biomass and volume. Fine root biomass production (defined as roots 2 mm diameter) is difficult to estimate by this method, but it is hoped to do so later by taking soil cores before and after pruning, because fine root die back may add below-ground biomass to the recycling organic decomposition system. A summary of the results of biomass production for the first three years of the trials is shown in Figure 2.

As the trial progresses into the third year, *Glyricidia* is gradually out-performing *Erythrina* in production of prunings biomass, particularly in the PO plots, but there is little difference

between the two for the P+ plots. Total stemwood production is understandably most rapid in the early years of growth, but surprisingly stemwood and roots produced by *Glyricidia* is less with added P than without P. There is a marked difference between the two species in the ratio of stem to root production, *Glyricidia* investing more energy in root production than does *Erythrina*.

### ■ Crop production

The pattern of crop production over the course of the experiment at Coope San Juan is shown in Figures 1 and 3. The **maize grain** yields are based on plants that survive to harvest, the isolation of the site resulting in a small number of plants being destroyed by invasions of large herbivores from the nearby forest. In year 1, the alley trees had not grown and the rock phosphate had not yet been added, and the maize was benefiting from the nutrients released in the burn. By year 2, the alley trees were so well established that they were shading the maize, especially where the trees had responded to phosphate additions with vigorous leaf production. In year 3, the optimum pruning regime was operating and the AC treatments gave the better maize yields, while in the open control plots soil nutrient deficiencies may have begun to set in and maize was clearly becoming a non-viable crop. The **bean crop** also suffered some misfortune. One might have expected AC to be showing some benefits by the third year, but an attack of slugs severely damaged the young plants. The yield of a second sowing was badly affected by very wet weather. Year 2 is therefore the only reliable indication of the possible effect of AC on beans, which is seen to give a significant improvement on the basis of yield per plant, but this is not carried through on a comparable area basis. Only the grain was removed from the site, the rest of the plant being returned to the plots after weighing and sampling and thus recycled. Figure 5 gives the results for total biomass production for the crops on an area basis. Only in the third year

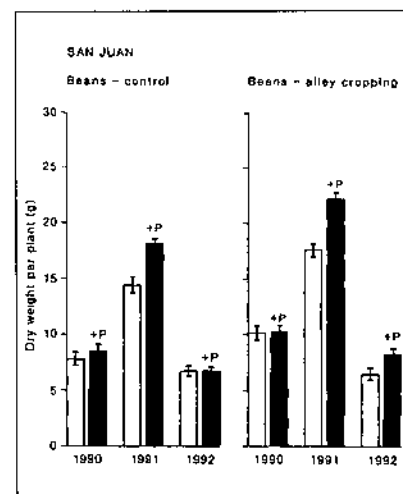


Figure 4 - Pattern of crop production - Beans.

does AC give an obvious advantage over the control, and the benefit of the added P appear.

### ■ Weeds

Weeds have an ecological importance as well as an economic one. In the open plots, weed biomass increased rapidly, even when controlled with herbicide, and the mulch resulting from weed destruction may be important for crop production. On the AC plots, weeds were mainly controlled by the mulch, and those that remained had a more superficial root system than the perennial grasses, so were easier to control by hand. Preliminary indications are that the biomass recycled annually by weeds may be comparable to that derived from the AC mulch and is probably important for nutrient cycling on the open plots. Investigations on this under-researched aspect of nutrient cycling in small farming systems continues under contract TS3-CT 91-0021.

### ■ Models of biomass production and nutrient cycling

The detailed analysis of biomass production can be incorporated into a comprehensive model for each year of the trial. This is given in Figure 4 for the third year, by which time both the AC and P treatments were showing considerable differences over the controls. The total primary productivity

Treatment, Sub-treatment, crop, year	Maize		Beans		Total crops		
	Exptd.	Recycled	Exptd.	Recycled	Exptd.	Recycled	Total
	grain	residues	grain	residues	grain	residues	production
AC OP							
Year 1	269	457	51	180	320	637	957
Year 2	178	302	88	105	266	407	673
Year 3	180	305	33	73	213	378	591
AC +P							
Year 1	269	457	52	192	321	649	970
Year 2	162	256	111	154	273	410	683
Year 3	224	355	42	153	266	508	774
Control OP							
Year 1	326	564	47	197	373	761	1134
Year 2	270	467	87	114	357	581	938
Year 3	125	217	41	95	166	312	478
Control +P							
Year 1	326	564	51	191	377	755	1132
Year 2	287	444	109	155	396	599	995
Year 3	168	260	41	166	209	426	635

Figure 5 - Crop production (grain plus residues) exported from and recycled within AV and control plots, CSJ years 1-3 (dry matter g/m<sup>2</sup>).

over all years and treatments is shown in Figure 6. The increase in total primary production in the AC plots resulted from the growth of the hedgerows themselves, and the effect of added phosphate was evident by the third year. The inherent infertility of these soils was then beginning to reduce the net primary productivity, but the presence of the hedgerows

seems to maintain the biological functioning of the system. How far this can be sustained will become evident from the results of the next two years of the experiment. When the laboratory analyses have been completed during the second phase of the project, diagrams comparable to Figure 4 for nutrients, including P, should be avail-

able, and will extend into years four and five.

### Conclusions and additional comments

The main conclusions are almost self-evident from the results above:

- AC increased total primary productivity considerably, but over this time scale had little effect on the overall per hectare grain yields of maize and beans, compared to open-field cropping.
- Additions of rock phosphate gave slightly higher crop and primary productivity yields.

Yields were dropping considerably in the open-field plots. The next two years of the trials will reveal whether AC confers any permanent benefit, and if so the nutrient analyses should show why this is so.

Throughout the three years of the project, information on the labour inputs needed to maintain these plots

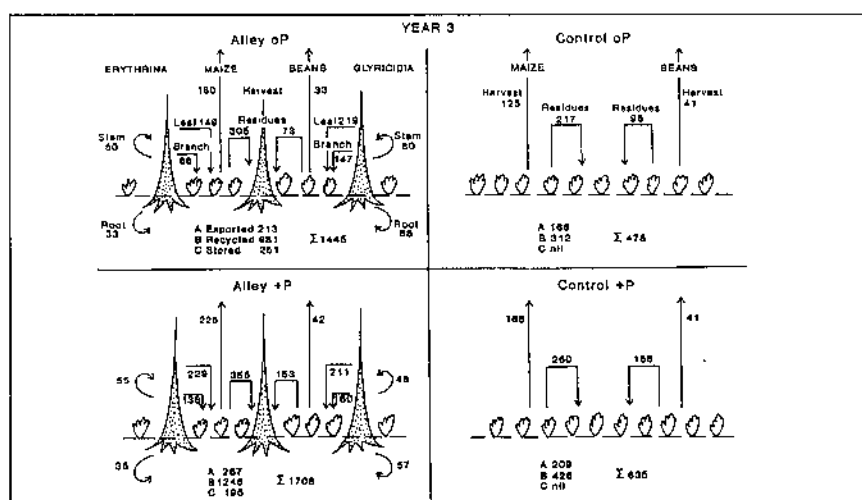


Figure 6 - Total primary productivity over all years and treatments.

has been recorded, in addition to the ecological data given above. These data will allow us to estimate whether alley cropping is in fact a viable alternative to shifting cultivation that can be managed by a peasant farmer, and as such will be a valuable addition to the results.

Our investigations are at the limits of ecological viability of cropping systems, but are on the kind of soil that covers large areas of the humid tropics threatened with irreversible degradation if a sustainable low-input agroecosystem is not found and shown to be manageable.

## References

---

- Anderson J.M. and Spencer T. 1991. Carbon, nutrient and water balances of tropical rain forest ecosystems subject to disturbance, management implications and research proposals. MAB Digest 7, UNESCO, Paris.
- Attah-Krah A.N. and Sumberg J.E. 1987. In Withington D., Glover N. and Brewbaker J.L. eds. *Glyricidia sepium* (Jacq) Walp, management and improvement, Nitrogen Fixing Tree Association, Waimanalo, Hawaii, 31-43.
- Bashir Jama, Amare Getahun and Ngugi D.N. 1991. Shading effects of alley cropped *Leucaena leucocephala* on weed biomass and maize yield at Mtwapa, Coast Province, Kenya. *Agroforestry Systems* 13, 1-11.
- Bayliss-Smith T.P. 1991. The integrated analysis of seasonal energy deficits : problems and prospects. *European Journal of Clinical Nutrition* 43, suppl. 3, 113-121.
- Budowski G. 1983. An attempt to quantify some current agroforestry practices in Costa Rica. In Huxley P.A., ed. *Plant Research and Agroforestry*, ICRAF, Nairobi, 43-60.
- Clay J. 1988. Indigenous peoples and tropical forest : models of land use and management from Latin America. Cultural survival inc., Cambridge, Mass.
- Hands M.R. 1986. The ecology of shifting cultivation. Unpublished M. Sc. dissertation, University of Cambridge.
- Harrison P.D. and Turner B.L., eds. 1978. *Pre-hispanic maya agriculture*. University of New Mexico press, Albuquerque.
- Huxley P.A. 1989. Hedgerow intercropping : some ecological and physiological issues. In Kang and Reynolds, op. cit., 208-219.
- Kang B.T., van der Krujs A.C.B.M. and Couper D.C. 1989. Alley cropping for food crop production in the humid and sub-humid tropics. In Kang and Reynolds, op. cit., 16-26.
- Kang B.T. and Reynolds L., eds. 1989. *Alley farming in humid and sub-humid tropics*. International Development Research Centre, Ottawa, 251pp.
- Kang B.T., Reynolds L. and Attah-Krah A.N. 1990. Alley farming. *Advances in agronomy* 43, 315-359.
- Kang B.T. and Wilson G.F. 1987. The development of alley cropping as a promising agroforestry technology. In Steppeler H.A. and Nair P.K.R., eds. *Agroforestry, a decade of development*, ICRAF, Nairobi, 227-243.
- Lawson T.L. and Kang B.T. 1990. Yield of maize and cowpea in an alley cropping system in relation to available light. *Agricultural and forest meteorology* 52, 347-357.

Contract number : TS2-A-030  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : **Genetic and molecular studies for drought tolerance :  
 identification of drought stress involved genes and proteins. \***

Titre : Recherche génétique et moléculaire en résistance à la sécheresse :  
 identification des gènes et des protéines  
 liés au stress dû à la sécheresse.

▼ PROJECT LEADER:  
 Chef de projet : Dr. Dorothea Bartels

▼ HOST INSTITUTION :  
 Institution-hôte : Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung.

▼ ADDRESS :  
 Adresse : Carl-von-Linné-Weg 10,  
 50529 Köln, Deutschland.

▼ TELEPHONE :  
 +49-221-506 24 30  
 +49-221-506 24 00

▼ FAX :  
 +49-221-506 24 13

▼ ASSOCIATED  
 INSTITUTIONS :  
 Institutions associées : - India : University of Hyderabad, (from 1989-1993).  
 - Italy : University of Parma, (from 1989-1991).

▼ KEY WORDS :  
 Mots clés : abscisic acid (ABA); drought stress; dessication; stress responsive  
 proteins; rice; barley; craterostigma plantagineum; gene isolation;  
 regulation of gene expression.  
 acide abscissique (ABA); stress dû à la sécheresse; dessèchement;  
 protéine réagissant au stress; riz; orge; craterostigma plantagineum;  
 isolation du gène; contrôle de l'expression génétique.

▼ FINAL REPORT :  
 Rapport final : 10p. English (+ appendices).

\* see also STD2 Publication, 1992; TS2-A-053 project, p. 22



# Genetic and molecular studies for drought tolerance : identification of drought stress involved genes and proteins

## Objectives of the research

---

- Measurement of drought stress responsive changes in protein profiles using important cereals (rice, barley) and naturally drought-resistant species.
- Isolation and analysis of cDNA clones involved in drought stress response by differential screening of cDNA libraries.
- Determination of the induction and repression kinetics using the drought stress related transcripts encoded by the isolated cDNA clones; determination of the primary structure of the cDNA clones.
- Raising of antisera to follow the expression of stress relevant proteins and to analyse the subcellular localization of the proteins.
- Gene cloning and isolation of genomic clones. This allows identification of regulatory sequences involved in drought stress and/or organ specific regulation.

## Materials and methods

---

### ■ Plant material

The plant material used in the three groups were the agriculturally important crop plants barley and rice as well as sunflower; besides these a representative of the extreme tolerant resurrection plants (*Craterostigma plantagineum*) was studied as a model for desiccation tolerance mechanisms among higher plants.

### ■ Molecular methods

Differential protein expression as a result of environmental stress was determined by one or two dimensional electrophoresis and for selected proteins by immunological means using specifically developed antisera (Western blot analysis). These cDNA clones were then used to measure the tissue specificity, the degree of induction or parameters leading to induction of stress related mRNAs. mRNA levels in these experiments were either assessed by RNA gel blot analysis using radioactive probes (Northern blots) or by *in situ* hybridization on sections of this tissue.

To study regulatory gene sequences involved in stress or ABA-mediated gene expression, genomic libraries were established and screened with the appropriate characterized cDNA clones. Comparing DNA sequences of full length cDNA clones with genomic clones allowed the identification of 5' regions upstream of the coding sequence which correspond to the promoter sequences. Promoter sequences of various lengths were isolated. To test the efficiency of these promoters the 5'-upstream sequences were coupled with reporter genes either glucuronidase (GUS) or in some cases luciferase (Lux). The activity of the promoters to drive the expression of the reporter gene was tested either in protoplast transient expression systems (tobacco, *Craterostigma plantagineum*) or in tobacco plants stably

transformed with *Agrobacterium tumefaciens*.

### ■ Biochemical methods

During the course of the work various proteins were purified using a combination of differential centrifugation and chromatography steps. Where appropriate, affinity chromatography was adopted (e.g. purification of aldose reductase from barley). Proteins for antibody preparations were purified as single bands from native acrylamide gels. Antibodies were raised by immunizing rabbits of which the serum yielded polyclonal antisera. Enzyme activities for a number of proteins were determined using standard reaction schemes by following the decrease or increase of a relevant component spectrophotometrically.

## Results

---

For the part of the project which was conducted in Köln, work was carried out in parallel on barley and the desiccation tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. During the course of the work specific probes for stress relevant genes and antisera for corresponding proteins were produced. These were then given to the other two collaborators to test and they could be used in rice and partly also in sunflower. First the work on barley and then on resurrection plants will be summarized.

## ■ Barley project

In the developmental programme of plants the maturation of seeds involves desiccation and the embryo adapts to a changing osmotic environment. At a precise developmental stage, cereal embryos (barley and maize) acquire desiccation tolerance. cDNA clones were isolated from barley embryos which are linked with desiccation tolerance. One such clone with a putative gene product of 34kD displays high structural homology to mammalian genes encoding an NADPH dependent aldose reductase involved in the synthesis of sorbitol. The gene product is expressed constitutively during embryo maturation and is modulated by the plant hormones abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA). The expression of the aldose reductase related gene correlates with enzymatic activity in barley embryos.

Aldose reductase (AR) catalyzes reduction of D-glucose to sorbitol with concomitant oxidation of NADPH. In order to analyze the biochemical properties of the barley protein two approaches were used:

- The protein was purified from immature barley embryos via an immunoaffinity chromatography;
- The full length cDNA clone was expressed in *E.coli*. The purified recombinant protein was able to reduce glyceraldehyde in a similar way as the *in vivo* protein. A site directed mutagenesis experiment was performed to determine the importance of highly conserved tetrapeptide which is thought to be important for the catalytic properties of the animal aldose reductase.

To characterize the regulation of the aldose reductase, promoter studies were carried out using promoter GUS gene fusion constructs. It was shown that the promoter directs seed specific expression of the GUS gene in transgenic tobacco. This promoter activity

increases during seed maturation. In transgenic plants the promoter confers a temporal and tissue specific activity profile which corresponds to the expression pattern observed for the structural gene.

## ■ The resurrection plant *Craterostigma plantagineum* as a model for a desiccation tolerant higher plant.

### ■ Gene expression

Leaves and ABA-treated callus from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* tolerate extreme desiccation. The desiccation process is characterized by the expression of a specific set of genes. A number of characteristic transcripts are induced very early during dehydration.

Experimental evidence indicates that the plant hormone ABA plays a major role in the signal transduction pathway. The temporal induction and spatial distribution of these transcripts have been determined. The majority of these transcripts encode proteins with significant homologies to Lea (= late embryogenesis abundant) proteins, which are abundantly expressed in developing embryos of higher plants and which are developmentally regulated by ABA. Transcripts from *Craterostigma* can be assigned to at least seven different classes of Lea genes. The high expression level of these different Lea type genes in dehydrated vegetative tissues of *Craterostigma* suggests that similar metabolic processes are occurring in the maturation phase of seeds. The function of these Lea type proteins is unknown. To address the question of function, one protein was selected and overexpressed in *E. coli*, and the recombinant protein was purified. Three of these different types of Lea proteins were constitutively expressed in tobacco; they did not affect the growth and development of the transgenic plants. It was shown that two

classes of proteins are posttranscriptionally modified by glycosylation or phosphorylation. It is unclear how this modification affects the functions.

The expression of these genes is regulated by ABA of desiccation. To analyse the mechanism of gene regulation, promoters of three different genes were isolated and tested for their abilities to drive reporter gene expression in a homologous transient expression system or after stable integration in transgenic tobacco, *Arabidopsis* and *Craterostigma* plants. In tobacco plants the promoters are mainly active in mature seeds (embryos). The activation by ABA or dehydration in vegetative tissues is only possible for one class of promoters. These experiments suggest that in tobacco and also in part in *Arabidopsis* the signal transduction chain is interrupted.

The transient expression assays revealed 5'-sequences which confer ABA responsiveness. For the CDeT27-45 gene it was shown that nuclear proteins from ABA treated callus bind specific sequence elements in the promoter region. By electrophoretic mobility shift assays ABA independent and ABE dependent binding activities could be distinguished. The ABA inducible binding activity is correlated with mRNA and protein accumulation and acquisition of desiccation tolerance. Experiments are under way to further characterize these novel ABA-inducible DNA binding protein(s).

### ■ Sucrose metabolism

Changes in sucrose levels in the plant cell are among the responses of plants to environmental stress. This was also observed for leaves of *Craterostigma plantagineum*. This plant contains high levels of soluble sugars. The prevalent sugar in fully hydrated leaves is a C8-sugar, an octulose, but upon dehydration the octulose disappears and sucrose levels increase; this process is reversed during rehydration.

Correlated with these sugar conversions are changes in the enzymatic levels for several sugar metabolizing enzymes. The activities of sucrose synthase and sucrose-6-phosphate synthase increase during dehydration but decline in the resurrection process. For the sucrose synthase these changes of enzymatic activities are correlated with altered gene activity. At least two different types of cDNA clones have been isolated for sucrose synthase. One class of sucrose synthase transcripts is inducible by water stress in leaves and roots. The objective of this part of the project is to understand the water stress dependent regulation of the sucrose metabolizing enzymes. The other part of the project is related to the elucidation of the biosynthetic pathways involved in the synthesis and degradation of octulose.

To understand the survival mechanism of the extreme desiccation tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, it is important to consider the events during the rehydration process and not only the dehydration phase. When the dried plants are brought in contact with water, water is quickly absorbed. This is primarily a physical process and physiological activity is resumed later. The disappearance of the desiccation-related transcripts and proteins (about 6 hours after rehydration) is characteristic of the rehydration process. During the same time normal physiological activities are resumed (6 to 12 hours after rehydration). The *in vivo* and *in vitro* synthesized proteins were analysed by two dimensional electrophoresis. As a result of these studies, gene products were discovered which are prominently expressed during the rehydration process. A differential cDNA cloning experiment was performed to isolate the transcripts associated with the rehydration process. One cDNA isolated from this differential screen was selected for further studies. This cDNA clone encodes a transketolase-like protein. The transketolase-like sequences comprise a small gene family in the *Craterostigma* genome: constitutively expressed and rehydra-

tion specific transketolase transcripts can be distinguished with sequence specific oligonucleotides. Experiments have been initiated to understand the physiological role of the putative transketolase expressed during rehydration.

## Conclusions and additional comments

During the course of this work gene products were identified which are associated with the drought stress phenomenon. Based on the results of the analysis of these transcripts it is predicted that at least some of these gene products play a role in drought stress tolerance. It is clear from these studies that drought tolerance is determined by multiple factors (an array of different proteins and sugars). An important conclusion based on these studies is that the genetic information for drought stress relevant genes is encoded in the genome of probably most higher plants. The work carried out during the course of this project was initially mainly based on the analysis of the resurrection plant and many specific probes were isolated. But it was shown that specific probes derived from these studies can be applied to rice and barley in order to monitor their performance in a drought stress situation.

## Publications

- Bartels D., Schneider K., Terstappen G., Piatkowski D. and Salamini F., 1990. Molecular cloning of ABA-modulated genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* which are induced during desiccation. *Planta* 181 : 27-34.
- Piatkowski D., Schneider K., Salamini F., Bartels D., 1990. Characterization of five ABA-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiol* 94 : 1682-1688.
- Bartels D., Engelhardt K., Roncarati R., Schneider K., Rotter M. and Salamini F., 1991. An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO j.* 10(5) : 1037-1043.
- Bartels D., Schneider K., Piatkowski D., Elster R., Iturriaga G., Terstappen G., Le Tran

Binh and Salamini F., 1991. Molecular analysis of desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. VI NATO Advanced Study Institute Plant Molecular Biology, eds. E.G. Herrmann, B. Larkins, 663-671.

Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F., Bartels D., 1991. Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal* 1(3) : 355-359.

Bartels D., Hanke C., Schneider K., Michel D. and Salamini F., 1992. A desiccation-related Elip like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J.* 11(8) : 2771-2778.

Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F. and Bartels D., 1992. Low molecular weight solutes in desiccated and ABA-treated calli and leaves of *Craterostigma plantagineum*. *Phytochemistry* 31(6) : 1917-1922.

Dale P.L., Baga M., Szalay A.A., Piatkowski D., Salamini F. and Bartels D., 1992. Expression of luciferase in transgenic tobacco mediated by a promoter element from desiccation tolerant *Craterostigma plantagineum*. In : *Progress in Plant Growth Regulation* (C.M. Karssen, L.C. van Loon and D. Vreugdenhull, eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 765-769.

Iturriaga G., Schneider K., Salamini F. and Bartels D., 1992. Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 20 : 555-558.

Schneider K., Wells B., Schmelzer E., Salamini F. and Bartels D., 1993. Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosol and chloroplast proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189 : 120-131.

Michel D., Salamini F., Bartels D., Dale P., Baga M. and Szalay A., 1993. Analysis of a desiccation and ABA-responsive promoter isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal* 4 : 29-40.

Bartels D. and Iturriaga G. Isolation and characterization of plant genes. Submitted to "Mechanisms of plant growth and improved productivity: modern approaches and perspectives" (ed. A. Basra), in press.

Bartels D., Alexander R., Schneider K., Elster R., Velasco R., Alanillo J., Bianchi G., Nelson D. and Salamini F., 1993. Desiccation-related gene products analyzed in a resurrection plant and in barley embryos. In : *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress* (Close R.J. & Bray E.A., eds). *Current Topics in Plant Physiology* : Am. Soc. of Plant Physiol. series vol. 10, pp 119-127.

Bartels D., Velasco R., Schneider K., Forlani F., Furini A. and Salamini F., 1993. Resurrection plants as model systems to study desiccation tolerance in higher plants. In : *Applications as prospects of biotechnology for arid and semi-arid lands* (Mabry T., Nguyen H. &

Dixon R., eds) IC2 Institute, The University of Texas, Austin, in press.

Alamillo J.M., Foncarati R., Heino P., Velasco R., Nelson D., Elster R., Bernacchia G., Furini A., Schwall G., Salamini F. and Bartels D., 1993. Molecule analysis of desiccation tolerance in barley embryos and in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Agronomie* 13.

Alexander R., Alamillo J.M., Salamini F. and Bartels D., 1993. A novel embryo specific barley cDNA clone encodes a protein with homologies to bacterial glucose and ribitol dehydrogenase. *Planta*, in press.

Nelson D., Salamini F. and Bartels D., 1993. Absciscic acid promotes novel DNA-binding activity to a desiccation related promoter of *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal*, in press.

Bartels D. and Nelson D. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell and Environment*, in press.

Michel D., Furini A., Salamini F. and Bartels D. Structure and regulation of an ABA and desiccation-responsive gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Mol.*, in press.

#### ■ Group of prof. Marmioli

Gulli M., Marmioli N., Raho G., Hartings H. and Quarrie S.A., 1991. Effects of abscisic acid (ABA) on gene expression and protein synthesis in barley plantlets. Abstracts Third International Congress Int. Soc. Molecular Biology, 1514.

Gulli M., Marmioli N., Stanca M., Lorenzoni C. and Quarrie S.A., 1991. Effects of abscisic

acid (ABA) on gene expression and protein synthesis in barley plantlets. *J. Exp. Botany* 42 : 14.

Gulli M., Hartings H., Raho G., Devos K., Quarrie S.A. and Marmioli N., 1992. Cloning and mapping of ABA induced genes. *Atti Associazione Genetica Italiana* Vol. 38 : 83-84.

Gulli M., Marmioli N., Hartings H., Raho G., Devos K. and Quarrie S.A., 1992. Cloning and mapping of ABA induced genes. *J. Exp. Bot.* 43 (suppl.) : 65.

Lupotto E., Raho G., Hartings H., Della Torre P.A., Perrotta C., Gulli M. and Marmioli N., 1993. Expression of genes related to environmental stress in maize. In : *Breeding and molecular biology : accomplishments and future promises* (A. Bianchi, E. Lupotto, M. Motto, eds.), Proc. XVI Conf. EUCARPIA Maize and Sorghum, Bergamo, pp 224-230.

Marmioli N., Gulli M., Di Cola G., Maestri E., Minciardini P., Raho G., Lupotto E. and Perrotta C., 1993. Genetic and molecular biotechnology applied to the comprehension and potentiation of crop plants grown in unfavorable environments. Abstracts of the IV Congress on University and Biotechnology Innovation, pp 43-44.

Gulli M., Hartings H., Raho G., Perrotta C., Devos K. and Marmioli N. Induction of Rab genes in barley seedlings exposed to exogenous abscisic acid (ABA). In preparation.

#### ■ Group of prof. Reddy

Reddy K.R.K., Rao A.H., Karuna Sree B. and Reddy A.R., 1993. Water stress-induced 23kDa polypeptide in cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.) is immunologically

similar to that of seedlings. *J. Plant Physiol.* 141 : 373-375.

Rao A.H., Karuna Sree B. and Reddy A.R., 1993. Water stress-responsive 23kDa polypeptide from rice seedlings is boiling stable and is related to the RAB16 family of proteins. *J. Plant Physiol.* 142 : 88-93.

Rao A.H. and Reddy A.R., 1990. Osmotic stress and induction of specific polypeptides in rice. *Int. Symp. on Rice Research : New Frontiers*, Nov. 15-18, pp 418.

Rao A.H. and Reddy A.R., 1991. Response of rice seedlings to cold and abscisic acid treatment - changes in polypeptide profiles. In : *Natl. Symp. : Genetics and Biotechnol. for Crop Improvement*, Feb. 8-10, India, pp 63.

Rao A.H., Karunasree B. and Reddy A.R., 1992. Polyethylene glycol induced changes in water stress associated gene expression in rice seedlings. *Int. Soc. of Plant Mol. Biol.*, Tucson Meetings, USA, Poster Abstr. n° 1548.

Rao A.H., Karuna Sree B. and Reddy A.R., 1992. Response patterns of rice cultivars to different abiotic stresses : differential induction of specific polypeptides. *Int. Crop Sci. Congress*, Iowa State Univ., Ames, USA Abstract n° 631, p. 38.

Reddy A.R., Sylaza G., Radha Rani U., Rao A.H., Karunasree B. and Seshagirirao K., 1993. Salinity stress responsive changes in polypeptide profiles and ribulose - 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase levels in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Am. Soc. Plant Physiol. Annual Meeting*, Univ. of California, Riverside, Jan. 28-30.

Numéro de contrat : TS2-A-101  
Contract number :

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITRE :   | <b><i>Mécanismes physiologiques de résistance à la sécheresse et création variétale. *</i></b>   |
| Title :   | <i>Physiological mechanisms of drought resistance in plant breeding.</i>   |
| ▼ CHEF DE PROJET :<br>Project leader :                  | Prof. Jorge Vieira da Silva  |
| ▼ INSTITUTION-HOTE :<br>Host institution :              | Université Paris 7,<br>Laboratoire d'Ecologie Générale et Appliquée.   |
| ▼ ADRESSE :<br>Address :                                | Place Jussieu 2, Case 7019 Tour 54-3,<br>75251 Paris Cedex 05, France.   |
| ▼ TELEPHONE :   | +33-1-44 27 60 65  |
| ▼ FAX :   | +33-1-40 51 71 08  |
| ▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :<br>Associated Institutions : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- France : Université Paris XII.</li> <li>- Portugal : EAN, Oeiras.</li> <li>- Brésil : Université Fédérale du Céara.</li> <li>- Tunisie : INRAT, Tunis.</li> <li>- Bénin : Université de Cotonou.</li> <li>- Niger : Université de Niamey.</li> <li>- Sénégal : CERAAS, Bambey.</li> </ul> |
| ▼ MOTS CLES :<br>Key words :                            | <p>sécheresse; amélioration des plantes; photosynthèse; stomate; résistance cellulaire; enzyme; membrane; protéine; lipide; plante tropicale cultivée.</p> <p><i>drought; plant improvement; photosynthesis; stomata; cellular resistance; enzymes; membranes; proteins; lipids; tropical crops.</i></p>                           |
| ▼ RAPPORT FINAL :<br>Final report :                     | 20p. Français (+ rapports des institutions associées).   |

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-240, p. 170

# Mécanismes physiologiques de résistance à la sécheresse et création variétale

## Objectif de la recherche

Le contrat TS2-A-101 avait comme objectif la physiologie de la résistance à la sécheresse et la création variétale.

Il devait conduire à la création d'un centre régional ouest africain, le CERAAS, qui serait le "pivot" de l'opération et où les équipes de recherche à constituer trouveraient à la fois l'équipement nécessaire et les liaisons avec les équipes européennes qui, plus axées sur la recherche fondamentale, éviteraient aux équipes du Sud ou mixtes de répéter des méthodologies dépassées.

A la différence des rapports partiels, celui-ci prend en considération l'évolution générale de la recherche pendant les quatre ans de fonctionnement du contrat.

## Matériel et méthodes

L'ensemble du matériel et des méthodes est décrit dans les rapports de chacun des participants. Nous nous contenterons d'en résumer les grandes lignes :

- sélection massale et récurrente,
- analyses climatologiques,
- méthodes d'analyse de l'eau du sol,
- méthodes d'analyse de l'eau des plantes,
- mesures phénologiques,
- mesures physiologiques : échanges gazeux photosynthétiques et transpiratoires, résistance stomatique,
- méthodes biochimiques : analyse de composés (lipides, protéines, sucres), dosage d'activités enzymatiques (ribulose biphosphate carboxylase ou rubisco, phospho-énolpyruvate carboxylase, galactolipases, protéases qui sont des enzymes de la photosynthèse, du

métabolisme des lipides et des protéines).

## Résultats

Nous privilégierons la présentation par espèces sur lesquelles les différents partenaires opèrent sur des aspects différents mais de façon concertée.

### ■ Les légumineuses du genre *Vigna* (les Niébés)

**Au laboratoire d'Ecologie Générale et Appliquée de l'Université Paris 7,** l'étude des mécanismes cellulaires et biochimiques de la résistance a été privilégiée, elle a été orientée dans deux directions principales : l'étude des lipides et l'étude des protéines.

L'étude de l'intégrité membranaire, en conditions de sécheresse, a pu être effectuée sur plusieurs espèces et variétés de *Vigna* et a permis de mettre en évidence une *relation nette entre la quantité de lipides polaires et la résistance*, les espèces les plus résistantes étant celles qui possèdent la teneur la plus faible en lipides foliaires.

Par ailleurs, les lipides polaires les plus sensibles aux actions de dégradation sont les galactolipides caractéristiques des membranes chloroplastiques.

Les phénomènes dégradatifs auxquels sont soumis les systèmes membranaires sont de nature soit peroxydative, soit hydrolytique.

Il a été démontré que *plus la plante est sensible à la sécheresse, plus ses lipides sont sensibles à la photoperoxydation*. Certains pigments foliaires, tels les caroténoïdes, peuvent avoir un rôle protecteur.

En ce qui concerne l'action hydrolytique, une *acyl hydrolase lipolytique dégradant les lipides membranaires a été mise en évidence, purifiée à homogénéité et caractérisée*, ce qui permet maintenant sa quantification et sa localisation intracellulaire par immunologie ainsi que les études d'expression génétique en conditions de déficit hydrique; des expériences de transformation des plantes par manipulation génétique pourront être envisagées à moyen terme. Ce programme est actuellement en cours de développement dans le cadre d'un contrat STD3.

En ce qui concerne les protéines et en particulier les *protéines thylacoïdales, elles se sont montrées très sensibles au déficit hydrique*. L'action d'enzymes dégradatives (protéinases) a été suivie en relation avec cette contrainte. Plusieurs protéinases ont été identifiées, l'une d'entre elles, une *aspartyl protéinase* pourra être utilisée pour la sélection de plantes résistantes.

En étroite coopération avec l'Université Paris 7, les travaux conduits par le **Département de Physiologie Végétale de la EAN** (Ociras, Portugal) montrent sur *Vigna* des différences inter- et intraspécifiques au niveau de la conservation de l'eau. Les travaux montrent un *effet important de l'acide abscissique (ABA) sur la perméabilité (résistance protoplasmique) et sur la composition lipidique des membranes* des plantes. Les variations du taux de l'ABA endogène en conditions de sécheresse et les variations des échanges gazeux ont été également mis en évidence. Le rôle de l'ABA est évident, cette hormone non seulement augmente la résistance protoplasmique mais diminue l'action dégradative due à la contrainte hydrique sur les

lipides polaires, en particulier sur le MGDG.

**Le Laboratoire de Physiologie Végétale du Département de Phyto-technie de l'Université Fédérale du Céara au Brésil** a conduit des recherches en condition de terrain et des observations importantes concernant les paramètres hydriques de plusieurs variétés ont pu être faites. Néanmoins, il s'agit de travaux qui n'ont pas renforcé la coopération avec les autres partenaires, car menés de façon isolée et avec un dialogue limité.

**La Faculté des Sciences Agronomiques du Bénin** a multiplié et testé la variété de *Vigna unguiculata* Espace-1. Les bons résultats obtenus sur le terrain concernant la production en conditions sèches sont en concordance avec les données de laboratoire obtenues à Paris 7. Des essais de traitement des parasites de cette plante par une suspension aqueuse de poudre de graines de *Pachyrhizus erosus* ont donné des résultats intéressants, avec moins de gousses attaquées et un meilleur rendement. Cette variété est actuellement vulgarisée avec un grand succès au Bénin.

**Le CERAAS** a montré sur cette plante une bonne aptitude à exploiter les réserves en eau du sol. Elle conserve l'état hydrique de ses tissus foliaires en conditions de sécheresse grâce à une importante capacité de régulation osmotique.

#### ■ Le *Cajanus cajan*, Pois d'Angol

Cette espèce a été étudiée au **Laboratoire d'Ecologie Générale et Appliquée de l'Université Paris 7**, où elle a montré une excellente résistance à la sécheresse, supérieure à celle du *Vigna* et en relation également avec la composition lipidique des membranes.

**Au Portugal, EAN, Laboratoire de Physiologie Végétale**, cette espèce a montré sur le terrain une très grande résistance à la sécheresse et, en 1992, la majorité des variétés a produit

presque autant en irrigation qu'à sec, avec des productions atteignant 4 tonnes par ha (la variété 5, en irrigation est l'exception puisqu'elle arrive à 9 tonnes de grains par ha). Les productions de 1991 en sols moins bons étaient nettement inférieures.

**Au CERAAS**, au Sénégal, des essais en sec ont montré la productivité de cette espèce (à peu près 3 tonnes de grains par ha) et une grande tolérance à la sécheresse.

**A la Faculté des Sciences Agronomiques du Bénin**, des essais statistiques ont permis de sélectionner quelques variétés vulgarisées sur le terrain avec un très grand succès. Le même succès se retrouve au Mali dans l'association Pois d'Angol-Sorgho pratiquée par M. Bréteaudau.

#### ■ *Pachyrhizus Spp* (Yam bean)

Cette légumineuse introduite au Bénin, grâce à la coopération avec **l'Institut Royal d'Agronomie et Vétérinaire de Copenhague**, a donné de très bons résultats. Actuellement, ces recherches font partie d'un nouveau contrat STD3. Le Professeur Adjahossou a étudié particulièrement les paramètres physiologiques en relation avec le déficit hydrique chez deux espèces *P. erosus* et *P. tuberosus*, soit au niveau de la plante entière soit sur des feuilles détachées et des disques foliaires. Dans le cas de la plante entière, les réserves d'eau et de glucides du tubercule jouent un grand rôle dans la résistance au déficit hydrique. Au niveau des rendements, la défloraison conduit à des productions de 80 tonnes de tubercules par ha. Des expériences annexes montrent que cette plante, à l'opposé des résultats décrits dans la littérature, ne paraît pas être très sensible au photopériodisme, ce qui permet sa culture au Bénin sur une grande partie de l'année. En outre, les qualités organoleptiques de ces tubercules les ont rendus très populaires à Cotonou. Le professeur Adjahossou a participé à une publication sur ces résultats.

**Au Portugal (EAN)**, l'espèce *P. ahipa*, non photopériodique, a produit dans les mêmes conditions 40 tonnes par ha de tubercules, avec un taux de matière sèche de 20 %, approximativement le double de celui des espèces étudiées au Bénin.

**Le CERAAS** a réalisé des travaux préliminaires de l'étude du système racinaire. *P. erosus* présente un contrôle stomatique efficace permettant une meilleure efficacité de l'utilisation de l'eau. *P. ahipa* a une meilleure régulation osmotique. Ces résultats sont les premiers obtenus dans ce domaine.

#### ■ Le Mil (*Pennisetum glaucum*) et le Sorgho (*Sorghum bicolor*)

Les travaux d'écophysiologie du mil, effectués par l'équipe de M. Marini de **l'Université de Niamey au Niger** en contre-saison sèche et en conditions d'alimentation hydrique contrôlée permettent de mettre en évidence la relative faiblesse du mil du point de vue de la résistance à la sécheresse. Cette plante a, en effet, une adaptation de survie qui ne conduit pas à une productivité élevée.

Les travaux effectués au **Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Paris XII**, montrent également la faible tolérance à la déshydratation du mil qui conduit à une sénescence foliaire accompagnée d'une régulation stomatique importante et de différences entre les variétés pour la masse racinaire. Les Mils présentent une tolérance à la déshydratation faible par rapport aux Sorghos et s'adaptent uniquement ou presque par simple sénescence foliaire. Le Sorgho, bien plus performant, n'est cependant pas capable de supporter les sols très pauvres où peut pousser le Mil.

Une étude enzymatique approfondie des deux plantes montre aussi que le Sorgho manifeste l'activité de la Phospho-énol-pyruvate carboxylase (PEPcase, enzyme de la photosynthèse chez les plantes en C4) la moins affectée par la sécheresse.

Les résultats obtenus au CERAAS sur ces plantes, Mil et Sorgho, ont permis de préciser leurs caractéristiques physiologiques : enracinement, fermeture stomatique, l'existence d'une période plus critique pour le Sorgho au stade post floraison, une augmentation significative de la résistance à la dessiccation avec l'âge. Cependant, le Sorgho présente une capacité d'ajustement osmotique supérieure à celle du Mil, lui permettant de survivre durant de longues périodes de stress.

#### ■ Blé (*Triticum vulgare* et *Triticum durum*)

L'étude de la résistance à la sécheresse du blé a été conduite par M. Ben Salem à l'INRAT de Tunis, en collaboration avec l'Université de Créteil-Paris XII et l'Université Paris VII. Les études de résistance à la sécheresse sur les céréales ont généralement privilégié l'adaptation large et de ce fait ont, pour des raisons évidentes totalement échoué. Ben Salem aborde ce problème d'une manière originale et obtient des résultats sortant des chemins habituellement parcourus après comparaison de nombreuses variétés. Du point de vue morphologique, le plus grand nombre d'épis au m et la paille haute sont des caractères qui améliorent la résistance à la sécheresse. Du point de vue physiologique, la précocité, la tolérance membranaire et les réserves du chaume en glucides sont particulièrement importantes.

Un technicien a reçu une formation au CERAAS.

#### ■ L'Arachide (*Arachis hypogea*)

Les recherches conduites à l'Université du CEARA au Brésil, ont montré la réduction importante de la nodulation sous l'effet de la sécheresse.

De nombreuses études de l'impact de la sécheresse sur l'Arachide ont également été menées au CERAAS dont les résultats principaux sont les suivants :

- la reproduction est la phase physiologique la plus sensible à la contrainte hydrique;
- l'étude des réponses physiologiques concernant l'état hydrique du sol et celui de la plante a permis de développer des modèles de simulation du développement de l'Arachide en conditions de contrainte hydrique qui sont appliqués avec succès au Sénégal et en projet dans d'autres pays;
- d'autres études menées sur le système racinaire ont montré l'importance des racines profondes dans la capacité de la plante à maintenir son état hydrique;
- au niveau des échanges gazeux, l'Arachide se caractérise par une bonne capacité à les maintenir dans le cas de déshydratation élevée;
- enfin, des études génétiques de l'interaction "génotype par environnement" permet de définir des idéotypes destinés à chacune des zones sèches du Sénégal.

#### ■ Autres plantes

##### ■ Cotonnier (*Gossypium hirsutum*)

Cotonnier (*Gossypium hirsutum*): des études menées par l'Université Fédérale du CEARA au Brésil sur une variété précoce obtenue par l'Embrapa ont donné des résultats concernant l'impact de la fumure azotée sur l'augmentation de la tolérance protoplasmique et donc des rendements. Au CERAAS, des études préliminaires sur une variété précoce donnent des résultats intéressants.

Enfin, le CERAAS a démarré des études préliminaires concernant des plantes annuelles ou des arbres (Maïs, Fonjo, Acacia en association avec une mycorhize, Haricot, Igname, Palmier à Huile) en relation avec leur développement au Sénégal puis dans d'autres pays de climat identique.

#### Conclusion

Si des relations Nord-Sud ont pu être facilement établies, ainsi que des

relations Nord-Nord, le manque de véritables relations Sud-Sud n'a pu être que partiellement comblé par la plaque tournante qu'est le CERAAS.

Cependant, il n'a pas encore été possible d'établir des programmes multinationaux, même en utilisant le CERAAS comme pivot. C'est un des problèmes qui doivent être résolus dans le futur.

Un autre sujet de préoccupation est la prolifération de la littérature grise, des rapports où s'enlissent les résultats qui devraient donner lieu à des publications.

Ces difficultés ne cachent pas cependant tout ce qui a été obtenu tant du point de vue théorique que pratique, et aussi le succès de la création du CERAAS, certes perfectible, mais qui, il y a 4 ans, relevait encore de l'aventure.

Le CERAAS : cette institution mérite une référence à part car elle a été le point de croisement de beaucoup de programmes. Grâce au support des laboratoires européens, il a créé des méthodologies bien adaptées comme, entre autres, celles mettant en jeu la mesure de la température de la surface foliaire et celles permettant l'étude fine du système racinaire. C'est le laboratoire de terrain idéal et s'il ne permet pas encore des études biochimiques plus fines, il fait face à tous les besoins concernant les relations hydriques. Ceci rend compte de la grande activité du CERAAS et de la façon dont il a pu avoir une influence sur les chercheurs en majorité de l'Afrique de l'Ouest.

#### Bilan des publications

Revue internationale à comité de lecture : 13  
 Revue internationale sans comité de lecture : 26  
 Participation à des congrès : 65  
 Articles en préparation ou soumis : 20  
 Diplômes DEA ou DESS : 21  
 Thèses : 21  
 Organisation d'atelier : 1  
 Ainsi que de nombreuses missions, accueil de stagiaires, séminaires et rapports.



Numéro de contrat : **TS2-A-104**  
Contract number :

- |  |  |
|--|--|
| ▼ TITRE :  | <b><i>Amélioration génétique<br/>de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide. *</i></b>  |
| Title :  | <i>Genetic improvement of groundnut adaptation to drought.</i>   |
| ▼ CHEF DE PROJET :<br>Project leader :                     | Danièle Clavel,<br>Daniel Annerose   |
| ▼ INSTITUTION-HOTE :<br>Host institution :                 | Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, ISRA.   |
| ▼ ADRESSE :<br>Address :                                   | ISRA, B.P. 3120, Dakar, Sénégal.<br>B.P. 53, Bambey, Sénégal.  |
| ▼ TELEPHONE :  | +221-73 61 97  |
| ▼ FAX :  | +221-73 61 97  |
| ▼ INSTITUTIONS<br>ASSOCIEES :<br>Associated Institutions : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Botswana : Department of Agricultural Research.</li> <li>- Brésil : Universidade Federal do Ceará.</li> <li>- Burkina Faso : Institut d'Etudes et de Recherches Agricoles.</li> <li>- France : Centre International de Recherches Agronomiques pour le Développement, CIRAD, Département des Cultures Annuelles.</li> <li>- France : Université Paris VII.</li> <li>- Portugal : Instituto Nacional de Investigação Agraria.</li> </ul> |
| ▼ MOTS CLES :<br>Key words :                               | <p>arachide; sécheresse; amélioration variétale; sélection récurrente; précocité; enracinement; régulation osmotique.</p> <p><i>groundnuts; drought; plant breeding; recurrent selection; earliness; root taking; osmotic regulation.</i></p>  |
| ▼ RAPPORT FINAL :<br>Final report :                        | 54p. Français - Portugais.   |

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-278, p. 196

# Amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide

## Objectifs du projet

En quinze ans (1970-1986), les conditions pluviométriques se sont gravement dégradées dans les pays du Sahel. Cette détérioration s'est traduite pour le Sénégal par une baisse de la pluviométrie annuelle de 200mm sur l'ensemble du territoire. Aujourd'hui, la sécheresse est devenue de très loin le premier facteur limitant de la production agricole de la zone semi-aride. En ce qui concerne l'arachide, on estime que les conditions pluviométriques actuelles occasionnent environ 50% de perte en espérance de rendement chez les variétés vulgarisées.

Les travaux réalisés durant le premier contrat CEE/ISRA TDS-A 278-SN (1985-1987) ont permis de préciser les différents types de sécheresse pour chaque région concernée et de démarrer des programmes de sélection basés sur une approche multidisciplinaire de la sélection pour la résistance à la sécheresse.

Dans cette deuxième phase, l'objectif général est toujours la création de variétés adaptées à la sécheresse que l'on a abordée sous deux angles:

- pour les régions dont le cycle de culture s'est raccourci, on a tenté de créer des variétés à cycle plus court que les variétés actuellement vulgarisées, mais capables de produire

autant (Nord-Sahel, Brésil). Cette méthode est également choisie pour trouver des variétés capables de compenser l'allongement du cycle de l'arachide dans les zones d'altitude comme le Botswana.

- Pour les régions affectées par des périodes de sécheresse en cours de cycle, on a opté pour une deuxième approche qui consiste à créer des variétés qui présentent des caractéristiques physiologiques leur permettant de supporter ces "trous" pluviométriques.

Ces objectifs ont été décomposés en quatre actions élémentaires de recherche :

- création de variétés à cycle très court,
- recherche sur la physiologie de l'adaptation à la sécheresse,
- création de variétés physiologiquement adaptées à la sécheresse,
- caractérisation et suivi de l'évolution de la variabilité génétique manipulée.

## Matériel et méthodes

On a tenté de progresser dans le travail d'amélioration variétale en sélectionnant pour le meilleur compromis entre la qualité agronomique des génotypes et leur valeur pour les différents mécanismes identifiés d'adaptation à la sécheresse.

## ■ Méthodes de sélection

L'obtention de variétés à cycle très court est recherchée d'une part par back-cross entre deux variétés vulgarisées dans le Nord du Sénégal, 73-30 et 55-437, et un parent donneur de précocité Chico (75j), et d'autre part par sélection généalogique à partir des premiers back-cross.

Pour sélectionner des variétés physiologiquement adaptées à la sécheresse, on a choisi la voie de la sélection récurrente à partir de populations. L'idéotype retenu après les études préliminaires, comporte un système racinaire profond et dense, une régulation stomatique lente et une bonne résistance protoplasmique. La population initiale est constituée par la combinaison de huit génotypes complémentaires pour l'objectif recherché. Cette population est sélectionnée à la fois sur des critères agronomiques (tests au champ) et sur ses caractéristiques physiologiques d'adaptation à la sécheresse (tests en serre et en laboratoire en conditions de stress). Des sous-populations sont constituées à l'issue de chaque cycle de sélection. Elles sont diffusées aux différents partenaires et utilisées pour la création de lignées adaptées aux conditions locales.

Une autre voie de création variétale, plus rapide que la sélection récurrente,

Pays	Botswana	Brésil	Burkina Faso	Sénégal
Génotypes	ICGS 11 ICGS 31	GC 8-35 ICGS 55 ICGS 31	ICGS 26 ICGS 31 AHK 85-19	GC 8-35
Caractéristiques variétales par rapport au témoin de la zone	production: + précocité: + taille de graines: ++	production: ++ précocité: = taille de graines: ++	production: = précocité: ++ taille de graines: +	production: +++ précocité: ++ taille de graines: ++

Figure 1 - Caractéristiques des génotypes identifiés dans chacun des sites.



Figure 2 - Etude du système racinaire en rhizotron - vue de haut.

a été développée pour atteindre le même objectif. Il s'agit du back-cross de la variété à petites graines, 55-437, sur la variété 57-422 qui rassemble de bonnes caractéristiques d'adaptation physiologique à la sécheresse mais qui est handicapée par des graines trop grosses.

La caractérisation et l'évolution de la variabilité génétique manipulée ont été étudiées par électrophorèse isoenzymatique sur gel de polyacrylamide.

### ■ Mesures physiologiques

Des études physiologiques ont été conduites pour mieux comprendre les mécanismes de réponse de l'arachide à la sécheresse et les intégrer à la sélection. Elles ont porté sur les variétés utilisées dans le programme de sélection : les huit variétés parentales de la population initiale 55 437, 57 422, 59 127, 73 33, TS-32-1, 79-40, 47-16, 68-111, plus Chico (géniteur de précocité) et Fleur 11 (nouveau témoin pour la région Centre du Sénégal). Différents critères ont été étudiés.

#### ■ Le système racinaire

Il a été étudié en rhizotrons. Ces derniers sont des tubes en PVC remplis d'un sol tamisé qui permettent une observation des racines *in situ*. L'alimentation hydrique y est contrôlée.

Différents paramètres sont mesurés ou notés parmi lesquels : LMR (longueur moyenne racinaire), LMRS (longueur moyenne des racines secondaires), densité racinaire (note visuelle de 0 à 5).

#### ■ La transpiration

Le suivi de la conductance stomatique foliaire a été réalisé soit par la méthode des pesées successives de feuilles détachées en cours de déshydratation soit au poromètre à diffusion de vapeur d'eau MK2 (Delta T Devices). L'eau transpirée est, dans le premier cas, fonction du contenu relatif en eau (CRE) des feuilles à chaque instant *t*. Le poromètre permet de mesurer la résistance à la diffusion de vapeur d'eau au niveau d'une feuille. Celle-ci donnera l'estimation du degré moyen d'ouverture des stomates.

#### ■ La photosynthèse

Les mesures ont été faites sur des disques foliaires prélevés de plantes en pots et cultivées en serre.

Les paramètres pris en compte sont la capacité photosynthétique maximale, l'efficacité quantique et l'activité de l'enzyme rubisco (Ribulose Biphosphate Carboxylase). Les deux premiers paramètres sont mesurés par une électrode d'oxygène (Hansatech Ltd) en conditions de lumière saturante ou

non et de CO<sub>2</sub> saturant. L'activité de la rubisco est mesurée selon la méthode de Brooks (1986) sur disques provenant de feuilles déshydratées naturellement.

#### ■ Le potentiel osmotique

Cette mesure est réalisée sur une foliole prélevée de la troisième feuille à partir du sommet que l'on congèle pour détruire les structures cellulaires. Après retour à température ambiante, le potentiel osmotique est déterminé par la méthode psychrométrique avec chambre C30 à l'aide d'un psychromètre à thermocouple PR-55 (Wescor). L'échantillon végétal génère dans la chambre hermétiquement close, après équilibre de température et de vapeur, une humidité relative équivalente à son potentiel osmotique.

#### ■ L'intégrité membranaire

Elle est mesurée sur des disques foliaires prélevés sur des feuilles fraîches coupées au niveau du pétiole auxquels on fait subir un traitement osmotique par incubation dans une solution de PEG 600 (24h). Après rinçage et trempage (10°C/18h), on mesure la fuite d'électrolytes dans la solution de trempage par conductimétrie. Le pourcentage de dégâts membranaires est alors fonction de la conductivité libre, mesurée dans les

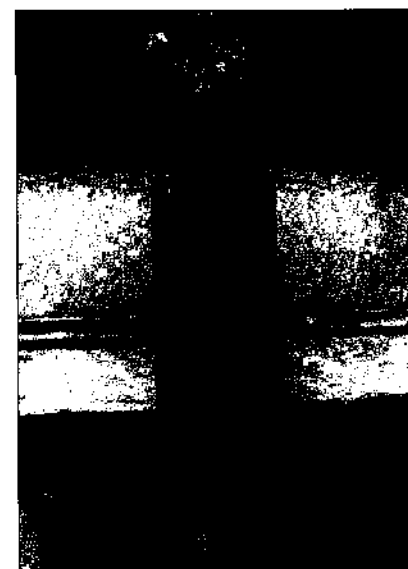


Figure 3 - Etude du système racinaire en rhizotron - vue de profil.

Génotypes	LMR <sup>(1)</sup> 14 <sup>e</sup> jour (cm)	LMR <sup>(1)</sup> 28 <sup>e</sup> jour (cm)	LMRS <sup>(1)</sup> (cm)	DS <sup>(1)</sup> (0-5)	Index <sup>(2)</sup>
57-422 <sup>(3)</sup>	35,0 a	78,5 ab	1,8 ab	1,8 b	7,6 ab
SR-7	33,6 a	82,1 ab	1,9 ab	2,1 ab	8,4 ab
SR-12	32,4 a	86,3 a	1,6 ab	1,6 ab	4,2 abc
SR-2	31,2 a	76,2 ab	1,8 ab	2,0 ab	6,6 ab
SR-5	31,8 ab	79,6 ab	1,9 ab	1,5 ab	6,0 abc
SR-10	31,7 ab	79,8 ab	1,4 ab	1,4 ab	-3,7 abc
SR-11	31,7 ab	74,4 ab	2,0 ab	2,0 ab	5,0 abc
SR-1	31,2 ab	80,1 ab	2,2 a	1,4 ab	-0,4 abc
SR-3	30,1 ab	75,5 ab	1,3 ab	0,9 b	-5,2 abc
SR-6	26,8 ab	68,5 abc	2,5 a	3,0 a	11,9 a
SR-9	24,3 ab	70,8 abc	2,1 ab	1,8 ab	-1,3 abc
SR-4	24,0 ab	66,4 bc	1,4 ab	1,4 ab	-9,2 abc
SR-8	20,1 bc	55,3 cd	0,7 b	0,5 b	-17,4 c
KH 149A <sup>(4)</sup>	14,1 c	42,3 d	1,8 ab	1,6 ab	-13,8 bc
Signification	0,0001	0,0001	0,01	0,01	0,01

(1) Voir définitions dans Matériel et méthodes

(2) Index de sélection intégrant les paramètres racinaires ainsi que ceux de la transpiration et de la résistance protoplasmique

(3) Témoin d'adaptation à la sécheresse

(4) Témoin de sensibilité à la sécheresse

Figure 4 - Variabilité génétique de différents paramètres racinaires pour 12 familles F2 de la sélection récurrente et 2 témoins.

lots témoins, et de la conductivité totale, mesurée sur les lots dont les tissus foliaires sont détruits par un trempage de 1h à 95°C.

## Résultats

### ■ Recherche de variétés à cycle très court

Un essai variétal multilocal a permis de tester durant 3 saisons consécutives dans les différents pays, les meilleures obtentions récentes de chacun des participants. Ce dispositif a permis d'identifier des génotypes plus précoces que le témoin local vulgarisé, assurant une production au moins équivalente et/ou montrant une meilleure combinaison de caractères favorables.

Par ailleurs, au Sénégal, les deux programmes de back-cross pour transférer les allèles de précocité du géniteur de précocité, Chico, aux variétés de 90 jours vulgarisées dans

le Nord du pays ont été poursuivis jusqu'au 4<sup>e</sup> back-cross pour 73-30 et jusqu'au 3<sup>e</sup> pour 55-437. Une sélection généalogique de matériels très précoces a débuté à partir des F2 des premiers back-cross. Des lignées stabilisées issues de cette sélection sont en cours de test actuellement.

### ■ Recherches sur la physiologie de l'adaptation à la sécheresse

Ces études ont été conduites au Sénégal et au Portugal. Les principales caractéristiques d'adaptation physiologique de l'arachide à la sécheresse ont été précisées afin de mettre au point les tests de sélection correspondants.

### ■ Dynamique et morphologie de l'enracinement

Une variabilité de ces caractères a été confirmée chez l'arachide. Elle s'exprime dès les premiers jours du développement racinaire. Elle est induite par le stress hydrique et se conserve si le stress hydrique disparaît.

La redistribution des racines observée en condition de sécheresse, s'accompagne de la formation de racines plus longues et plus fines en profondeur et de racines courtes de gros diamètre en surface. Cette redistribution des racines n'entraîne pas d'augmentation de la quantité d'assimilats à l'intérieur de cet organe. La réaction s'accompagne, en revanche, d'un coût énergétique important pour le développement des autres organes. Elle favorise par conséquent les variétés à gros système racinaire qui peuvent coloniser un volume de sol plus important. L'optimum de densité linéaire racinaire a été établi à 0,7cm/cm<sup>3</sup>.

Par ailleurs, la nécessité d'un développement racinaire profond a été confirmée par l'observation des relations entre l'état hydrique racinaire et celui des feuilles. En effet, les racines situées aux horizons supérieurs peuvent être déshydratées sans effet sur l'état hydrique des parties aériennes

alors que l'existence de racines profondes constitue le premier indicateur de l'état de sécheresse des feuilles.

Ces observations montrent qu'il est nécessaire de pratiquer la sélection en condition de stress et en condition d'alimentation hydrique optimale de manière à mieux prendre en compte les caractères induits par le stress hydrique.

#### ■ Régulation stomatique

Lorsque le déficit hydrique atteint un certain seuil au niveau de la plante, les stomates se ferment et une élévation de température s'opère dans les tissus foliaires du fait de la réduction de la transpiration consommatrice d'énergie. La bonne capacité de l'arachide à maintenir ces échanges gazeux à des niveaux de déshydratation élevés a été confirmée. Au niveau du cycle de la plante, c'est à la mi-floraison que l'avantage d'un contrôle stomatique efficace sera maximum.

Sur un plan variétal, GC 8-35 et 57-422 d'une part et 73-30 d'autre part montrent les différences de comportement les plus marquées. Le fait que 73-30 ferme ses stomates lorsque son niveau de CRE est plus élevé que celui des autres variétés (29,4%) avec une transpiration totale inférieure à celle des autres variétés peut être interprété comme une stratégie de réduction des pertes hydriques par diminution de la transpiration. En revanche, chez GC 8-35, la fermeture des stomates a lieu lorsque le déficit hydrique est élevé (CRE = 19%), ce qui permet probablement à cette variété de maintenir une capacité photosynthétique importante en dépit du stress hydrique.

#### ■ Capacité photosynthétique

L'identification de variétés capables de maintenir une activité photosynthétique à des potentiels hydriques très faibles doit tenir compte de la capacité de l'appareil foliaire à tolérer la sécheresse; ainsi cette mesure doit être indexée sur la précédente pour la sélection.

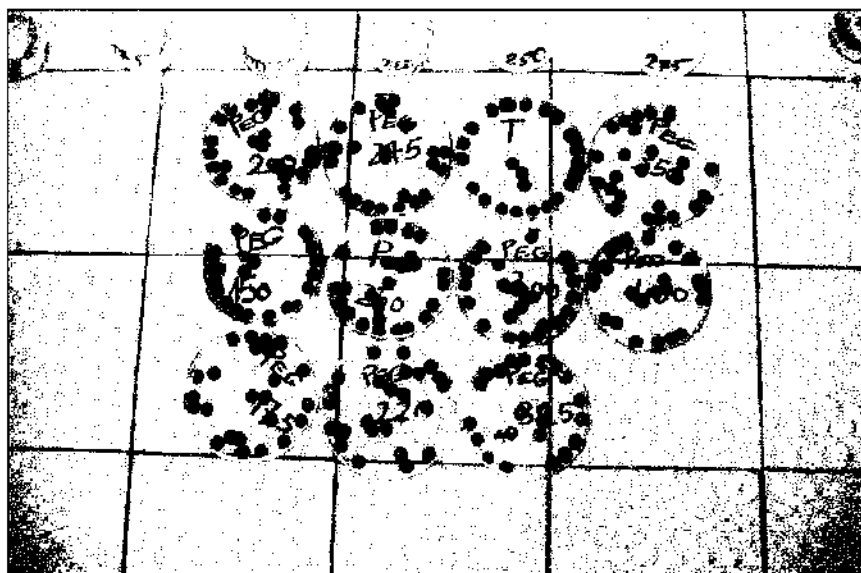


Figure 5 - Mesure de l'intégrité membranaire - Incubation de disques foliaires dans une solution de PEG.

L'effet d'un stress hydrique sur certains paramètres photosynthétiques a été étudié au Portugal. Les études conduites montrent que l'on peut classer les variétés en trois groupes de potentiel photosynthétique. Le meilleur potentiel photosynthétique est réalisé par les cultivars 73-33 et GC8-35 et le moins bon par les cultivars 55-437 et 73-30. Fleur 11 et 57-422 se situent en position intermédiaire. Ce résultat confirme les hypothèses émises plus haut sur la régulation stomatique de 73-30 et

GC8-35. Il apporte un élément d'explication au relativement faible potentiel de production observé sur 73-30 par rapport à Fleur 11 dans la région Centre et aussi à la bonne productivité de GC8-35, variété extra-précoce, dans les régions à saison des pluies courte.

L'effet de la déshydratation sur la photosynthèse est très net sur 73-33, 73-30 et GC8-35, peu sensible sur 57-422 et très peu sensible sur 55-437.

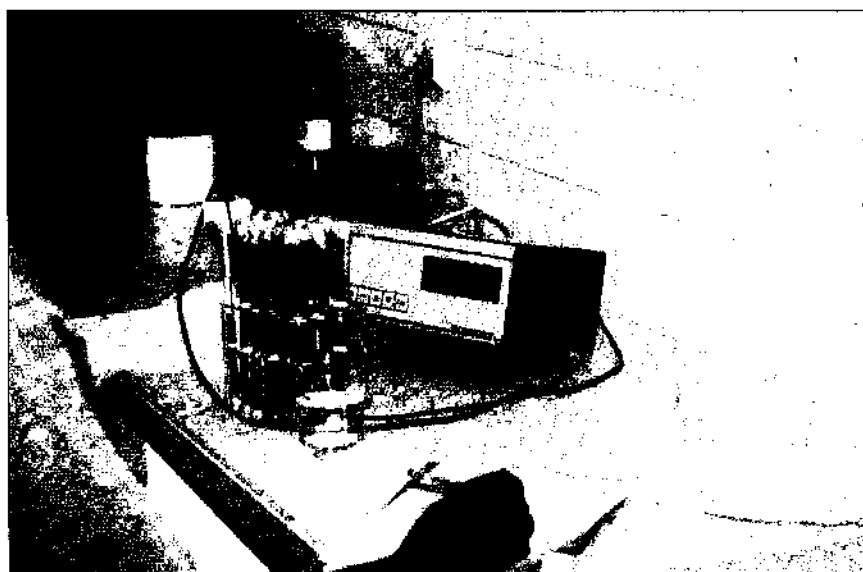


Figure 6 - Mesure de l'intégrité membranaire - Mesure de la fuite d'électrolytes par conductimétrie.



Figure 7 - Suivi de la conductance stomatique foliaire au champ par porométrie.

#### ■ Régulation osmotique

Les études conduites au Sénégal montrent que la réponse à la sécheresse n'est pas associée à une meilleure régulation osmotique dans les tissus foliaires sauf pour la variété 55-437. Cette caractéristique pourrait conférer à cette variété la capacité de différer la fermeture de ses stomates donc de maintenir sa photosynthèse en condition de stress. Cependant les valeurs de cet ajustement de pression sont trop faibles pour jouer un rôle important en cas de sécheresse persistante.

#### ■ La résistance des membranes protoplasmiques à la dessiccation et à la chaleur

Le maintien de l'intégrité membranaire constitue en fait, chez l'arachide, le mécanisme de tolérance le plus efficace. Les travaux ont montré une augmentation générale de ce niveau de résistance avec l'âge de la plante, ce qui représente un avantage adaptatif important de l'arachide qui termine en général son cycle en condition de sécheresse. Certaines différences variétales existent au niveau de cette résistance. Le test physiologique correspondant à la sélection de ce critère a été amélioré et l'on est en mesure à présent de mieux préciser les conditions du stress apporté et le stade optimal de la plante

pour une bonne expression des différences variétales.

La meilleure résistance a été observée pour les cultivars 57-422 et GC8-35 et la moins bonne pour 73-30.

#### ■ Création de variétés physiologiquement adaptées à la sécheresse

##### ■ Sélection récurrente

Cette sélection a été conduite au Sénégal. Deux cycles de sélection récurrente par test S1 ont été réalisés à partir de la population initiale sur la base de l'amélioration des caractères agronomiques et des critères physiologiques au niveau des racines, de la transpiration et de la résistance protoplasmique.

##### ■ Sélections à partir de la première population

Des extractions de lignées par sélection généalogiques ont été pratiquées dans les différentes localités à partir du premier cycle de la population. Elles ont été testées à partir de 1992 dans les différentes localités et se sont généralement montrées intéressantes.

Au Sénégal, de nombreuses lignées se sont montrées équivalentes au témoin 55-437 mais aucune ne le dépasse de

façon significative. Ce résultat est néanmoins encourageant pour la suite du programme de sélection récurrente. En effet, il s'agit d'une sélection de type additive basée sur l'accumulation, cycle après cycle, du progrès génétique.

Au Botswana, les trois sélections en F6, S34, S45 et S46, se sont révélées meilleures que le témoin Sellie.

Au Brésil, des lignées précoces et des lignées tardives ont été extraites de cette population : plusieurs lignées F6 précoces se sont montrées intéressantes par rapport au témoin PI 165317. La plupart des lignées tardives mises en essai se sont montrées supérieures au témoin local alors qu'elles ne se différencient pas significativement de l'introduction sénégalaise prise comme deuxième témoin, 73-33.

Au Burkina Faso, sur les 65 descendance F6 précoces (moins de 90 jours) issues de cette population, douze ont été retenues.

#### ■ Back-cross sur 57-422

Cette opération, qui consiste à réduire la taille des graines de la variété 57-422 par back-cross successifs à partir d'un croisement initial avec la variété à petites graines, 55-437, a été réalisée jusqu'au 3<sup>e</sup> back-cross. Cette sélection se poursuivra jusqu'au 6<sup>e</sup> back-cross.

#### ■ Caractérisation et suivi de la variabilité génétique

Dans un premier temps, on a analysé 101 variétés appartenant aux groupes botaniques Spanish, Valencia et Virginia et représentatives de la variabilité de la collection de Bambey. La méthode utilisée, sur cette première série de variétés, n'a pas permis de mettre en évidence un polymorphisme suffisant au niveau des systèmes enzymatiques pour poursuivre l'expérimentation au delà. En effet, seuls trois systèmes enzymatiques, sur les cinq polymorphes et lisibles initialement mis en évidence, sont utilisables. Ces trois systèmes polymorphes permettent de distinguer les deux sous-

espèces *Fastigiata* et *Hypogea* mais sont insuffisants pour étudier la variabilité génétique de l'arachide et a fortiori pour suivre l'évolution de la variabilité de la population en cours de sélection récurrente.

La technique du marquage enzymatique paraît insuffisante pour représenter la variabilité génétique de l'arachide cultivée. Ce résultat confirme les expérimentations antérieures avec ce type de marqueur.

## Publications

### ■ Articles

- Annerose D.J.M. 1988. Critères physiologiques pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide. *Oléagineux* 43 (5): 217-222.
- Annerose D.J.M. et Diagne M. 1990. Caractérisation de la sécheresse agronomique en zone semi-aride. I- Présentation d'un modèle simple d'évaluation appliqué au cas de l'arachide cultivée. *Oléagineux* 45 (12): 547-554.
- Annerose D.J.M. 1991. Caractérisation de la sécheresse agronomique en zone semi-aride. II- Evaluation des formes de sécheresse agronomiques de l'arachide au Sénégal par simulation du bilan hydrique de la culture. *Oléagineux* 46 (2): 61-65.
- Annerose D.J.M. et Khalfaoui J.L. 1991. Le C.E.R.A.A.S. un exemple de coopération régionale pour la lutte contre la sécheresse. Le courrier ACP, N°124: 60-61.
- Ferreira L.G.R., Dos Santos I.F., Tavora F.J.F. e Veira da Silva J. 1992. Deficit hídrico em cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Respostas fisiológica e produção*. *Oléagineux*, 47 (8-9): 523-530.
- Khalifaoui J.L. 1990. Genetics of adaptation to drought of cultivated species and consequences on plant breeding. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 137, Actual. Bot., 1: 125-137.

Khalifaoui J.L. 1990. Etude des composantes de la précocité chez l'arachide. *Oléagineux* 45 (2): 81-93.

Khalifaoui J.L. 1990. Hérité de la précocité extrême dans le cas d'un croisement entre deux variétés d'arachide Spanish. *Oléagineux* 45 (10): 419-431.

Khalifaoui J.L. 1991. Determination of potential lengths of the crop growing period in semi-arid regions of Senegal. *Agricultural and Forest Meteorology*, 55: 251-263.

Khalifaoui J.L. 1991. Approche de l'amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse. Cas de l'arachide au Sénégal. Amélioration des plantes pour les milieux arides. Ed. Aupelf-Uref. Eurotest Paris, 51-63.

### ■ Communications

- Diagne M. 1992. Caractérisation des types de sécheresse. Acte du Symposium Gestion Agro-climatique des Précipitations. Bamako (Mali). Déc. 1991. John Libbey Eurotext, Paris.
- Gautreau J., Zagre B. 1992. Bilan de trois années d'expérimentation variétale sur l'arachide dans la zone centre du Burkina Faso. Communication présentée au 3e atelier régional ICRI-SAT de l'arachide. Ouagadougou, Burkina Faso, septembre 1992.
- Khalifaoui J.L. 1990. Génétique et sélection de l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées. Premier atelier de physiologie, génétique et sélection pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées. Bam-bey, 5-9 novembre 1990. ISRA/CERAAS bam-bey, Sénégal. 25 p.
- Laureano J.A., Matos M.C. e Campos P.S. 1993. Efeito de stress hídrico em alguns parametros fotossintéticos de *Arachis hypogaea*. Livro de resúmenes. IIIe congresso Hispanico-portugues de fisiologia vegetal. Pamplona, 20 -24 de Setembro 1993.
- Laureano J.A., Matos M.C. e Campos P.S. 1993. Mecanismos fisiologicos de resistencia a seca. Estudo de variedades de amendoim. 1<sup>er</sup> Simposium hispano-portugues de relacoes hídricas nas plantas. Universidade das Ilhas Baleares. Coselho Superior de Investigações Científicas. pp 197-202. Palma de Maiorca, 21-13 de Abril 1993.

Laureano J.A., Lidon F.C. e Matos P.S. 1993. Alterações provocadas pelo stress hídrico na actividade do aparelho fotossintético de *Arachis hypogaea*. 9e Congresso Nacional de Bio-química Sociedade Portuguesa de Bioquímica. 5-8 de Dezembro de 1993. pp 73.

Mayeux A. et Khalifaoui J.L. 1989. Groundnut selection with respect to climatic constraints in Botswana. Symposium SADCC, ICRISAT. Malawi. 5p.

Zagre B., Traore S., Gautreau J. 1990. Activités et résultats de la recherche sur la sélection de l'arachide dans les zones centre et nord du Burkina Faso. Communication présentée au 2e atelier régional ICRI-SAT de l'arachide. Niamey, Niger.

### ■ Rapports de recherche

- Dione D. 1991. Etude de deux mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse chez deux variétés d'arachide (57-422 et Chico): croissance racinaire et absorption hydrique. D.E.A. "Biologie Végétale", Université C. A. Diop/ Dakar, Sénégal. 54p.
- Eksomtramage T. 1989. Contribution à l'étude du polymorphisme enzymatique chez l'arachide cultivée. D.E.A. "Amélioration des Plantes", ENSA/Rennes, France. 51p.
- Fall C.A. 1992. Développement d'un index de sélection de l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) physiologiquement adaptée à la sécheresse. D.E.A. "Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes", Institut National Agronomique /Paris-Grignon. 11+52p.
- Gning M. 1991. Contribution à l'élaboration d'un itinéraire technique: cas de l'implantation d'une nouvelle variété à cycle très court dans la région Nord du Sénégal. Diplôme d'Ingénieur des Travaux Agricoles, ENCR/Bambey. 38p + Annexes.
- Kane I. 1991. Etude expérimentale de quelques mécanismes d'adaptation à la sécheresse de l'arachide. D.E.A. "Biologie Végétale", Université C.A. Diop, Dakar, Sénégal. 59p.

Numéro de contrat : TS2-A-107  
Contract number :

▼ TITRE :	<b><i>Amélioration du rendement et de la valeur agronomique des légumineuses vivrières par optimisation de la nutrition azotée et des itinéraires techniques.</i></b>
Title :	<i>Yield improvement and potential use for sustainable agriculture of food legumes by optimization of nitrogen nutrition and cultural practices.</i>
▼ CHEF DE PROJET : Project leader :	Michel Obaton
▼ INSTITUTION-HOTE : Host institution :	Institut National de la Recherche Agronomique, INRA Laboratoires de Recherches sur les Symbiotes des Racines.
▼ ADRESSE : Address :	Place Viala 1, 34060 Montpellier Cedex 1, France.
▼ TELEPHONE :	+33-67-61 24 63
▼ FAX :	+33-67-54 57 08 - Tx : 4908 18 F
▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES : Associated Institutions :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Côte d'Ivoire : Ecole Nat. Sup. Agro., Dépt. d'Agronomie, Yamoussoukro.</li> <li>- Maroc : Université Mohammed V, Labo. de Microbiologie, Rabat.</li> <li>- Maroc : Université Cadi Ayyad, Labo. Physiologie Végétale, Marrakech.</li> <li>- Maroc : Ecole Nationale d'Agriculture, Dépt. d'Agron. et d'Amél. des Plantes, Meknès.</li> <li>- Pays-Bas : Agriculture University, Labo. Microbiology, Wageningen.</li> <li>- France : Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS, Montpellier.</li> </ul>
▼ MOTS CLES : Key words :	<p>légumineuse vivrière; soja; pois chiche; niébé; nutrition azotée; fixation biologique de l'azote; oxygène; écologie; rhizobium; sidérophore; osmorégulation; déficit hydrique; technique culturale; bilan en azote du sol.</p> <p><i>food legumes; soybean; chickpea; cowpea; nitrogen nutrition; biological nitrogen fixation; oxygen; ecology; rhizobia; siderophores; osmoregulation; water shortage; cultural practices; soil nitrogen balance.</i></p>
▼ RAPPORT FINAL : Final report :	162p. Français.



# Amélioration du rendement et de la valeur agronomique des légumineuses vivrières par optimisation de la nutrition azotée et des itinéraires techniques

## Introduction générale

Améliorer la nutrition azotée des Légumineuses nécessite de progresser dans la connaissance des mécanismes au point de vue microbiologique et physiologique et d'appliquer ces connaissances sur le plan agronomique. Le travail effectué pendant les quatre années de ce contrat associe donc recherche cognitive et appliquée, et est lié à un volet de formation des étudiants et agriculteurs français ou des pays en voie de développement.

Le présent compte-rendu fera la synthèse des travaux des huit équipes impliquées dans ce projet en les regroupant dans trois rubriques :

- Ecologie des *Rhizobium*;
- Fonctionnement des nodosités;
- Agro-physiologie.

## Ecologie des rhizobiums

### ■ Objectif

L'introduction des souches de rhizobium très efficaces dans le sol nécessite de bien connaître les lois qui régissent la vie de ces bactéries dans le sol (compétence saprophytique) et la compétition entre souches pour la nodulation (compétitivité).

### ■ Matériel et méthodes

L'équipe de Rabat a adopté une démarche commune : définition des sujets de recherche à partir des problèmes rencontrés au Maroc, isolement des souches à partir des sols de ce pays, étude microbiologique et

physiologique au laboratoire, puis expérimentation au champ (commencée ou en projet). Le travail a porté sur *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae (spécifique de la Fève, *Vicia faba*), sur *R. leguminosarum* bv. phaseoli (spécifique du Haricot, *Phaseolus vulgaris*) et *R. ciceri* (spécifique du Pois Chiche, *Cicer arietinum*).

Les microbiologistes de Montpellier ont travaillé à trois niveaux d'approche, champ d'abord, ensuite sur terre tamisée en condition contrôlée, puis niveau cellulaire.

Les techniques microbiologiques originales utilisées dans ce travail ont été l'immunofluorescence, les tests ELISA, le repérage des souches par leurs caractères de résistance spontanée à des antibiotiques, le dénombrement de rhizobiums sur plantes cultivées aseptiquement. Au point de vue chimique, le test CAS a permis de déceler les bactéries productrices de sidérophores. La charge électrique des souches de rhizobium a été mesurée par électrophorèse en veine liquide.

### ■ Résultats

Les trois partenaires de l'Université de Rabat ont poursuivi des études complètes.

Melle F. Brhada a mis en évidence la différence de capacité de survie et de recolonisation du sol des souches de rhizobium de la Fève suivant l'intensité de déficit hydrique du milieu. Il est nécessaire de classer les souches en sol non stérile en les soumettant à un déficit hydrique progressif. D'un point

de vue pratique, après un mois de stress hydrique total (ce qui n'a lieu que très rarement au Maroc), même les souches les plus sensibles arrivent à se maintenir à un niveau assez élevé pour former suffisamment de nodosités sur une nouvelle culture.

Ce travail s'est poursuivi, sous un angle physiologique, en recherchant des différences dans la capacité d'osmorégulation des souches tolérantes et sensibles au stress. Melle Brhada a étudié le rôle des bêtaïnes en relation avec le Pr. Le Rudulier à l'Université de Nice. La choline et la glycine bêtaïne sont absorbées (transportées) par ces bactéries subissant ou non un déficit hydrique (par addition de sel). Ces substances sont accumulées sous forme de glycine bêtaïne, c'est donc ce composé qui joue le rôle osmoprotecteur.

Le Pois Chiche cultivé en sols calcaires et alcalins du Maroc montre des signes de chlorose due à une carence en fer. E.B. Berraho, en collaboration avec H. Diem (ORSTOM - BSSFT, Nogent sur Marne) a étudié la capacité des souches de rhizobium du Pois Chiche à assimiler le fer grâce à la production des sidérophores (ligands spécifiques du fer) en comparant des souches isolées de sols calcaires de son pays à des souches de collections internationales.

Un criblage parmi 29 souches de rhizobiums en présence de substance chélatant le fer a permis de classer ces souches quant au degré d'inhibition de la croissance par la carence en fer. Il a montré que les souches les moins

sensibles à la carence en fer sont capables de sécréter des sidérophores de type phénolates (et non hydroxamates). Cette production est induite par la carence en fer. Les bactéries capables de produire des sidérophores sont aisément détectables par le test CAS dans le surnageant des cultures.

La suite appliquée de ce travail consistera à déterminer si les rhizobiums à l'état libre dans le sol sont capables d'absorber du fer et de le transférer à la légumineuse lorsqu'ils sont en symbiose, ce qui permettrait d'éliminer la sensibilité du Pois Chiche à la chlorose en sol alcalin.

Les sols acides au Maroc sont présents au nord de Rabat (pH 5,5 à 5,8). J. Aurag a étudié l'influence de l'acidité du sol sur la vie des rhizobiums en prenant comme modèle celui spécifique du Haricot. Il a isolé des souches à partir de ces sols acides, les a comparées à des souches connues et a mis au point un test en milieu liquide, corrélé au résultat de survie dans le sol. Deux souches, l'une sensible, l'autre tolérante à l'acidité ont servi dans les essais ultérieurs au laboratoire. (Fig. 1) Les analyses effectuées en relation avec J.C. Cleyet-Marel et X. Pinochet (INRA, Montpellier) ont porté sur l'action conjointe de l'acidité et de la sécheresse, sur sol stérile et non stérile. Là encore, des différences nettes entre les deux souches ont été notées. Ceci a permis de trouver une souche capable de coloniser un sol acide et de survivre en sol acide et sec. Cette propriété donne un avantage compétitif à cette souche pour la nodulation du Haricot semé sur sable. Il y aurait donc intérêt à utiliser une souche tolérante à l'acidité et à la sécheresse pour fabriquer des inoculums pour Haricot destinés à ce type de conditions pédoclimatiques.

Le travail s'oriente maintenant d'une part vers la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance à l'acidité et d'autre part vers l'utilisation de ces résultats sur culture de Haricot en sol acide et soumis à un déficit hydrique.

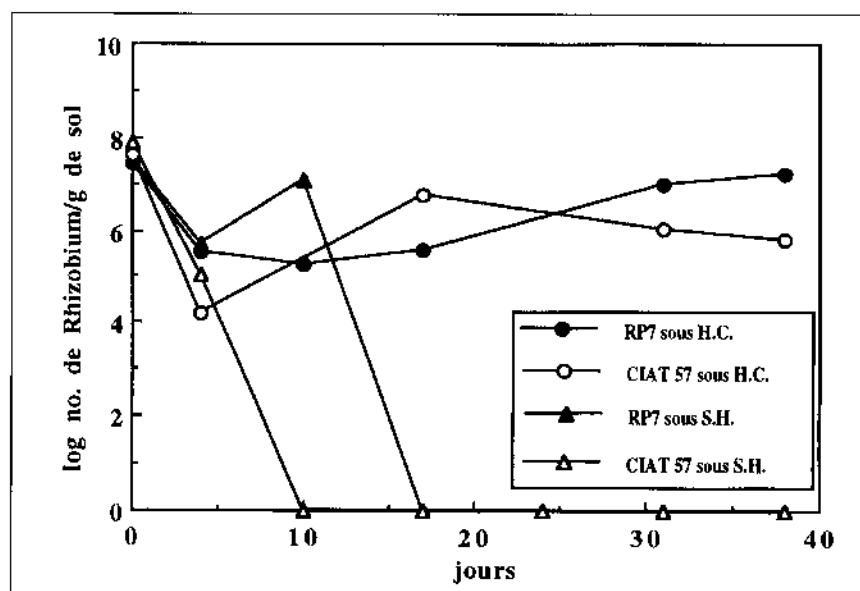


Figure 1 - Survie des souches RP7 et CIAT 57 dans un sol sableux acide stérile soumis au stress hydrique (S.H.) ou dont l'humidité est maintenue constante à 50% de la capacité de rétention du sol (H.C.).

Ces trois enseignants-chercheurs ont donc associé une recherche vers une application utile à leur pays et aux conditions circum-méditerranéennes et d'autre part une recherche cognitive nécessaire au progrès scientifique et à la formation de leurs étudiants.

L'étude de l'influence des facteurs du milieu sur la survie, la nodulation et la fixation a nécessité la mise au point d'un test utilisable au laboratoire et donnant des résultats intermédiaires entre ceux obtenus au laboratoire et au champ. T.A. Lie (U. de Wageningen) a adapté aux grosses graines sa technique de "Rhizotron" en boîte de Pétri contenant du sol. Ce test est rapide (16 à 21 jours) et permet de localiser avec précision l'inoculum ou le facteur toxique le long de la racine, ce qui permet (en réduisant la croissance de la racine) de distinguer si l'effet sur la nodulation est direct ou indirect.

L'étude a porté sur la tolérance à l'aluminium et a été effectuée avec des sojas provenant notamment de sols acides du Vietnam comparés à une variété connue pour sa tolérance. Le pourcentage de survie des plantes, la longueur de la racine et le nombre de nodules par plante sont corrélés et peuvent donc servir de critère de tolérance à l'aluminium. Cette tech-

nique a été également utilisée pour étudier la compétition entre souches de rhizobiums de Pois. Les résultats ont été analogues à ceux obtenus sur milieu de culture liquide.

Le "Rhizotron" constitue donc un outil simple et rapide pour cribler les légumineuses inoculées pour leur tolérance aux facteurs du milieu et pour étudier la compétence saprophytique et la compétition pour la nodulation entre souches de Rhizobium.

L'équipe de Montpellier (J.C. Cleyet-Marel et X. Pinochet) a essayé de préciser comment s'insèrent ou se succèdent deux populations de *Rhizobium* spécifique du Soja dans le sol, et d'évaluer les conséquences des relations sols-bactéries sur la nodulation et la compétition entre souches pour la formation des nodosités.

Au champ, a été comparé le pouvoir de compétition de souches de rhizobiums introduites par différentes techniques dans un sol déjà contaminé par une seule souche spécifique du Soja. Le taux d'occupation des nodosités par la souche apportée est supérieur avec les inoculums liquides ou avec enrobage des semences qu'avec des microgranulés.

Sur échantillon de terre a été étudiée l'influence de l'introduction successive de deux souches de rhizobium. Dans un premier essai avec les souches G3 et G2, c'est toujours la première souche introduite qui forme la majorité des nodosités, même si la deuxième est introduite en nombre mille fois supérieur au niveau mesuré pour la première. Par contre, avec deux autres souches, G49 et SMGS1 c'est l'inverse, la seconde souche introduite forme toujours la majorité des nodosités.

Ceci a amené les auteurs à émettre deux hypothèses :

- seule une fraction de la population de rhizobiums dans le sol est accessible par les techniques de dénombrement classiques, les autres sont adsorbées sur les colloïdes du sol;
- un lien étroit entre les cellules bactériennes et les particules de terre permet de maintenir ces cellules dans un meilleur état physiologique; celui-ci faciliterait le pouvoir infectieux des souches (capacité de nodulation) et leur aptitude à la multiplication.

Au niveau cellulaire, ont été recherchées les causes de ces différences entre souches dans la capacité d'adsorption des bactéries dans les agrégats de sol. Cette étude a nécessité la collaboration avec des spécialistes des surfaces minérales et des substances organiques. Les charges de surface des bactéries sont toujours négatives mais l'intensité de ces charges, donc la mobilité électrophorétique de ces bactéries, varie en fonction de la souche, de son état physiologique et du pH.

## ■ Conclusion des études écologiques

Ces études d'écophysiologie des rhizobiums ont permis de mettre au point des techniques d'étude nouvelles, rhizotron, test simple de la sensibilité à la sécheresse, à l'acidité du sol, à la capacité de synthèse de sidérophores, amélioration des techniques de dénombrement par immunofluorescence.

La connaissance des mécanismes impliqués dans la survie des rhizobiums dans le sol et leur pouvoir de compétition a progressé, -osmorégulation, adsorption sur les particules de sol-, et se poursuit au niveau fondamental. Néanmoins, il n'est pas encore possible d'imposer une souche de rhizobium très efficace à une légumineuse si le sol contient déjà une souche efficace de même spécificité.

La fabrication d'inoculums avec des souches physiologiquement infectantes, tolérantes aux facteurs de milieu, est envisagée et fera l'objet d'essais ultérieurs.

## Fonctionnement des nodosités

### ■ Objectif

L'intensité de la fixation de l'azote est liée à la quantité d'énergie disponible dans la nodosité. Or la nodosité de la symbiose *Rhizobium* - Légumineuses doit résoudre un paradoxe biochimique : protéger de l'oxygène l'enzyme nitrogénase des bactéroïdes car celui-ci l'inhibe irréversiblement, et en même temps assurer une fourniture suffisante d'O<sub>2</sub> aux chaînes respiratoires pour la régénération de l'ATP nécessaire à l'activité de la nitrogénase.

L'amélioration de la fixation de l'azote nécessite donc de comprendre les mécanismes impliqués dans la fourniture d'énergie et de pouvoir réducteur aux bactéroïdes fixateurs. D'où l'intérêt des travaux sur l'économie de substrat par la PEP-case et de pouvoir réducteur par le recyclage de H<sub>2</sub> sur la résistance du cortex nodulaire à la pénétration de l'O<sub>2</sub> dans les nodosités ("barrières à oxygène"). L'influence de facteurs du milieu sur les mécanismes ainsi précisés a ensuite été entreprise.

### ■ Matériel et méthodes

Ce travail a porté sur Soja (*Glycine max*) Niébé (*Vigna unguiculata*), Pois Chiche (*Cicer arietinum*) et sur

Luzerne (*Medicago sativa*) comme modèle de petite dimension. Il a nécessité l'utilisation d'équipements originaux: chambre pour incorporation de <sup>14</sup>C et <sup>15</sup>N (CNRS), équipement de débitmètres massiques permettant d'alimenter les racines nodulées des plantes entières par un flux de gaz de composition précise et variable (INRA), d'oxymétrie différentielle et de chromatographie en phase gazeuse (INRA) et bien entendu serre et chambre de culture.

### ■ Résultats

L'originalité de ce travail repose notamment sur le fait qu'il a été réalisé en majorité sur plante entière en place, ce qui évite au maximum les artefacts dus à la technique de mesure.

Le groupe Rhizosphère du CEFV-CNRS (F. Warembourg) a étudié et quantifié le rôle de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP-case) des nodosités. Le travail repose sur l'observation que la quantité de CO<sub>2</sub> respirée mesurée par unité d'azote réduit (2,5 gC/gN) est inférieure à la quantité théorique (3,1 gC/gN). Ce fait pourrait être dû à un recyclage du CO<sub>2</sub> respiré par la PEP-case des nodosités.

Les mesures effectuées sur plantes cultivées sur terre ou sable ont en effet montré que :

- le C fixé par les racines nodulées est en grande partie utilisé comme substrat respiratoire.
- le complément est stocké dans les tiges, racines et nodosités.

Il a été possible de distinguer le C fixé par les racines de celui fixé par les nodosités : le premier est exporté vers les parties aériennes, le second est incorporé dans les tissus des racines et des nodosités où il est en grande partie utilisé comme substrat énergétique.

Chaque voie a été quantifiée ce qui a permis d'établir un schéma du devenir et du rôle du C fixé dans l'économie du C des nodosités : 23 à 40% du CO<sub>2</sub> respiré par les nodosités sont recyclés. Le coût réel de la fixation, au moment

de la floraison, estimé par le dégagement total de  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$  dégagé à l'extérieur des nodosités +  $\text{CO}_2$  recyclé) est ainsi de 3,37 gC / gN fixé, ce qui est très proche de la valeur théorique. Ce coût augmente avec l'âge de la plante, sans doute à cause d'une augmentation de la production parasite d'hydrogène.

Le carbone ainsi recyclé permettrait d'améliorer l'efficacité du C photosynthétique et apparaît comme une stratégie d'adaptation des légumineuses à une nutrition de type ammoniacal. Une sélection des associations légumineuses-rhizobium sur l'activité PEP-case pourrait être envisagée.

L'équipe de l'INRA de Montpellier (J.J. Drevon en collaboration avec R. Serraj et A. Kimou) a montré que la consommation de  $\text{O}_2$  par les racines nodulées augmente si la teneur de l'atmosphère autour des nodosités est plus élevée que la teneur de l'air (21%). Ceci montre que le fonctionnement nodulaire est limité par l'oxygène. La pression partielle ( $p\text{O}_2$ ) optimale pour la fixation chez le Soja est voisine de 30% d' $\text{O}_2$ . La baisse de la fixation est proportionnelle à la baisse de  $p\text{O}_2$ ; ce fait permet de calculer la résistance de la nodosité à la pénétration de  $\text{O}_2$  sous diverses conditions de milieu (ou l'inverse : la conductance nodulaire) (Fig. 2).

Ainsi a été montré que le sel NaCl (Serraj), mais pas le nitrate (Kimou), induit une baisse de la fixation due à une augmentation de la résistance des nodosités à l'entrée de l' $\text{O}_2$  ("fermeture des barrières à l'oxygène"). Cette baisse de fixation due au NaCl est annulée si on élève la  $p\text{O}_2$  à 50%.

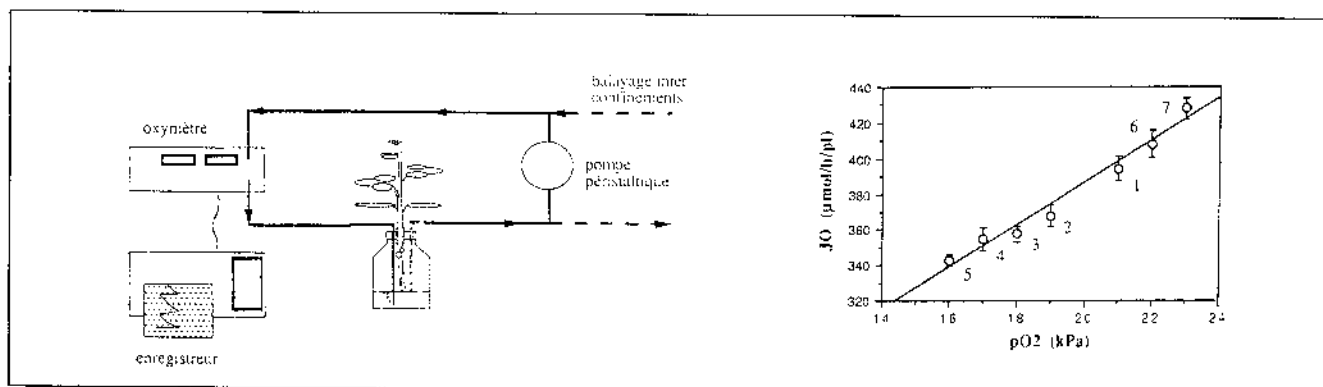
D'autre part, pour identifier le rôle de protection contre  $\text{O}_2$  au niveau des cellules infectées (i.e. une fois supprimée la résistance corticale de la nodosité) ont été élaborés des protocoles de préparation de protoplastes (cellules internes de nodosités contenant ou non des bactéroïdes et cellules peut-être osmocontractiles de la zone corticale).

Cette technique a permis de montrer que, en l'absence de perturbation environnementale, la teneur en malate des protoplastes infectés par les rhizobiums est supérieure à celle des protoplastes non infectés; c'est l'inverse en présence d'un stress salin. De plus, d'après les premières observations microscopiques assistées par ordinateur, les cellules du cortex changeraient de forme (aplatissement) sous l'effet du stress et limiteraient ainsi la diffusion d' $\text{O}_2$  dans les espaces intercellulaires du cortex interne nodulaire. Les premières mesures de fixation de l'azote (ARA) sur protoplastes de cellules infectées montre

qu'il n'y a pas de mécanisme efficace de protection contre l' $\text{O}_2$  externe, au niveau de ces cellules.

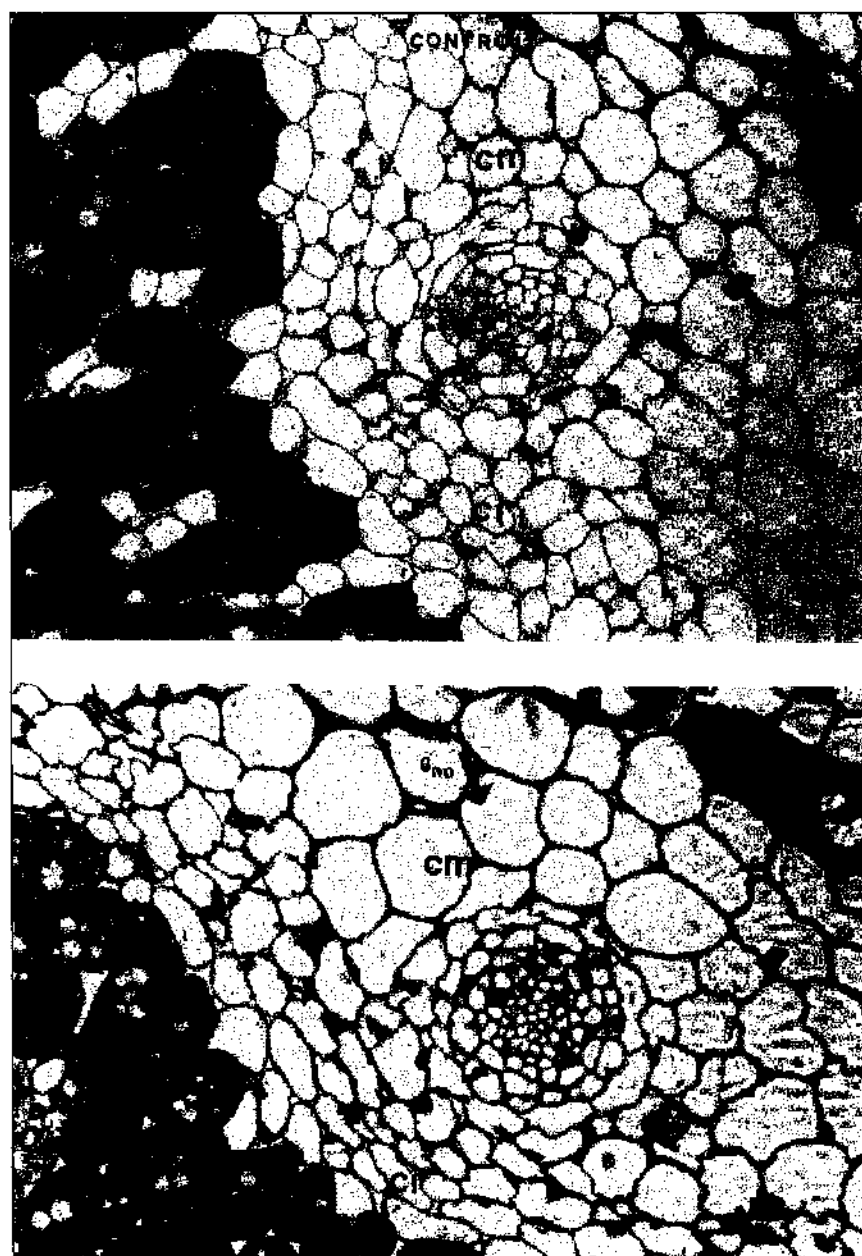
En ce qui concerne plus particulièrement l'équipe de l'université de Marrakech (R. Serraj puis Rachida Wakrim-Mezrioui; p 82-94), la première étape du travail a consisté à installer le laboratoire en partie avec le financement obtenu par ce contrat (chromatographe en phase gazeuse, chambre de culture) puis à effectuer une recherche bibliographique concernant les légumineuses à graines et les facteurs limitants du milieu. Le travail de recherche a été en partie réalisé au cours de stages : à l'université de Giessen (Pr. Mengel), à INRA de Montpellier et au CNRS à Poitiers (Picrrette Fleurat-Lessard).

Les plantes alimentées en nitrate sont moins sensibles au déficit hydrique (provoqué par apport de NaCl) que celles fixant l'azote. Lors du "stress" la fixation d'azote baisse, la résistance des nodosités à la pénétration de l' $\text{O}_2$  augmente, la production de l'alcool augmente, due à la mise en place d'un métabolisme fermentaire. Pour vérifier s'il y a modification des "barrières" à l'oxygène, l'observation anatomique des cellules du cortex est en cours. Des différences inter et intraspécifiques pour cette sensibilité au déficit hydrique ont été identifiées (Fig. 3).



La valeur de la  $g_{n0}$  est déduite de la pente de la consommation d' $\text{O}_2$  des racines nodulées ( $JO$ ) en fonction de la concentration externe d' $\text{O}_2$  pour des  $p\text{O}_2$  comprises entre 15 et 21%  $\text{O}_2$  (seule la respiration nodulaire est affectée) et dans un temps où la variation de  $p\text{O}_2$  n'induit pas de variation de la  $g_{n0}$ .  $JO$  est déduit de la baisse de concentration d' $\text{O}_2$  en fonction du temps, mesurée avec un oxymètre Abysses dans le dispositif en circuit momentanément confiné. La mesure de concentration d' $\text{O}_2$  est également possible avec un catharomètre (thèse de G. Roy, 1993).

Figure 2 - Mesure de la conductance des nodosités à la diffusion de  $\text{O}_2$  ( $g_{n0}$ ).



100 mM NaCl ou 60% O<sub>2</sub> sont appliqués 2h avant le prélèvement des nodosités sur lesquelles ces traitements provoquent une baisse de conductance à la diffusion d'O<sub>2</sub> (g<sub>no</sub>). Cortex interne (CI), cortex moyen (CM).

Figure 3 - Influence de la salinité ou l'excès d'O<sub>2</sub> sur la structure du cortex des nodosités de soja.

Le travail de l'équipe de l'ENSA-Yamoussoukro (M. Zengbe, A. Kimou) a été perturbé par le déménagement de l'école située initialement à Abidjan.

Au point de vue physiologique, la production d'H<sub>2</sub> a été étudiée sur Niébé. En effet l'enzyme nitrogénase des nodosités réduit simultanément N<sub>2</sub> et des protons en H<sub>2</sub> et cela apparemment en pure perte. Or, certaines

souches de rhizobium (et notamment celles spécifiques du Niébé) peuvent récupérer une partie de l'énergie dépensée pour la synthèse de H<sub>2</sub>, elles sont appelées HUP<sup>+</sup>. Mais l'utilité de cette capacité est controversée.

Ce travail réalisé à Montpellier avec les souches isogéniques HUP<sup>+</sup> et HUP<sup>-</sup> a confirmé l'hypothèse de J.J. Drevon. La souche qui recycle le H<sub>2</sub>

ne donne pas lieu à une fixation plus élevée car elle provoque une surconsommation de O<sub>2</sub>, élément qui est limitant dans la nodosité.

A. Kimou a aussi effectué des travaux d'agro-physiologie.

### ■ Conclusion des recherches sur le fonctionnement des nodosités

Pendant ce contrat, des équipes se sont établies (Yamoussoukro, Marrakech), des équipements ont été installés (mesure en flux, double marquage <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N), des techniques ont été mises au point (préparation de protoplastes).

Les résultats obtenus montrent que la nodosité possède un mécanisme très efficace de protection de la nitrogénase contre l'oxygène : celui-ci agit fortement dès qu'apparaît un déficit hydrique. Mais il existe une différence entre espèces et variétés, ce qui permet d'envisager une sélection pour cette tolérance. De même une sélection peut être envisagée par la capacité du couple Légumineuse-Rhizobium à recycler le CO<sub>2</sub> par le PEP-case.

L'aspect fondamental de ce travail nécessite également continuation pour confirmer les résultats et approfondir la connaissance sur les mécanismes cellulaires de résistance des nodosités à l'oxygène, notamment grâce à l'utilisation des protoplastes de cellules de la nodosité.

## Aspects agronomiques et physiologiques

### ■ Objectif

Le but du travail entrepris était de préciser les voies d'amélioration de la production et de la fixation d'azote chez les légumineuses à graines.

L'essentiel du travail a porté sur le Pois Chiche car la France importe 8000 t de graines chaque année et cette culture peut se développer à nouveau dans le Sud. Au Maroc, cette culture de printemps concurrencée par le Tournesol, est en régression (60.000 ha environ).

Ce pays doit importer du Pois Chiche; cette culture pourrait se développer aux dépens de la fève, en déclin à cause de l'orobanche. Or, grâce aux variétés de l'ICARDA, tolérantes au froid et à l'antracnose, le semis d'automne peut être intéressant dans le pourtour du bassin méditerranéen avec des gains de rendement importants.

En Côte d'Ivoire, le développement de la culture du Soja est envisagée depuis plusieurs années. De plus, une enquête effectuée pendant le contrat STD 1 avait montré que le développement de la culture de Niébé était souhaitable dans ce pays, car la graine est très appréciée par les migrants du Sahel. Pour ces deux cultures, l'objectif a été de rechercher les facteurs pédobiologiques pouvant limiter la fixation de l'azote et d'étudier l'intérêt de l'inoculation.

En France, la culture du Soja se développant à cette époque (135.000 ha en 1989), la recherche de l'abaissement du prix de revient avait placé la résistance à la sécheresse au premier rang des caractères à rechercher.

Le programme sur le Haricot n'a pas été réalisé du fait de la défection du principal pays intéressé, la Tanzanie.

## ■ Matériel et méthodes

Les plantes modèles choisies pour ce travail sont le Pois Chiche : *Cicer arietinum* (France, Maroc), le Niébé : *Vigna unguiculata* (Côte d'Ivoire), le Soja : *Glycine max* (France, Côte d'Ivoire).

Le programme de travail a été établi en fonction d'une enquête agronomique sur les facteurs limitants de la culture du Pois Chiche (Maroc), du Niébé (Côte d'Ivoire) et mettant en évidence l'intérêt éventuel du développement de ces cultures pour le pays.

Les travaux ont surtout porté sur la culture du Pois Chiche semé en automne ou en hiver; le haut potentiel de rendement de cette culture nouvelle

ne peut être réalisé qu'avec des itinéraires techniques beaucoup plus élaborés que pour les cultures de printemps traditionnelles. Les techniques étudiées sont : date et densité du semis, désherbage chimique ou manuel, irrigation et inoculation. Les essais ont été effectués en France et au Maroc, en station et chez les agriculteurs.

En Côte d'Ivoire, les essais ont été effectués en station et ont porté sur la fumure, l'inoculation du Soja et du Niébé.

Les études agrophysiologiques ont porté sur le suivi de la nutrition azotée au champ par des méthodes "in situ" qui ont été rodées au cours de ce contrat, en liaison avec l'utilisation du  $^{15}\text{N}$  et le suivi de l'état hydrique des plantes (en chambre de culture et au champ) notamment par utilisation de la chambre à pression de Scholander.

Les inoculums expérimentaux pour le Pois Chiche ont été préparés au laboratoire à Montpellier et pour le Soja et le Vigna en Côte d'Ivoire, à partir des souches sélectionnées par les laboratoires correspondants.

## ■ Résultats

Les itinéraires techniques adaptés au semis du Pois Chiche en automne ou en hiver ont été précisés (densité de semis 50 plants au  $\text{m}^2$ , pas de besoins d'irrigation sauf sur sol superficiels, désherbage chimique ou manuel). Cette culture, par rapport au semis de printemps, permet de doubler le rendement au Maroc (Ouknider), et de l'augmenter de 50% dans le sud de la France (Wery), rendant la culture aussi intéressante au niveau agronomique que le Pois ou le Blé dur.

Les essais effectués en Languedoc-Roussillon (Wery et Turc) mettent en évidence que le bilan en azote du sol est rarement positif avec cette culture, malgré l'apport de la fixation biologique de l'azote de l'air. Celui-ci n'est positif que si la culture est irriguée à 80% de l'E.T.M. Une irrigation plus



Figure 4 - Dispositif de culture hydroponique du soja au phytotron.

intense améliore la fixation de l'azote mais provoque une baisse de rendement par suite d'un développement végétatif excessif. L'absence d'irrigation en culture de printemps provoque un bilan en azote du sol négatif (-50kg N/ha environ). Le semis d'hiver en France permet d'augmenter la quantité d'azote fixé et donc d'améliorer le bilan en azote du sol.

Le Pois Chiche d'hiver valorise bien les sols à faible réserve utile en eau et le semis de printemps ceux à forte réserve utile. Dans tous les cas, la culture se comporte mieux que le Pois en sols caillouteux. L'inoculation a été expérimentée au Maroc; ce traitement n'a provoqué qu'une faible augmentation de rendement (+15%) inférieure à celle liée à l'apport de 30 kg. d'azote / ha au semis (+28%) ou à la floraison en année humide (+36%). Cette étude devra être complétée par un réseau d'essais chez les agriculteurs. Actuellement, l'inoculation est considérée comme nécessaire seulement dans les terres où le Pois Chiche est cultivé pour la première fois. En France, des souches efficaces et compétitives ont été sélectionnées, il y a en général des souches efficaces dans les sols et l'inoculation est inutile, sauf peut-être dans les sols acides (Pinochet et Cleyet Marcel).

En Côte d'Ivoire (Kimou), les rhizobiums spécifiques de Soja sont absents ou en nombre très faible. Pour le Niébé, les rhizobiums spécifiques existent mais la nodulation est limitée par les facteurs pédologiques. Dans les essais en station, l'inoculation a multiplié le rendement du Soja par 2 et plus, et celui du Niébé par 1,5. Pour ce dernier, le meilleur rendement est obtenu avec apport de phosphore, dolomie et azote (20kg / ha au début de la formation des gousses).

Les études agro-physiologiques ont mis en évidence le rôle essentiel de l'irrigation sur la capacité de fixation du Pois Chiche (Wery, Obaton) et cela a été confirmé sur Soja (Obaton). La capacité à l'ajustement osmotique a été précisée sur ces 2 plantes. Deux mécanismes différents d'adaptation du Soja à la sécheresse ont été mis en évidence (accumulation d'osmotites ou réduction de perte d'eau). L'utilisation de ces données ouvre des perspectives en sélection, mais celles-ci n'ont pas été exploitées pendant ce contrat.

La diffusion des informations nouvelles sur le Pois Chiche d'hiver, acquises par ces travaux, a été assurée en France et au Maroc par des brochures, des réunions d'information et la diffusion de semences a été assurée (cultivar Sombbrero inscrit en France, et cultivars ILC 195 et Flip 84-92 inscrits au Maroc, plus 3 cultivars en pré-inspection).

Une étude prospective effectuée pour le Maroc à partir des résultats expérimentaux de ce contrat (Wery) montre qu'un doublement de la superficie cultivée en légumineuses à graine ferait bénéficier l'agriculture de ce pays d'une quantité supplémentaire d'azote fixé de 12.000 t / an (environ 7 millions d'ECU). Et le passage en semis d'hiver sur les 60.000 ha de Pois Chiche de printemps procurerait au

pays 2800 t / an d'azote fixé (1,6 millions d'ECU), tout en doublant la production de graines.

## ■ Conclusion des études agronomiques

Les études agronomiques et agro-physiologiques réalisées par les différentes équipes de ce projet précisent les conditions favorables pour les différentes dates de semis et montrent que le choix du semis d'hiver ou d'automne chez le Pois Chiche, suivant les régions, permettrait une importante extension des surfaces et de la production des graines dans le bassin méditerranéen. Ceci aiderait ces pays à atteindre l'autosuffisance en légumes secs pour l'alimentation humaine et à développer l'utilisation du Pois Chiche en alimentation animale. De plus, cela permettrait un accroissement significatif de l'azote fixé biologiquement dans les systèmes de culture.

Les travaux préliminaires effectués en Côte d'Ivoire ouvrent des voies au développement de la culture du Soja et du Niébé dans ce pays, mais ces travaux demandent confirmation et généralisation.

## Conclusion

Le programme de travail proposé pour ce contrat a été effectué, à l'exception du projet concernant la complémentarité des deux voies de nutrition azotée du Haricot, du fait de la défection de l'université de Morogoro (Tanzanie). De plus une recherche, non prévue initialement, a été entreprise sur l'influence du fer sur les rhizobiums, du fait de l'importance potentielle des sidérophores dont l'intérêt est apparu récemment.

Les principales conclusions appliquées portent sur le développement de la culture du Pois Chiche. En France et au Maroc ont été rédigés des

fascicules techniques et ont été effectuées des réunions avec des agriculteurs pour développer cette culture notamment en semis d'hiver et d'automne, ce qui augmente fortement le rendement. L'intérêt économique de l'inoculation du Pois Chiche avec des rhizobiums reste à confirmer dans les sols nouveaux au Maroc et dans les sols acides en France. L'importance de l'inoculation du Soja en Côte d'Ivoire a été confirmée; et celle du Niébé, associé à une fumure appropriée, pourrait être bénéfique dans les sols où cette culture serait introduite.

De nombreuses techniques ont été mises au point pendant ce contrat.

Les recherches fondamentales ont été largement approfondies et les progrès des connaissances dans le domaine de l'écologie du *Rhizobium*, du fonctionnement des nodosités, de l'énergétique de la fixation et de l'écophysiologie des légumineuses ont été importantes.

Ce programme a joué un rôle essentiel pour les équipes du Sud. Ces chercheurs ont pu effectuer des stages en Hollande, en Allemagne et en France, ce qui leur a permis d'acquérir des formations complémentaires, d'effectuer des recherches conjointes, de la bibliographie et de rédiger des articles. Plusieurs ont participé (comme étudiant et enseignant) au cours international sur la fixation de l'azote (CIFA), organisé à Montpellier en 1990 et 1992, et tous ont pris part à la 5ème conférence de l'African Association for Biological Nitrogen Fixation (AABNF) à Rabat en 1992, ce qui leur a permis d'étoffer leurs relations avec d'autres chercheurs africains. Enfin ce contrat a joué un rôle important pour le financement du travail des chercheurs du Sud, mais se pose maintenant de façon aiguë le maintien de leurs conditions de travail.

Numéro de contrat :  
Contract number :

**TS2-A-116**

▼ TITRE : ***Amélioration et valorisation de l'igname.***

Title : *Yam improvement and development.*

▼ CHEF DE PROJET : Prof. Bakary Tio-Touré (Jeanne Zoundjiekpon)  
Leader project :

▼ INSTITUTION-HOTE : Université Nationale de Côte d'Ivoire,  
Host institution : Faculté des Sciences et Techniques.

▼ ADRESSE : 22 BP 582 Abidjan 22,  
Address : Côte d'Ivoire.

▼ TELEPHONE : +225-44 90 00 / poste 3061

▼ FAX : +225-44 35 31

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :

- Côte d'Ivoire : Institut des Savanes, (IDESSA).
- Côte d'Ivoire : Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement en Afrique, (IIRSDA).
- Burkina Faso : Institut d'Etude et de Recherche Agronomique, (INERA).
- France : Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement, (ORSTOM).
- France : Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, (IBMC).
- France : Institut National de Recherche Agronomique, (INRA).

▼ MOTS CLES : igrname; dioscorea spp.; vitrothèque; amélioration des plantes;  
Key words : génétique; dormance; phytopathologie; phytovirologie.  
*yams; dioscorea spp.; in vitro genetic collection; plant breeding; genet-ics; dormancy; phytopathology; plant virology.*

▼ RAPPORT FINAL : 172p. Français.  
Final report :



# Amélioration et valorisation de l'igname

## Objectif du contrat

L'objectif principal du contrat est la sauvegarde et l'exploitation des ressources génétiques pour l'amélioration de la productivité et pour la valorisation de l'igname. Les objectifs spécifiques sont : la constitution de vitrothèque, l'étude des maladies fongiques et virales, de la dormance des tubercules et des possibilités de sélection par voie sexuée.

## Matériel et méthodes

Plusieurs variétés appartenant aux espèces les plus consommées en Afrique ont été étudiées. Il s'agit de deux espèces *D. alata* et *D. cayenensis-rotundata*.

Pour la culture *in vitro*, les milieux de culture MS et Heller, additionnés ou non de phytohormones ont été utilisés. Les matériels végétaux sont lavés à l'éthanol puis à l'hypochlorite de calcium à 7 p.c. ou au chlorure mercurique à 1 pour 1 000. Les tubes sont placés à 28 °C avec une photopériode de 12 heures.

Pour la sanitation des ignames *in vitro*, la culture de méristèmes associés ou non à la thermothérapie (63 jours à 37 °C) et la chimiothérapie utilisant un agent antiviral, Ribavarin ou Virazole, nucléoside (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4,-triazole-3-carboxamide), a été menée.

Trois techniques de détection (immunologique, mécanique et en microscopie électronique) ont permis d'effectuer l'indexation de vitroplants. Pour l'étude de la distribution géographique de la virose au Burkina Faso, des prospections ont été faites dans trois régions de culture traditionnelle d'ignames. Des anticorps monoclonaux anti-YMV ont été produits. Ils ont permis, avec l'anticorps polyclonal

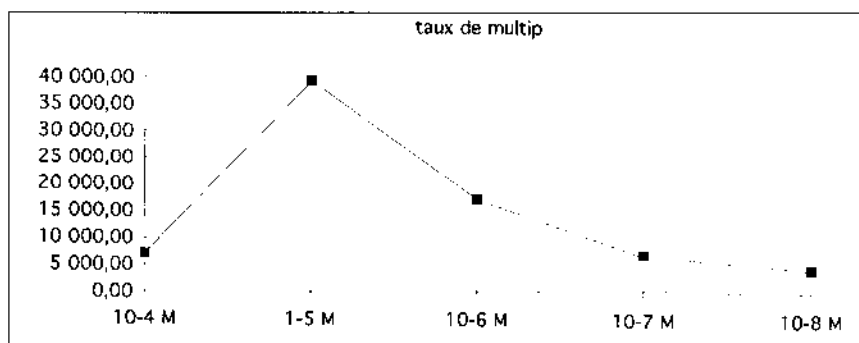


Figure 1 - Effets de différentes concentrations de cytokinines associées aux auxines à 10<sup>-6</sup> M sur l'amélioration du taux de multiplication chez le cv Florida.

(Test ELISA) de caractériser les isolats de virus de la mosaïque.

Pour la pathologie fongique, des enquêtes plurilocales ont été réalisées dans les zones de production de l'igname en Côte d'Ivoire. Des essais fongiques ont été mis en place en station. L'étiologie des attaques fongiques a été déterminée au champ et le rendement évalué.

L'étude de la toxine a été faite selon la technique de Goodman (1960) et Frantzen *et al.* (1982). La mise en évidence et le dosage des polysaccharides ont été réalisés par la méthode à l'antrone (Bourrelly, 1980).

L'étude de la levée de la dormance des tubercules a été faite en utilisant de l'Indol-3 acétique, de l'éthrel et du chlorure triméthylammonium. Pour l'extraction et la purification des batatasines, la méthode de Hasegawa et Hashimoto (1973) a été utilisée. Le comportement des tubercules dormants traités, ainsi que celui des tubercules-fils non traités issus des tubercules-mères ayant subi des traitements chimiques a été étudié.

L'étude de la variation du niveau de ploïdie a été faite par dénombrement chromosomique et cytométrie en flux. Les caractéristiques de la biologie de la reproduction, les hybrides naturels et ceux issus de parcelles d'hybridations

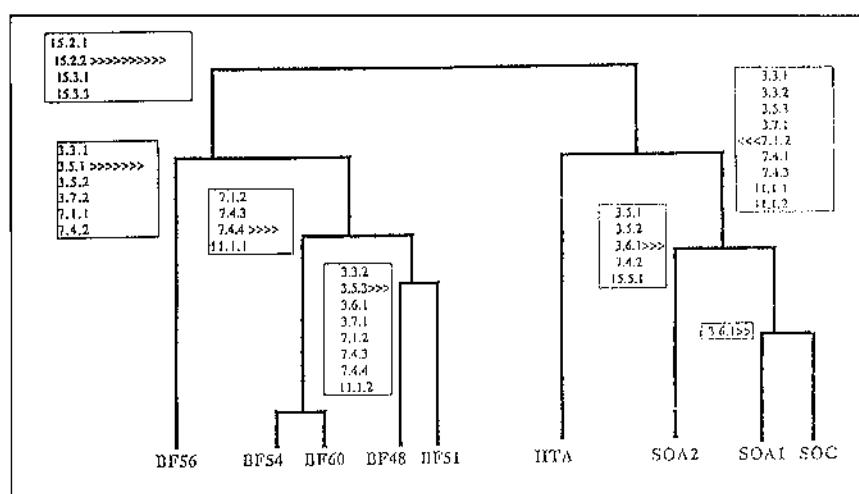


Figure 2 - 21 Anticorps monoclonaux permettent de classer les souches de YMV, collectées au Burkina Faso, en 2 groupes principaux et 4 sous-groupes.

ont été étudiés. A l'aide de la technique d'électrophorèse sur gel d'amidon, le déterminisme génétique de six systèmes enzymatiques a été proposé.

## Résultats

Deux vitrothèques ont été constituées et permettent de conserver actuellement *in vitro* 332 (trois cent trente deux) échantillons : neuf espèces sauvages et six espèces cultivées de diverses origines (Côte d'Ivoire, Bénin, Brésil, Burkina Faso, Cameroun, Guinée, Guadeloupe, Martinique, Nigéria, Nouvelle-Calédonie, Polynésie, Porto-Rico). Les espèces représentées sont : *Dioscorea abyssinica*, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. burkilliana*, complexe *D. cayenensis-rotundata*, *D. dumetorum*, *D. esculenta*, *D. hirtiflora*, *D. mangelotiana*, *D. minutiflora*, *D. pentaphylla*, *D. praehensilis*, *D. schimperiana*, *D. togoensis*, *D. trifida*, *D. transversa*, hybrides interspécifiques du complexe *D. cayenensis-rotundata* CV Krenglé X *D. praehensilis*.

Un gradient décroissant du sommet vers la base de la tige, pour la qualité de la stérilisation, et un gradient décroissant de la base des vitroplants vers le sommet, pour l'amélioration du taux de multiplication des variétés étudiées ont été mis en évidence chez *D. alata*. L'association des auxines ( $10^{-5}$  M) conduit à l'augmentation des taux de multiplication des ignames *in vitro* (Fig. 1).

L'indexation des vitroplants menée par immunologie, microscopie électronique et par inoculation mécanique a permis la détection des virus X et Y de la pomme de terre (PVX et PVY), et du virus de la mosaïque du concombre (CMV) sur des ignames *D. cayenensis-rotundata*. La thérapie et le traitement par la ribavirine a permis d'assainir certains clones.

Au Burkina Faso, une diversité de la distribution géographique du virus de la mosaïque de l'igname YMV est observée :

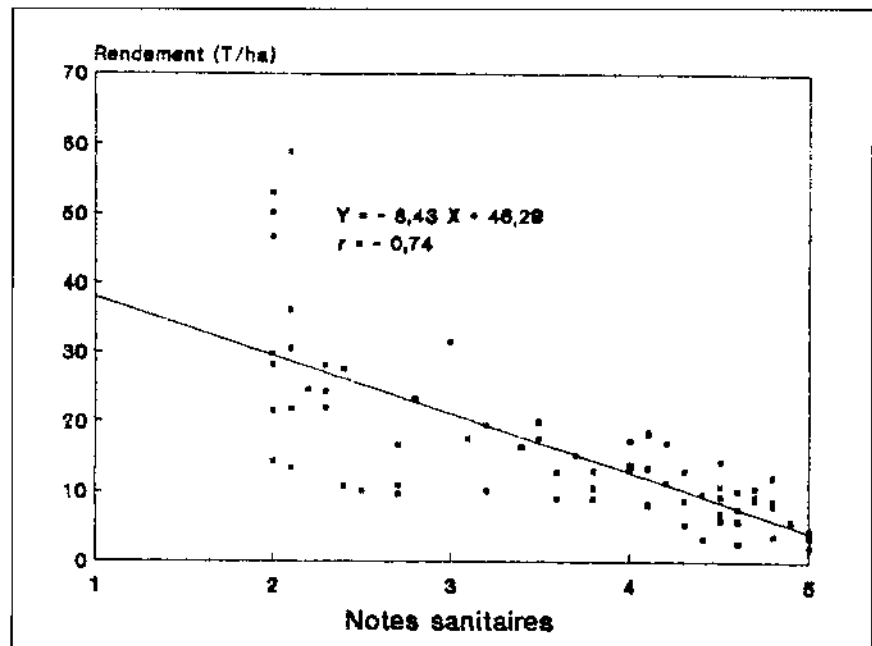


Figure 3 - Régression linéaire des rendements de 72 cultivars de *D. alata* en fonction des notes sanitaires relevées le 15 septembre (Collection IDESSA, campagne 1991).

- La région Sud est la région la moins infectée (0-15 p.c.);
- La région Sud-Ouest est relativement plus infectée (10-30 p.c.);
- La région Centre est la région la plus infectée avec un taux exceptionnel de 80 à 90, voire 100 p.c.

29 anticorps monoclonaux ont été produits et testés contre 15 isolats

provenant du Burkina Faso (8), du Cameroun (2), de la Guadeloupe (3), de la Guyane (1) et du Nigéria (1). 23 de ces monoclonaux se sont révélés capables de détecter la souche ivoirienne de référence YMV-12. Une grande diversité biologique des isolats du virus de la mosaïque de l'igname est mise en évidence. Ainsi, au Burkina Faso, 5 anticorps monoclonaux ne

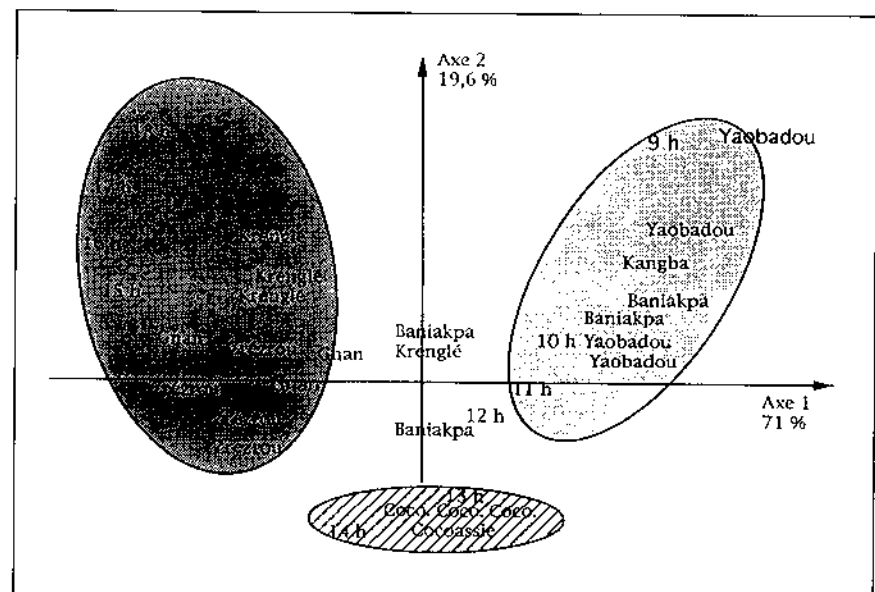


Figure 4 - Analyse factorielle des correspondances sur le nombre de fleurs ouvertes par heure et par variété.



Figure 5 - Tubercules d'ignames issus de graines.

défectent que les isolats de la région Centre; 8 anticorps monoclonaux ne détectent que les isolats de la région Sud-Ouest; 10 anticorps monoclonaux détectent certains isolats dans les deux régions. En outre, en combinant les anticorps monoclonaux, il est possible de reconnaître tous les isolats; ce résultat permet d'envisager la réalisation d'un kit de diagnostic de type ELISA mettant en jeu anticorps polyclonaux et monoclonaux (Fig. 2).

La comparaison du virus YMV avec d'autres potyvirus africains indique

que le YMV est distant des autres potyvirus étudiés. Le virus de la mosaïque de l'igname existe en Guyane et aux Caraïbes. Sa transmission par pucerons a été démontrée avec une efficacité variable. L'étude des protéines de capsides des divers isolats a permis de rapprocher la souche de Guyane d'une souche de Côte d'Ivoire et d'une autre de Guadeloupe.

Les travaux de phytopathologie ont permis de recenser 60 (soixante) espèces de champignons responsables des maladies fongiques affectant l'ap-

pareil végétatif aérien de l'igname. Parmi les cinq genres de champignons qualifiés de majeurs, sur la base de leur fréquence (*Colletotrichum*, *Cercosporia*, *Corticium*, *Rhizoctonia* et *Phyllosticta*) seuls les deux premiers cités ont réellement causé de graves dégâts de flétrissement sur *D. alata*. (Fig. 3) L'importance des attaques fongiques et dommages observés est très variable, d'une année à l'autre, aussi bien entre les deux espèces d'ignames cultivées (*D. alata* et *D. cayensis-rotundata*) qu'entre les variétés appartenant à la même espèce, et même entre les différents sites portant une même variété sensible comme Bètèbètè. Dans les conditions favorables au développement des épidémies, des corrélations négatives ont été observées entre le rendement et le flétrissement des plantes. Divers traitements avec le Benlate, le Dithane et le Rovral, appliqués seuls ou en combinaison, procurent un bon niveau de protection.

La substance toxique excrétée par *Colletotrichum gloeosporioides* est une glycoprotéine. Les isolats les plus virulents possèdent une forte concentration en protéines et en sucres. Bien que les ignames étudiées (*D. alata*) soient polyploïdes (Di, Tri et Tétraploïdes), il n'existe apparemment pas de relation entre le niveau de ploïdie et la résistance à l'anthracnose.



Figure 6 - Tubercules d'ignames issus de graines.

Les délais de levée des tubercules-mères, la masse de tubercules-fils et le rendement dépendent de la concentration et de la nature des substances chimiques utilisées pour le traitement des tubercules-mères. Quant à la tubérisation, quelle que soit la dose, toutes les substances chimiques baissent le délai du début de la tubérisation. L'étude de la dormance a permis de mettre en évidence l'existence des batatasines I et IV dans les tubercules de Gnan (*D. cayensis-rotundata*).

Au sein du complexe *D. cayensis-rotundata*, on observe des tétraploïdes, des hexaploïdes et des octoploïdes. L'étude du délai de levée et du délai de floraison montre l'existence de

précocité de la levée de la tête par rapport aux autres types de semenceaux et d'une «programmation» interne de la mise à fleurs des plantes d'ignames. Chez les variétés florifères, l'anthèse peut être discrète (Kroukroukpa et Frou) ou nulle (Afoubessou). L'heure d'ouverture des fleurs est une caractéristique variétale chez les pieds mâles. Malgré le décalage d'initiation de floraison entre l'ensemble des variétés mâles et l'ensemble des femelles, on observe une grande diversité dans la période d'ouverture des fleurs (Fig. 4).

L'étude des hybrides naturels indique qu'on peut obtenir des tubercules d'aspect et de poids comparables à ceux des variétés cultivées, deux à trois années de multiplication végétative après le semis de graines. (Fig. 5 et Fig. 6) Ainsi, l'amélioration des ignames par voie sexuée est possible, à condition de connaître la biodiversité de ces plantes. L'étude des descendances contrôlées a permis d'initier la génétique des ignames. Les six systèmes enzymatiques étudiés ici: l'Estérase (Est.), l'Isocitrate Déshydrogénase (IDH), la Malate Déshydrogénase (MDH), la Phosphoglucose Déshydrogénase (PGD), la Phosphoglucose Isomérase (PGI) et la Shikimate Déshydrogénase (SDH) correspondent à huit locus et quatorze allèles.

## Conclusion et perspectives

Ce contrat nous a permis d'obtenir des résultats importants pour la vitroculture, la phytovirologie, la phytopathologie, la dormance et l'amélioration par voie sexuée des ignames, plantes à multiplication végétative. Il nous a aussi permis de développer des actions de coopération scientifique entre différents instituts de recherche et de former des chercheurs tant en Afrique qu'en France. A partir de ces acquis, plusieurs nouveaux projets de recherche peuvent être initiés en biologie moléculaire, en phytovirologie, en phytopathologie et en amélioration

des plantes. Le projet le plus important est celui de la collecte et de la caractérisation des ignames en Afrique de l'Ouest et qui inclut, non seulement tous les intervenants de l'actuel contrat, mais aussi de nouvelles équipes en Angleterre, en Belgique et aux Etats-Unis d'Amérique.

## Publications

### ■ Liste des publications dans des revues à comité de lecture

- Doukoure S. et Tio-Toure B. A paraître dans les *Annales de l'Université d'Abidjan* (Accepté en 1993).
- Hamon P., Brizard J.-P., Zoundjihekpon J., Duperrey C. et Borgel A., 1992. *Can. J. of Bot.*, 70-5, 996-1000.
- Malaurie B., Pungu O. and Thouvenel J.-C. (Soumis).
- Malaurie B., Pungu O. and Trouslot M.F. (Soumis).
- Malaurie B., Pungu O., Dumont R. and Trouslot M.F. *Euphytica*, 65, 113-122.
- Zoundjihekpon J., Essad S. et Toure B., 1990. *Cytologia*, 55, 115-120.
- Zoundjihekpon J., and Tio-Toure B., 1992. *FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter*, 90, 39-41.
- Zoundjihekpon J., Bourmier J.P. et Tio-Toure B. (Soumis à *Insect Science and its application*).
- Zoundjihekpon J., Hamon S., Tio-Toure B. et Hamon P. (Accepté par *Theor. Appl. of Genet.*)

### ■ Liste des communications orales

- Biegot L., 1990. Compte rendu du Séminaire national sur les ignames. UNCI, Abidjan, du 28 au 30 novembre, 55-57.
- Bogelin M., Labonne G., Degras L., Quiot-Douine L. et Quiot J.B., 1993. *Caribbean Food Crop Society, Congrès juillet 1993, Martinique*, 4p.
- Doukoure S., 1990. Compte rendu du Séminaire national sur les ignames. UNCI, Abidjan, du 28 au 30 novembre, 47-48.
- Goudou-Urbino C., Degras L. et Quiot J.B., 1993. *Caribbean Food Crop Society, Congrès juillet 1993, Martinique*.
- Goudou-Urbino C., Konate G., Quiot J.B., Givord L. et Dubern J., 1993. *First Seminar of Yam Network in Africa*, 26 au 28 octobre, Cotonou, Bénin, 9p.
- Goudou-Urbino C., Konate G., Quiot J.B. et Dubern J., 1993. *Société d'Ecophysiologie*, séance du 14 mai 1993, Ecole Normale Supérieure, Rue d'Ulm, Paris, France, 13p.
- Grivet L., 1990. Compte rendu du Séminaire national sur les ignames. UNCI, Abidjan, du 28 au 30 novembre, 17-19.

Hamon P., Dumont R. et Zoundjihekpon J., 1992-a. Séminaire sur "Safeguarding the genetic basis of Africa's Traditional Crops", 5-9 octobre 1992, Nairobi, Kenya, 8p.

Hamon P., Zoundjihekpon J., Dumont R. et Tio-Toure B., 1992-b. Actes de colloque. BRG/MRT/Lavoisier, 175-184.

Malaurie B., Pungu O., Dubern B. et Thouvenel J.-C., 1992. *University of York*, 9-10 April 1992.

Mondeil F. et Tio-Toure B., 1993. *Réseau. Biotechnologies végétales. Rabt*, 14-18 octobre 1991, 359-370.

Pungu O., 1990. Compte rendu du Séminaire national sur les ignames. UNCI, Abidjan, du 28 au 30 novembre, 46.

Sanou H., Ahoussou N. et Mulongoy K., 1993. Séminaire international, IIRSDA. Programme et résumés. N° P28.

Zouhoury P., Nandris D., Nicole M., Digbeu S. et Dumont R., 1991. 9th ISTRC Symposium. Accra, Ghana, 12p.

Zouhoury P., Digbeu S. et Dumont R., 1992. 5ème Symposium Triennal de l'ISTRC-AB, Kampala, Ouganda, 11p.

Zoundjihekpon J., 1990. Compte rendu du Séminaire national sur les ignames. UNCI, Abidjan, du 28 au 30 novembre, 9-13.

Zoundjihekpon J., 1991. *Plant Sciences Today*. Ed. INRA, Y. de Kouchkovsky. Paris, France. Les Colloques N° 59, 84.

Zoundjihekpon J. et Toure B., 1989. *Proceedings. International Symposium. Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, July*, 177-182.

Zoundjihekpon J. and Tio-Toure B., 1992. Abstracts. XIIIth Eucarpia Congress. July 06-11th, Angers, France, 505-506.

Zoundjihekpon J., Hamon P., Hamon S., Duperrey C. et Tio-Toure B., 1992. Actes, BRG/MRT, Lavoisier, 573-575.

Zoundjihekpon J., Hamon P. et Tio-Toure B., 1993. IIRSDA, 19-23 avril 1993, Abidjan, Côte d'Ivoire, 20p.

Zoundjihekpon J., Hamon P., Hamon S. and Tio-Toure B., 1994. *Eucarpia*. March 15-18, 1994. France, 3p.

### ■ Liste des documents internes

- Dumont R., Kouakou A.M., Tokpa G. et Zoundjihekpon J., 1990. Document multigraphié, 8p.
- Zoundjihekpon J., 1991-a. Document multigraphié, 20p.
- Zoundjihekpon J., 1991-b. Document multigraphié, 19p.

### ■ Bibliographie

- Bourcelly J., 1980. *Cot. Fib. Trop.* Vol XXXV. Fasc 2, 189-202.
- Frantzen K.A., Johnson L.B. et Stuteville D.L., 1982. *Phytopathology*, Vol. 72, N° 5, 568-573.
- Goodman R.N., 1960. *Phytopathology*, N° 50, 325-327.
- Hasegawa K. and Hashimoto T., 1973. *Plant and cell Physiol.*, 14, 369-374.

Numéro de contrat : **TS2-A-119**  
Contract number :

▼ TITRE : **Utilisation agronomique de l'inoculation bactérienne du riz.\***

Title : *Bacterial inoculation of rice : agronomic use.*

▼ CHEF DE PROJET : Thierry Heulin  
Project leader : (Odile Berge, Nabil Omar, Mustaphizur Rahman, Van Tran Van)

▼ INSTITUTION-HOTE : Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS,  
Host institution : Centre de Pédologie Biologique.

▼ ADRESSE : Rue N-D des Pauvres 17 / BP5,  
Address : 54501 Vandoeuvre les Nancy, France.

▼ TELEPHONE : +33-83-51 08 60

▼ FAX : +33-83-57 65 23

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :  
- Egypte : Soils and Water Research Institute, (SWRI),  
Agricultural Research Council, (ARC), Giza.  
- Bangladesh : Soil Science Department, Dhaka University, Dhaka.  
- Vietnam : Institut de Biologie Expérimentale, (IBE), Centre National  
de la Recherche Scientifique, Ho Chi Minh Ville.

▼ MOTS CLES : égypte; bangladesh; vietnam; riz; bactérie; azospirillum; pseudo-  
monas; inoculation; fixation de l'azote; promotion de croissance;  
agronomie; écologie; formation.  
Key words : *egypt; bangladesh; vietnam; rice; bacteria; azospirillum; pseudo-  
monas; inoculation; nitrogen fixation; growth promotion; agronomy;  
ecology; training.*

▼ RAPPORT FINAL : 53p. Français (+ annexes).  
Final report :

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-183, p. 126

# Utilisation agronomique de l'inoculation bactérienne du riz

## Objectifs de la recherche

Ce programme de recherche avait pour principal objectif de démontrer que l'utilisation agronomique de l'inoculation bactérienne du riz était bénéfique et possible.

## Matériel et méthodes

Un protocole rigoureux a été suivi dans chacun des pays, Egypte, Bangladesh et Viêt-nam, impliqués dans le programme. L'isolement des souches a été effectué à partir des racines des cultivars locaux en croissance sur des sols prélevés dans chaque pays (Rahman, 1987; Omar, 1987; Tran Van, 1989). La sélection de la souche à inoculer s'est faite sur le critère de l'abondance et de la capacité à fixer l'azote (Heulin *et al.*, 1988). Dans chacun des pays, des essais d'inoculation, en conditions de plein champ, ont été réalisés dans différents sites pendant plusieurs saisons. L'effet d'inoculation a été testé à trois niveaux d'azote-engrais.

## Résultats

En Egypte, ces essais ont permis de montrer, sur une période de sept années, que l'inoculation du riz par la souche *Azospirillum brasilense* N040 permettait d'augmenter significativement les rendements en grains de 10 à 17% (Figure 1) (Omar *et al.*, 1989; Omar *et al.*, 1992).

Au Viêt-Nam, une nouvelle espèce fixatrice d'azote a été isolée des sols sulfatés acides cultivés en riz. *Burkholderia vietnamiensis* (figure 2) est ainsi la seule espèce fixatrice d'azote du genre *Burkholderia* (Gillis *et al.*, 1994). De plus elle possède la propriété de produire des sidérophores jusqu'alors inconnus (Meyer *et al.*,

1994) qui jouent un rôle dans la compétition pour le fer. Cette espèce bactérienne pourrait être un acteur de lutte biologique contre les champignons pathogènes des racines du riz. L'inoculation de la souche fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis* TVV75 a permis d'accroître les rendements de 13 à 21%, sur trois sites expérimentaux différents (Tran Van, 1994).

Dans les deux pays, l'inoculation bactérienne du riz est compatible avec

une fertilisation azotée élevée et permet d'économiser environ 30Kg/ha, par rapport au témoin non inoculé. Il apparaît très fréquemment que l'effet de l'inoculation bactérienne sur le rendement du riz, n'est positive que dans le cas où la fertilisation azotée est le facteur limitant de la culture. Dans ce cas, le rendement du riz augmente avec la quantité d'azote-engrais. Ce résultat montre une relation incontestable entre l'inoculation de bactéries fixatrices d'azote et la nutrition de la plante.

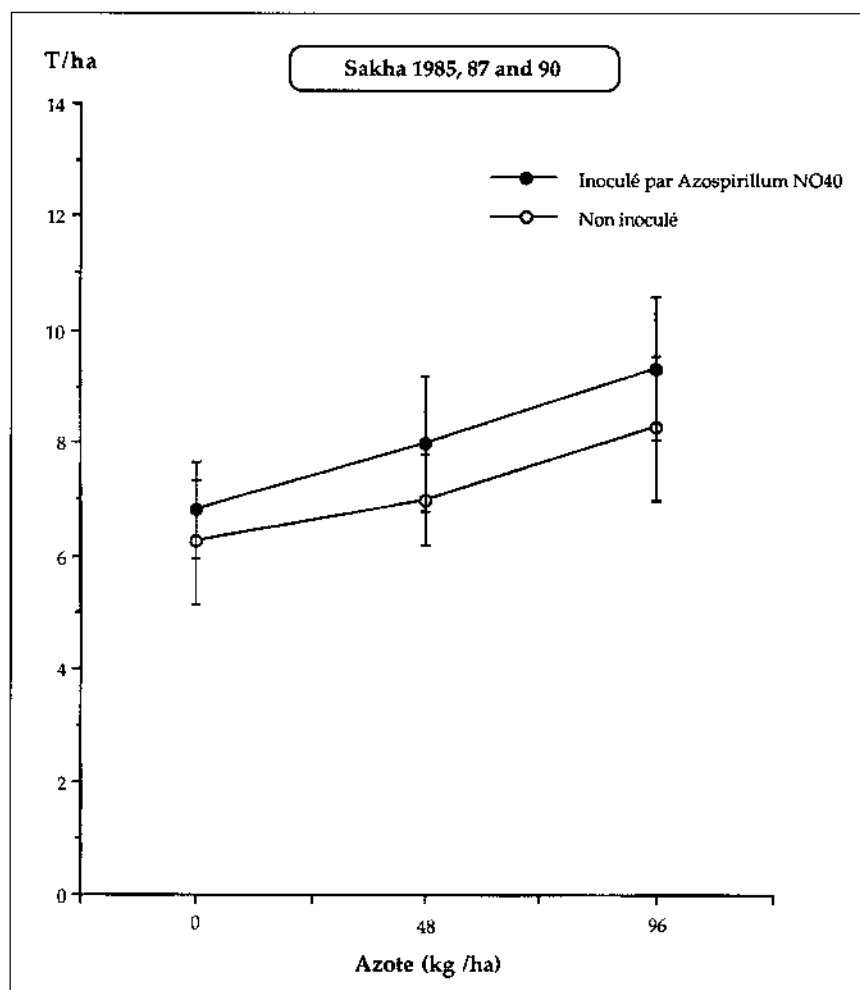


Figure 1 - Augmentation du rendement du riz après inoculation par la bactérie fixatrice d'azote *Azospirillum brasilense* N040. Résultats cumulés de trois essais en Egypte à la station expérimentale de Sakha.



Figure 2 - *Burkholderia vietnamiensis*, une bactérie fixatrice d'azote, découverte sur les racines du riz, en croissance sur un sol sulfaté acide du Viêt-nam.



Figure 3 - Champ de riz inoculé

Au Bangladesh, l'inoculation d'une souche performante au laboratoire *Azospirillum lipoferum* MRB16 (Fig. 3), s'est avéré inefficace dans tous les essais réalisés au champ. La grande diversité des sols bangladais pourrait expliquer cet échec. Une nouvelle campagne d'isolement d'*Azospirillum* sur des sols très variés a été initiée. L'étude de la diversité de ces souches et de leurs propriétés est en cours afin d'élucider le rôle du facteur sol dans la capacité à obtenir un effet de la souche inoculée.

L'optimisation de la technique d'inoculation a également porté sur l'étude de la résistance des souches inoculées aux herbicides (Omar *et al.*, 1992), la production d'un inoculum peu coûteux à partir de petit lait (Omar *et al.*, 1993), la possibilité d'utiliser des formes de résistance des *Azospirillum* (kystes) (Hubert, 1991), et la mise au point d'une méthode immunoenzymatique (ELISA) de contrôle de la qualité de l'inoculum (Gouzou, 1992).

Ce programme a contribué à la mise en place de laboratoires de microbiologie des sols, fonctionnels et bien équipés, aux échanges entre chercheurs à travers des missions, à la formation des étudiants et, au total, au rayonnement scientifique, sanctionné par une activité de publications soutenue.

## Publications

Gillis M., Tran Van V., Fernandez M.P., Goor G., Hebbbar P., Willems A., Seghers P., Heulin T., Kersters K., Bardin R. and De Ley J., 1994. Polyphasic taxonomy in the solanacearum rRNA complex with a redefinition of the genus *Burkholderia* and the position of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Viêt-Nam. (soumise à Int. J. Syst. Bacteriol.).

Gouzou L., 1992. Devenir d'une population bactérienne inoculée dans la rhizosphère du blé et ses effets sur la plante : cas de *Bacillus polymyxa*. Thèse Doct. Univ. Nancy I. 176p.

Heulin T., Rahman M., Omar A.M.N., Rafidison Z., Pierrat J.C., Balandreau J., 1988. Experimental and mathematical procedures for comparing N<sub>2</sub>-fixing efficiencies of rhizosphere diazotrophs. J. Microbiol. Methods, 9 : 163-173.

Hubert J.-L., 1991. Obtention et caractérisation de kystes d'*Azospirillum* pour l'inoculation de plantes cultivées. Thèse Doct. Univ. Nancy 1, 84p.

Meyer J.-M., Tran Van V., Stintzi A., Stephan H., Berge O. et Winkelmann G., 1994. Production and siderophores properties of Ombactins in strains of *B. vietnamiensis* and *B. cepacia* (formerly *P. cepacia*). Soumis à BioMetals.

Omar A.M.N., 1987. Fixation de l'azote dans la rhizosphère du riz : sélection d'une souche in vitro et effet de son inoculation dans trois rizières d'Egypte. Thèse Univ. Nancy 1, 106p.

Omar N., Heulin T., Weinhard P., Alaa El-Din M.N. et Balandreau J., 1989. Field inoculation

of rice in vitro selected Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria. *Agronomie*, 9 : 803-808.

Omar N., Berge O., Hassanein E.E. et Shalaan S.N., 1992a. In vitro and in situ effects of herbicide thiobencarb on rice-*Azospirillum* association, *Symbiosis*, 13 : 55-63.

Omar N., Berge O., Shalaan S.N., Hubert J.L., Heulin T. et Balandreau J., 1992b. Inoculation of rice with *Azospirillum brasilense* in Egypt. Results of five different trials between 1985 and 1990, *Symbiosis*, 13 : 281-289.

Omar N., Berge O., El-Sayed S.A. et Balandreau J., 1993. Whey as a growth medium for two spp. of *Azospirillum* grown in batch culture, *Zentralbl. Mikrobiol.*, 148 : 284-288.

Rahman M., 1987. Amélioration de la fixation d'azote dans la rhizosphère du riz cultivé sur différents sols du Bangladesh. Thèse Doct. Univ. Nancy 1 : 158p.

Tran Van V., 1989. Isolement et identification des bactéries fixatrices d'azote associées aux racines du riz poussant sur un sol de rizière du Viêt-nam. DEA, en Ecologie Microbienne, Univ. Claude Bernard Lyon 1 : 47p.

Tran Van V., 1994. *Burkholderia vietnamiensis*, sp nov, une protéobactérie fixatrice d'azote de la rhizosphère du riz, isolée d'un sol sulfaté acide : taxonomie et effet de l'inoculation sur la croissance et le rendement du riz. Thèse Doct. Univ. Nancy 1 : 334p.



Contract number : TS2-A-135  
 Numéro de contrat :

- |  |  |
|--|--|
| ▼ TITLE :  | <b><i>Study of the bacterial and plant functions involved in the formation of nitrogen-fixing stem nodules in Sesbania rostrata. *</i></b>   |
| Titre :  | <i>Etude des fonctions bactériennes et de celles de la plante impliquées dans la formation sur tige de nodules fixatrices d'azote, chez Sesbania rostrata.</i>   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                 | M. Van Montagu   |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :             | Rijksuniversiteit Gent, Laboratorium Genetika.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                               | Ledeganckstraat 35,<br>9000 Gent, Belgium.   |
| ▼ TELEPHONE :  | +32-9-264 51 70  |
| ▼ FAX :  | +32-9-264 53 49  |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées: | - Senegal : Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, Dakar.  |
| ▼ KEY WORDS :<br><br>Mots clés :                       | <p>symbiotic nitrogen fixation; nod genes; nod factor; host specificity; signal exchange; meristem induction; dormant root primordia; stem nodules; tropical legumes.</p> <p><i>fixation symbiotique de l'azote; gène de nodulation; facteur de nodulation; spécificité de la plante-hôte; émission de signaux; induction du méristème; primordium dormant de racine; nodule de tige; légumineuse tropicale.</i></p> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                    | 32p. English.  |

# Study of the bacterial and plant functions involved in the formation of nitrogen-fixing stem nodules in *Sesbania rostrata*

The aim of this project was to contribute to the understanding of tropical nitrogen-fixing symbiosis by the study of the interaction between *Azorhizobium caulinodans* and the leguminous shrub *Sesbania rostrata*. Bacterial and host plant functions play a role in the establishment of functional nodules. In the case of *Sesbania rostrata*, the particular feature of stem nodulation is of interest because it allows for abundant nodulation and relative insensitivity of nitrogen fixation to inhibition by nitrogen compounds present in the soil. As a consequence, this system has a great potential for input of nitrogen in tropical agriculture. Stem nodulation takes place at predetermined sites, i.e. dormant root primordia that are present all along the *Sesbania* stem. Part of our work focused on approaches to study the development of these sites. A mutant plant was isolated that no longer produces them. Genetic studies were performed and showed that the mutation is controlled by a single Mendelian locus and that the mutated allele is dominant over the wild type. To search for genes involved in development of sites, cDNA libraries were constructed from RNA isolated from stem pieces with and without primordia. A subtractive hybridization probe will next be prepared to search for plant genes involved in root primordium development.

To analyze the effect of genes on primordium development, it will be important to be able to isolate transgenic *Sesbania*. Experiments have been carried out to apply *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene

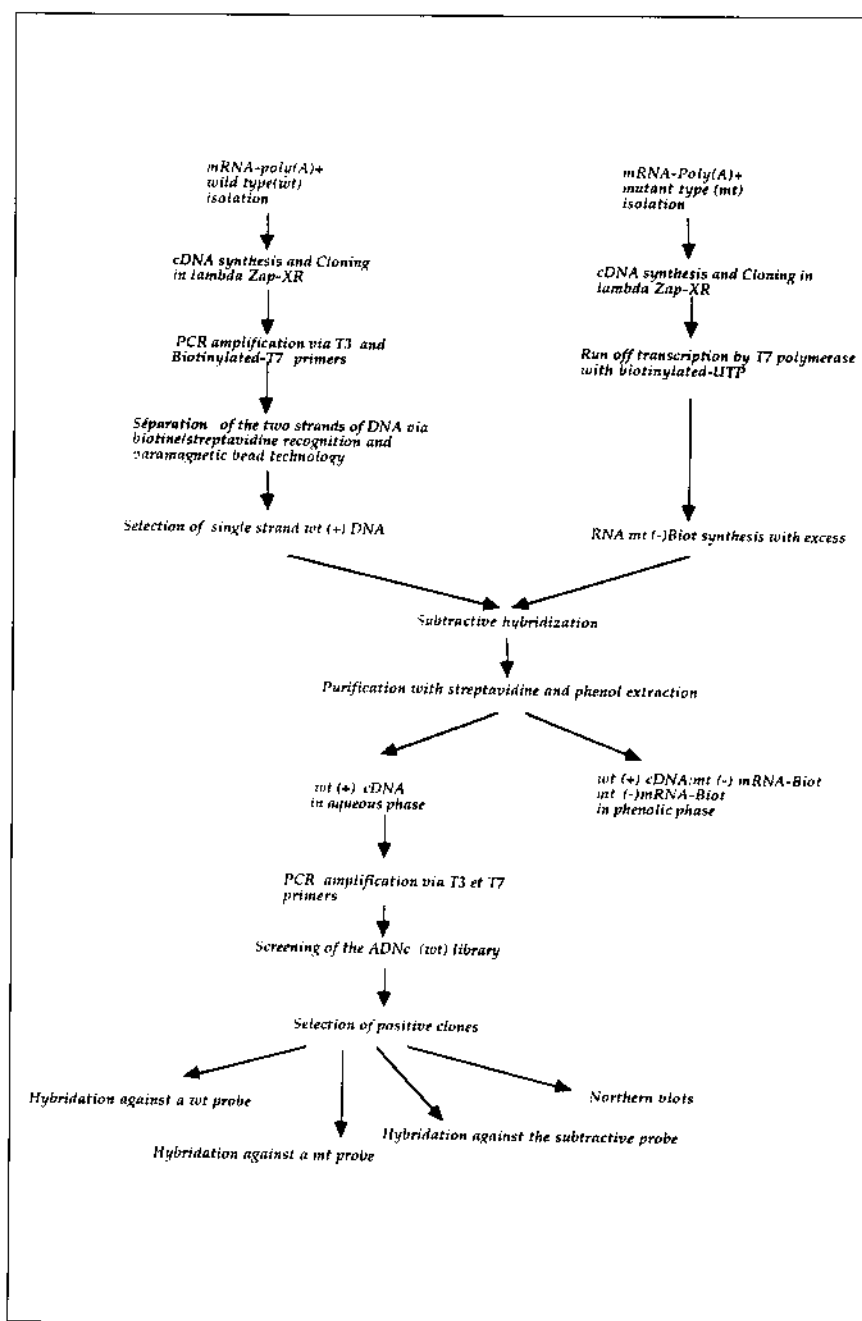


Figure 1 - Strategy for identification of meristematic/root genes involved in occurrence of stem nodulation sites using PCR and subtractive hybridization in *Sesbania rostrata* (Laboratoire de Microbiologie - ORSTOM-DAKAR).

transfer to *Sesbania* species. Once a transformation system is worked out, it can also be applied to engineer *Sesbania* with improved characteristics for use as a green manure (e.g. nematode resistance).

As for the bacterial partner, we have isolated and studied symbiotic genes essential for nodulation or contributing to the efficiency of nodulation. We have clearly established that root and stem nodulation follow a similar pathway and share essential functions. A comparative study of *Azorhizobium* and *Rhizobium* strains that nodulate *Sesbania* with different degrees of efficiency, clearly showed that a major aspect of the very successful stem nodule induction by *Azorhizobium*, consists of the induced *nod* gene expression at the site of stem nodulation. Thus, the thorough molecular study of bacterial nodulation genes and their expression pattern has been useful in identifying one aspect of host range specificity determination. Further studies led to the identification and structure determination of the molecules produced by the bacteria as a consequence of *nod* gene expression (the Nod factors NodARc). These are

lipo-oligosaccharides that exert several effects on host plant tissue, one of them being the induction of nodule meristem formation. Structure-function analysis and isolation of receptors will help to elucidate novel aspects of the host specificity of the interaction. These more fundamental molecular studies will provide a solid basis for understanding the molecular signals and targets that are necessary for symbiosis to be established.

## Publications

- Goethals K., Gao M., Tomekpe K., Van Montagu M. and Holsters M., 1989. Common NodABC genes in Nod locus I of *Azorhizobium caulinodans* : nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Mol. Gen. Genet.*, 219, 289-298.
- Goethals K., Van den Eede G., Van Montagu M. and Holsters M., 1990. Identification and characterization of a functional NodD gene in *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *J. Bacteriol.*, 172, 2658-2666.
- Messens E., Geelen D., Van Montagu M. and Holsters M., 1991. 7,4'-Dihydroxyflavanone is the major *Azorhizobium* nod gene-inducing factor present in *Sesbania rostrata* seedling exudate. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 4, 262-267.
- Goethals K., Van Montagu M. and Holsters M., 1992. Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 1646-1650.
- Goethals K., Mergaert P., Gao M., Geelen D., Van Montagu M. and Holsters M., 1992. Identification of a new inducible nodulation gene in *Azorhizobium caulinodans*. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 5, 404-411.
- Van den Eede G., Deblaere R., Goethals K., Van Montagu M. and Holsters M., 1992. Broad host range and promoter selection vectors for bacteria that interact with plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 5, 228-234.
- Holsters M., Goethals K., Geelen D., Mergaert P., Gao M. and Van Montagu M., 1992. Symbiotic genes of *Azorhizobium caulinodans*, a bacterium that nodulates *Sesbania rostrata*. In : *Agricultural Biotechnology (Proceedings of the Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, August 20-24, 1992, Beijing, China)*, You C.B. and Chen Z.L. (Eds), Beijing, China Science and Technology Press, 694-698.
- Mergaert P., Van Montagu M., Promé J.C. and Holsters M., 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-menthyl, and a carbamoyl group, are present on the nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1551-1555.
- Holsters M., Geelen D., Goethals K., Van Montagu M., Geremia R., Promé J.C. and Mergaert P., 1993. Nod factor production by *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. In : *New Horizons in Nitrogen Fixation (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Vol. 17)*, Palacios R., Mora P. and Newton W.E. (Eds), Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 191-196.

Contract number : **TS2-A-167**  
 Numéro de contrat :

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Selection of superior genotypes of cashew (Anacardium occidentale L.) in Guinea-Bissau and development of in vitro techniques for their propagation.</i></b>   |
| Titre :   | <i>Sélection de génotypes améliorés d'anacardier (Anacardium occidentale L.) en Guinée-Bissau et mise au point de techniques in vitro pour leur multiplication.</i>  |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | Raül Manuel Albuquerque Sardinha   |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Instituto de Investigação Científica Tropical.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Rua da Junqueira 86,<br>1300 Lisboa, Portugal.   |
| ▼ TELEPHONE :   | +351-1-364 50 71   |
| ▼ FAX :   | +351-1-364 20 08   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | - U.K. : University of London, Wye College, Ashford, Kent TN25 5AH.<br>- Guinea-Bissau : Direcção-Geral das Florestas e Caça, CP 71 Bissau.  |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | cashew nuts; vegetative propagation; in vitro propagation; breeding; technological nut characterization; guinea-bissau.<br><i>noix cajou; multiplication végétative; multiplication in vitro; amélioration génétique; caractérisation technologique de la noix; guinée-bissau.</i> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 103p. English.   |

# Selection of superior genotypes of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Guinea-Bissau and development of *in vitro* techniques for their propagation

## Objective of the research

The objective of this project was to improve cashew (*Anacardium occidentale* L.) trees cultivated in Guinea-Bissau to produce nuts with better technological characteristics and higher commercial value (Fig. 1).

In the framework of this project, the following studies were performed : screening and selection of cashew trees, physical characterization of their nuts, study of *in vitro* techniques for clonal tree propagation and setting up a clonal tree bank in Guinea-Bissau.

## Material and methods

### ■ Field screening and selection of cashew trees

Two missions for screening cashew trees planted in Guinea-Bissau took place in May-July 1990 and March-April 1991. Trees were selected according to the type of pseudo-fruit (apple) (colour, shape and size), classified and grouped accordingly. Secondary characteristics were also observed : apple weight and size, nut size, branching habit, taste and astringency of apple juice, colour of young leaves and sanitary problems. The rate of anthesis, hermaphrodite/male flowers ratio, and precocity of flowering and fruit production were noted from 12 to 14 March 1991 (Fig. 2).

### ■ Physical characterization of cashew nuts

Physical characterization of nuts for technological evaluation was made. In

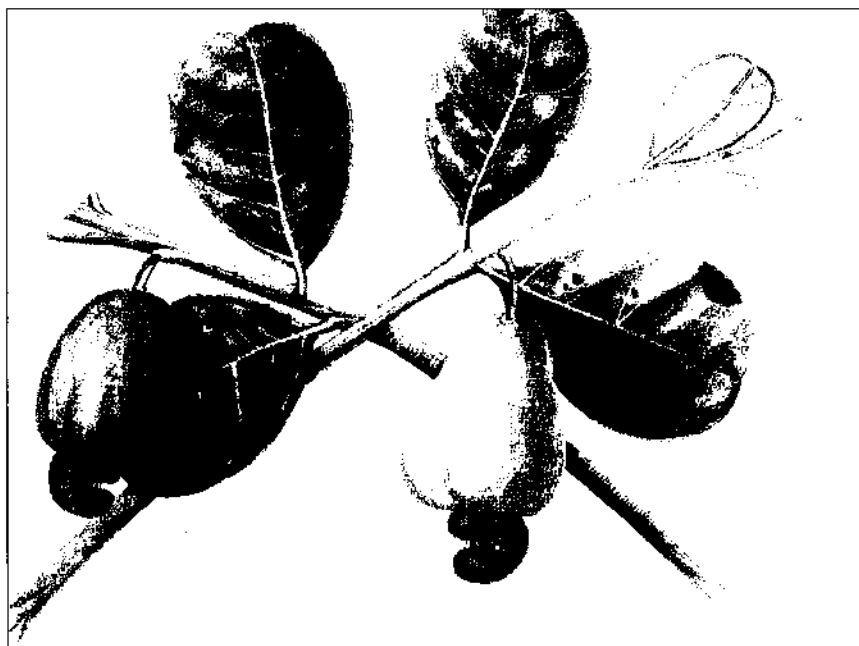


Figure 1 - Leaves and fruits of cashew.

each group samples made up of 20 nuts/tree were measured in order to determine : number of nuts/litre (using a cytometer); weight of one litre of nuts; number of nuts/100 g; weight of 100 nuts; volume of 100 nuts; real density average. A second set of measurements was performed in subsamples made up of ten nuts/tree : shell %, kernel with peel % and cashew shell liquid % (Fig. 3).

### ■ *In vitro* work

#### ■ Conditions of stock-plants

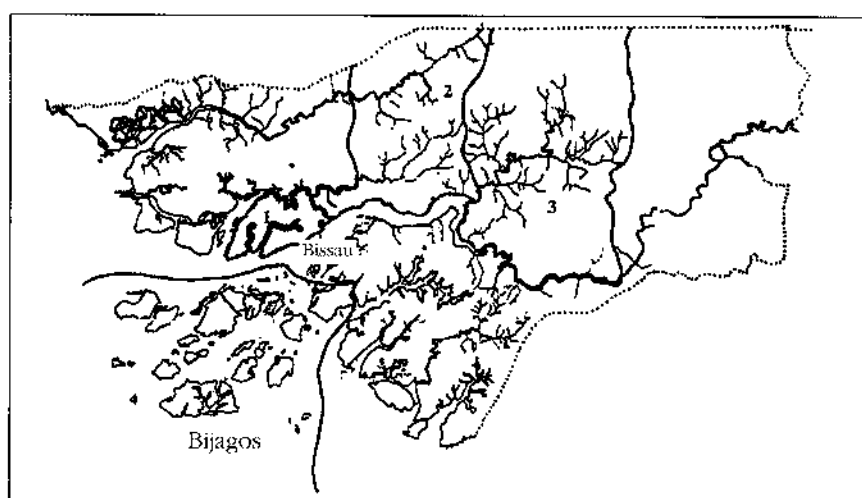
Stock-plants were obtained by sowing the seeds of selected trees in 30 cm-height pots and in a Nutrient Film Technique (NFT) system. Since it was

observed that plant temperature influenced multiplication rates, a new growing system for stock-plants was set. PVC drilled and no drilled tubes - 1.00 m long and 0.40 m large - were filled with a mixture of vegetable soil, black soil, peat and sand, on top of a 10 cm sand layer.

#### ■ Cuttings cultured *in vitro*

##### **Bud break and shoot growth *in vitro***

After preliminary results, this work was developed by using nodal cuttings (containing an axillary or apical bud) cultured in a MS medium-base (Murashige and Skoog, 1962) with different combinations of anti-oxidizing agent, hormones and pH values.



1: Biombo - 2: Oio - 3: Bafata - 4: Bolama

Figure 2 - Regions of Guinea-Bissau surveyed during field missions.

Different studies are synthesized as follows:

- shoot growth was studied (in media with benzylaminopurine-BAP) in function of : the relative position of the buds on the stem; bud position (vertical, inverted and horizontal) in the medium; presence or absence of the petiole on the bud;
- the effect of the stock-plant age (3-5 months old and 1-2 years old) in the bud break and shoot growth was studied in a MS medium containing ascorbic acid (49.32 mg/l), glycine (2 mg/l) and modified Morel's vitamins (Morel and Wetmore, 1951), nicotinic acid (1 mg/l), thiamine-HCl (1 mg/l), pyridoxine-HCl (1 mg/l) and m-inositol (100 mg/l). Other media with benziladenine (BA) and indolacetic acid (IAA) at two combinations (1 mg/l BA + 0.5 mg/l IAA or 2 mg/l BA + 1 mg/l IAA) were also used. For each combination two pH in the interval of 4.8 - 5.8 were tested;
- the effect of BA and IAA, and the pH on the flush growth (number of adult leaves produced per bud) were studied in cuttings from 1-2 year old plants. Hormone effect (BAP up to 10 mg/l and/or NAA -naphthalene acetic acid- up to 2 mg/l) in shoot growth was also assayed;
- the effect of modified levels of phosphate and nitrate in the standard MS medium were studied for two

levels : reducing to 20 % and increasing to 200 %.

#### Multiplication phase

Cashew multiplication was tried by changing *in vitro* conditions (type and concentration of hormones, temperature and light regime) and by monthly subculturing.

#### Rooting

Rooting was induced by fast and slow treatments on agar-solidified IAA or IBA (indolbutyric acid) solutions at several concentrations, in dark and light conditions. Shoots were then placed in three setting media with different drainage levels : an agar-solidified plain MS, a sterilized soil and sand mixture watered with MS solution and a NFT system.

#### Weaning

*In vitro* plantlets were placed on capillary mats in a propagator tray with a plastic cover. Mats were kept saturated and the humidity controlled by gradual ventilation in cover, which was removed once new leaves were produced (3-4 weeks). Shading was provided for the first 7-10 days. Three potting media were compared : vermiculite, a lime-free peat-based compost and a mixture lime-free compost : perlite (3:1). The establishment of *in vitro* plantlets was also tried in NFT system run with water for the first month, and thereafter with a nutrient solution.

#### ■ Complementary activities

##### ■ Leaf structure

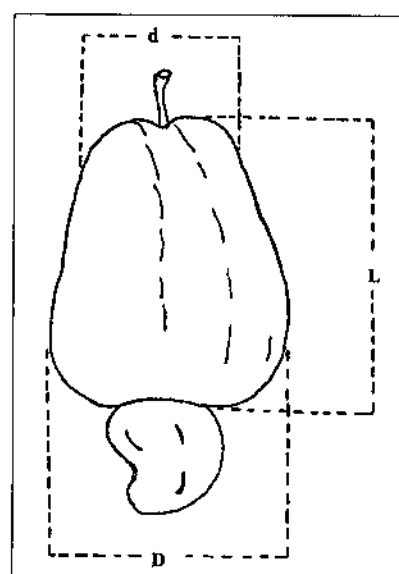
Electron microscopy was used to observe leaf anatomical features that could be related to weaning difficulties. Stomata number was quantified by calculation of the stomatal index (SI).

##### ■ Experimental clonal field

Experimental clonal plot was set up at Bula (Guinea-Bissau) for further comparative observations on the behaviour of cashew tree groups. Field design consists of 6 plots x 3 repetitions. On each plot (30x35 m), 42 holes (5x5 m) were dug and two cashew plants were planted in July 1991. Two missions took place in January-February and July-August 1992, to graft these plants (by apical cleft technique) with selected material.

##### ■ Cuttings rooting in fog system

Herbaceous and woody apical and under-apical cuttings, 20 cm in length, were dipped in IBA powder at 10 000 ppm, potted in perlite and placed in the fog system.



d: minimum diameter -  
D: maximum diameter - L: length

Figure 3 - Volume determination model of the cashew apple

## Results

### ■ Field screening and selection of cashew trees

The regions of Biombo, Oio, Bafata and Bolama were surveyed and 42 trees were selected. Seven groups were classified as set forth (Bessa and Sardinha, 1993).

Group A : pseudo-fruit cordiform («cajú da terra»), red, medium size, low to medium astringency, low consistency; nut size:medium; branching-type:predominantly intensive to intensive.

Group B : pseudo-fruit periform («cajú de Moçambique»), predominantly red, medium size, very astringent and consistent; nut size:big; branching type:mixed.

Group C : pseudo-fruit cordiform, yellow, big size; low astringency; nut size:from medium to big; branching type:predominantly extensive to extensive.

Group D : pseudo-fruit cordiform, predominantly yellow, small size, low to medium astringency and low consistency; nut size : small; type: mixed.

Group E : pseudo-fruit periform, red, medium to large size; nut size medium to large; branching type : mixed.

Group F : pseudo-fruit periform, yellow, large, very astringent and consistent; nut size: large; branching type: extensive.

Group G : pseudo-fruit cordiform, predominantly red, medium to large size, low to medium astringency; nut size: large to medium; branching type: mixed.

In relation to other characteristics observed it was noted that :

- flowering was at its peak in all trees with the exception of E3 which was at the end of its flowering period;
- A1, A4, A5, A6, B1, B3, E3, F1 and F8 trees seemed more precocious

showing ripening pseudo-fruits and nuts;

- rate of opened flowers varied between 1/2 (on more precocious plants) and 1/22 (on later-producer trees);
- ratio hermaphrodite/male flowers varied from 1/2 to 1/154 and some inflorescence did not show any hermaphrodite flower.

### ■ Physical characterization of cashew nuts

The analysis of the physical characterization data (Sardinha *et al.*, in preparation) showed that nuts from selected trees presented a certain diversity whereas the groups type D and F must be distinguished from the other five.

Group D showed the least heavy (4.0 g) and the smallest nut (length : 26,6; width : 21,0; high thickness : 15,2 and low thickness : 10,5 mm; number of nuts/litre = 140; nut volume = 4,1 g), while group F presented the heaviest (8,7 g) and the biggest nut (length : 36,7 mm; width : 27,6 mm; high thickness : 18,2 mm and low thickness : 12,1 mm; number of nuts/ litre = 66; nut volume: 8,8 g).

Nevertheless, group D showed the heaviest litre of nuts (589,1 g) and highest real and apparent densities (0,589 and 1,045, respectively) whereas group F showed the least high values (546,0 g; 0,546 and 0,996, respectively). This characteristic for the biggest nut does not represent, however, the best commercial and technological value as is evidenced by the analysis of shell % and nut and peel % which were 70,9 % and 29,1 % for group F while group D had 62,5 % and 37,5 % respectively.

### ■ In vitro work

#### ■ Conditions of stock-plants

Plants grew faster and healthier in tubes than in pots, and seemed to better tolerate winter conditions in the glass-house. This behaviour must be explained by improved rooting due to the deeper and better drained conditions thus obtained, leading to an improved apical and axillary flush growth. In the NFT system, good plant growth was observed under pH 5,5 MS solution made up with R.O. water and heated at 25 °C; the solution was changed fortnightly to avoid the build-up of pathogens or allelopathic substance (Fig. 4).



Figure 4 - Four months old cashew seedlings growing at CIFIC glass-house in the tube system.

## ■ Culture of cuttings *in vitro*

### Bud break and shoot growth *in vitro*

In synthesis *in vitro* results are as follows (Bessa *et al.*, in preparation):

- Shoot growth seemed generally better in buds from the proximal end than the distal end of the stem. The addition of BAP, although inhibitory for all node positions, was more marked in explants from the distal end. Best growth was obtained in the absence of BAP (Bessa *et al.*, in preparation). Higher percentage of bud break was shown on cuttings placed vertically in the medium (77.2 %) whereas growth was severely inhibited in explants placed inverted (27.2 %). Only 46 % of explants without petiole showed bud break while if the petiole was left attached, bud break increased to 75 %;
- Bud break (measured by flush growth with adult leaves or visible leaf primordia) varied from 39 to 100 % in function of mother-plants' age. Best data (88-100 %) were obtained in cuttings from plants 3-5 months old, while lower results were observed in cuttings from plants 1-2 years old (the highest data, near 65 %, were in hormone-free media);
- After 56 days, cuttings in the medium containing both 1 mg/l BA and

0.5 mg/l IAA showed flushes with more leaves than those in a free-hormone medium (Bessa and Sardinha, 1993);

- The addition of BAP or NAA reduced growth, as compared with a hormone-free medium. When added together, at 2 mg/l, growth was severely inhibited and maximum growth was obtained without either hormones;
- The reduction or the increase of phosphate or nitrate did not benefit *in vitro* growth and best results were obtained with both MS standard levels (Fig. 5).

### Multiplication phase

Flush growth produced *in vitro* fell on a latent phase during which growth rate strongly decreased and the multiplication phase became more erratic. Results seemed, nevertheless, to point out the positive role of BA + IAA combination (in relation to a free-hormone medium) in the multiple flush production in the same axillary bud (40 and 58 %) (Bessa and Sardinha, 1993).

Last results showed a successful multiplication rate in old *in vitro* cultures initiated in different media and culture conditions, and maintained by monthly subculturing in a fresh medium. After 9-15 months, and almost spontaneously, these cultures started to produce multiple flushes from the old *callus* produced on the cuttings base in contact with the medium. This flush production showed a high rate of multiplication (26.6) and *calli* presented continuous mass growth even in a free-hormone medium. Existing shoots were well developed and presented an average of 5.2 adult leaves. Shoots prepared from their mother-culture, continued their elongation and even started to produce more shoots from their base *callus*.

### Rooting

Rooted plantlets were obtained, spontaneously or after an induced auxin-treatment, although plant response was not consistent (Bessa and

Sardinha, 1993; Bessa *et al.*, in preparation).

### Weaning

All plantlets in vermiculite died while 50 % survived in each of the other media. Best plant growth was realized in a mixture of lime-free peat-based compost and perlite. A second trial with this mixture showed that 83 % of plantlets were successfully established (Bessa *et al.*, in preparation). Plantlets transferred to a NFT system showed over 50 % survival. This percentage may be increased if better developed plants are used.

## ■ Complementary activities

### ■ Leaf structure

Glasshouse-grown leaves showed stomata predominantly on abaxial (lower) surface with few or none on adaxial (upper) surface. *In vitro* grown leaves showed the same pattern. Stomatal index of the abaxial surface of *in vitro* grown leaves gave a higher figure than that from glasshouse. This larger number of stomata was scattered irregularly over the whole abaxial surface but they were often open. The adaxial surface of *in vitro* leaves showed a few wide-open stomata which were absent over most of the leaf surface. So, stomata *in vitro* may lack the ability to fully close and often stay wide open, thus increasing water loss and further death of the plants.

Cultivar ridging with striae was widespread on the adaxial surface of the glasshouse-grown leaves, but was only associated with the stomata on its abaxial surface. This cuticle thickening on the upper surface would reduce water loss. *In vitro* grown leaves appeared to have a much less developed cuticle on both surfaces, which can induce, cumulatively, more rapid water loss in low humidity environments.

### ■ Experimental clonal field

In January-February 1992, 41 selected cashew trees were grafted. Grafting results were very poor since trees were



Figure 5 - Cashew seedlings growing in the tube system at Wye College.



already flowering, and Guinea-Bissau had showed unusually high temperatures.

A fourth mission took place during the beginning of the rainy season (July-August) which coincides with a shooting period after production. Grafting results were poor which is attributed to unsuitable season for the operation and low involvement of the local team.

#### ■ Cuttings rooting in fog system

Data showed that 54.1 % of sub-apical cuttings rooted against only 9.3 % for apical shoots. (Fig. 6) Among sub-apical cuttings, woody ones showed better rooting feasibility (56.8 %) than herbaceous (42.9 %) (Bungué, 1993).

### Conclusion and additional comments

#### ■ Plant material

Cashew nut grade in Guinea-Bissau is poor due to its small size. This warrants clear action directed to provide improved material with higher commercial potential.

Commercial lots reveal high variability which seems to be a guarantee of high foreseeable potential genetic gains from breeding material.

Based on apple colour, shape and size, various tree groups were identified. Biometric description of apple and nut shows different potential in terms of grade and commercial value. The commercial value being a function of grade, breeding and seedlings production programme is deemed very important to guarantee the highest return to farmers from cashew tree plantations.

Clone yield potential, and disease susceptibility, along with nut quality, are important aspects of any breeding program for this species. However, short term projects do not allow consolidation of clonal orchard which is an essential step to fulfil these objectives.

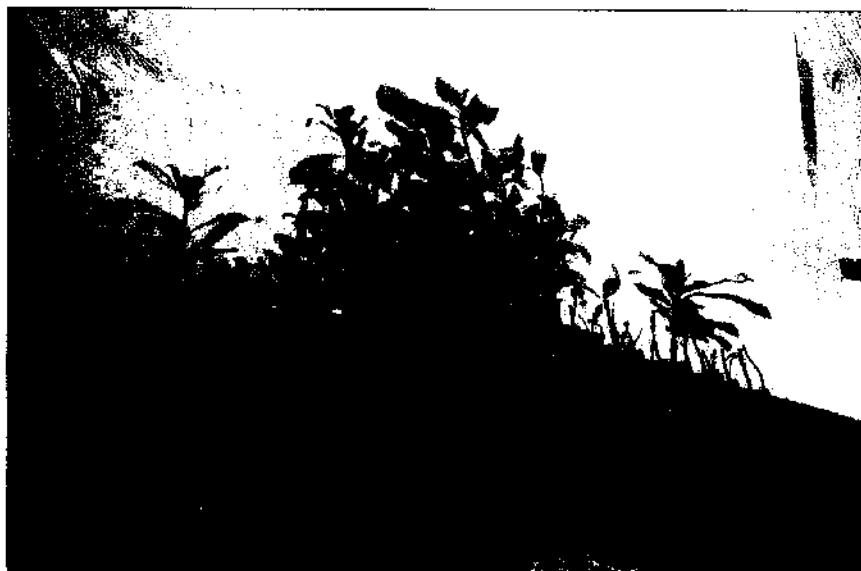


Figure 6 - Successful cuttings rooting in Fog System.

#### ■ Vegetative propagation

Explants used were axillary or apical nodal cuttings taken from glasshouse-grown plants. Better shoot growth generally occurred in the buds taken from the proximal end of the stem.

Hormones do not seem an important additive for bud break that occurs (near 100 %) using a hormone-free MS medium. Stock-plant age is seen however to affect bud break. Youngest stock-plants (3-5 months old) clearly show better positive response (88-100 % against 39-65 % for older plants (1-2 years old)).

Shoot growth was, however, positively promoted by hormone addition (1 mg/l BA and 0.5 mg/l IAA) in the media originating 4 leaves after 56 days in culture.

Plant response to decreased and increased levels of phosphate or nitrate in the standard MS media did not seem to improve *in vitro* growth. Best results were obtained with standard nutrient levels.

Hormones have been shown to be important during the multiplication phase of cashew. BA (1 mg/l) and IAA (0.5 mg/l) hormone combination had a positive role in multiple flush pro-

duction in the same axillary bud. *In vitro* multiplication has shown an erratic behaviour that could not be explained during the time - frame of this project.

Old *in vitro* cultures (9-15 months) have however revealed high capacity for multiplication by producing multiple flushes from the *callus* produced on the cuttings base in contact with the medium. These successful results can perhaps be explained by an *in vitro* adaptation due to cycled increase of mineral, organic and hormonal compounds obtained by monthly subculturing during so long a period. In these conditions, the balance of endogenous hormones may change and unleash an organogenic or embryogenic reaction. To understand this behaviour, biochemical and genetic control warrants further studies.

Root formation succeeded spontaneously or after induced auxin - treatment (IAA or IBA). Different potting media were tested with mixed results. Data were not consistent enough to guarantee a standard procedure for mass plant production at this stage. Further studies will be mandatory for successful commercial plant production.

Although cashew is considered a plant difficult to transplant, weaning results reached 83.3 % of survival in a mixture of lime-free peat-based compost and perlite (3:1). NFT did show poor results (50 % survival). Again, in the time-frame of the project, optimization could not be provided. Survival rate is however already very good and augurs well for the potential of the technique. Scanning microscopy observations on leaves and stomata made it possible to observe the importance of humidity above plants during the initial stage of establishment before breaking of new leaves.

### ■ Macro-propagation by cuttings

Data analysis of rooting ability under fog conditions of cuttings with differ-

ent woody tissue levels and relative position in the stem shows that best results were reached with sub-apical cuttings (54.1 %) and among these, woody cuttings presented the best results (56.8 %). Results are clearly promising and the optimization process of this technique, by its simplicity and the relatively low costs of the infra-structure as compared with tissue culture laboratories, may prove its suitability under tropical conditions.

### *Publications*

Bessa A.M.S. and Sardinha R.M.A., 1993. O melhoramento do cajueiro (*A. occidentale* L.) na Guiné-Bissau. Comunicações, Série Ciências Agrárias, IICT (in press).

Bessa A.M.S., Guyer D., Blake J. and Sardinha R.M.A. In vitro cashew (*A. occidentale*) propagation by nodal cuttings (in preparation).

Bungué P.T., 1993. Guiné-Bissau e a cultura do cajueiro (*A. occidentale* L.). Centro de Estudos de Tecnologia Florestal, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, IICT.

Morel G. and Wetmore R.H., 1951. Fern callus tissue culture. *American J. Bot.*, 38 : 141-143.

Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15 : 473-497.

Sardinha R.M.A., Bessa A.M.S. and Bungué P.T. Physical characterization of cashew (*A. occidentale*) nut in Guinea-Bissau (in preparation).

Contract number : **TS2-A-193**  
Numéro de contrat :

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Nitrogen and water use of beans-maize mixtures in a marginal rainfall area of Kenya.</i></b>   |
| Titre :   | <i>Utilisation de l'azote et de l'eau par des cultures mixtes de haricot et de maïs dans les zones semi-arides du Kenya.</i>                                   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | Dr. Martin Wood  |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | University of Reading,<br>Department of Soil Science.  |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | London Road,<br>Reading RG1 5AQ, U.K.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +44-734-87 51 23   |
| ▼ FAX :   | +44-734-86 98 58   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | - Ireland : University College, Dublin.<br>- Kenya : Kenya Agricultural Research Institute.  |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | beans; maize; nitrogen; water; semi-arid; kenya; cowpea; intercropping.<br><i>haricot; maïs; azote; eau; semi-aridité; kenya; niébé; culture intercalaire.</i> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 152p. English.   |

# Nitrogen and water use of beans-maize mixtures in a marginal rainfall area of Kenya

## Objective of research

The aim of the project was to measure nitrogen fixation, photosynthesis and water use by inoculated beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays* L.) growing in mixtures and monocultures in a marginal rainfall area in Kenya. It would provide a field-based assessment of the benefits of

- inoculating beans with *Rhizobium*;
- growing a N<sub>2</sub>-fixing crop in a marginal rainfall area;
- using a legume in a mixed cropping system.

The following hypotheses were to be tested :

- Beans inoculated with selected strains of *Rhizobium* fix more atmospheric nitrogen than do uninoculated beans grown under rain-fed conditions.
- The combined yield of beans plus maize growing in mixtures is greater than the yield of the crops grown in monocultures.
- The benefit of using a legume crop in a mixed cropping system is due to the sparing of soil mineral nitrogen, which is available for use by the non-legume, rather than to direct transfer of nitrogen from legume to non-legume.
- Beans which are fixing nitrogen use more energy for nitrogen assimilation than beans using soil mineral nitrogen and therefore yield less.
- The high energy cost of nitrogen fixation results in a fixing plant accumulating less dry matter per unit water transpired than a non-fixing plant.

In addition to these scientific objectives, the programme of research

provided the opportunity for collaboration and training.

## Materials and methods

### ■ Location and soil characteristics

The field site was at the New Nursery site, Kiboko Rangeland Research Station (2°10' S, 37°40' E), adjacent to Hunter's Lodge and the Nairobi-Mombassa highway. It is at an altitude of 980 m. The site was flat to gently undulating, slope < 3 %. The soil is classified as an Acri-Orthic Ferralsol, which is derived from undifferentiated gneisses, and is well-drained. Texturally, the 0-35 cm layer is a sandy clay loam which overlies a sand clay (35-110 cm), with quartz grains in the 72-110 cm horizon and 5-10 mm concretions of iron and manganese oxides and hydroxides in the lowest horizon (110-135 cm). The field site falls within the LM5 (livestock and millet zone) agro-ecological zone. This is characterized by an annual average rainfall of 600-700 mm, divided between a long rains (March to June) and a short rains (October to December) season. In 6 out of 10 years between 50-160 mm of rain fall in the long rains, and 150-220 mm fall in the short rains.

*Phaseolus vulgaris* cv. B9 and *Zea mays* cv. Makueni Composite were used and treatments were arranged in randomized block designs for each experiment. Generally there were 4 blocks, except in the irrigation and inoculation trials when there were only 3. Plot sizes were generally 6m x 4m, except for the intercropping experiments when they were 3m x 3m and the inoculation trial when they were 5m x 2m.

Inter-row spacings for beans and maize were always 40 cm and 75 cm respectively. The within-row spacing was generally 20 cm for beans and 30 cm for maize, giving target plant densities of 12.5 plants/m<sup>2</sup> and 4.4 plants/m<sup>2</sup> respectively. Plots were sampled throughout each season until physiological maturity. The total nitrogen content of each fraction of plant material from every sampling date was determined.

Soil water content was measured using neutron probe, and fertilizer recovery using <sup>15</sup>N labelled fertilizer.

## Results

Close and harmonious links were quickly established with KARI staff, and with ICRISAT field workers who were establishing a research station at Kiboko. Similarly mutually beneficial links were established with the ODA-funded Larger Grain Borer project and with TSBF and ACIAR staff in Nairobi. The KARI laboratory at Muguga was equipped in order to carry out the proposed work.

Sufficient funds were only available to train one Kenyan scientist to Ph.D. level at University College Dublin. However, other scientists, one Kenyan and one Indian, used the experimental programme as a basis for their research training. Furthermore, the technical staff at National Agricultural Research Centre, Muguga received training in the techniques appropriate to the project, and in the safe use of the equipment to be left once the project finished.

### ■ Microbiological approaches towards sustainable crop production

Beans failed to fix nitrogen in any field trial over 6 cropping seasons. While the indigenous rhizobial population was capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in the glass-house, it failed to do so in the field, where soil temperatures were probably prohibitive. Some strains of thermophilic rhizobia did nodulate beans, but even they were not effective (i.e. they failed to fix nitrogen). By contrast, in the single season when it was measured, nodulation and nitrogen fixation by cowpeas was good.

In terms of the original project proposal, there was no benefit in inoculating beans with rhizobia. Also any nitrogen benefit from growing a legume was dependent upon the legume species. Clearly, the choice of legume is therefore crucial to the nitrogen balance of the semi-arid areas.

### ■ Soil nitrogen as a resource for crop productivity

Plant growth is dependent upon a continued supply of mineral nitrogen. Gross rates of nitrogen mineralization increased rapidly as the soil moisture content increased from 10 to 20 %. Neutron probe measurements in the field indicated comparable changes in volumetric soil moisture content at the beginning of the rainy season. Rates of gross mineralization and soil moisture contents from the field indicated that up to  $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$  may be mineralized in the top 30 cm of soil.

Much of this mineralization occurred when increases in crop dry matter were greatest. Therefore, it may not be surprising that yields of both maize and beans were unaffected by applied nitrogen fertilizer, and that fertilizer recoveries were low (20 % at best). These data imply that nitrogen may not be a limiting resource for plant growth at this site. Although the relationship between total dry matter and total nitrogen content was independent of



Figure 1 - Staff from the Kenyan Agricultural Research Institute (KARI) and from the University of Reading at Kiboko Research Station.

season for both vegetative maize and beans, the rate with which biomass was produced per unit of nitrogen, either in the whole plant (*Nitrogen Productivity*) or in the leaf mass (*Nitrogen Use Efficiency*), was greater in maize than beans, reflecting their different photosynthetic pathways. Both of these measures of efficient nitrogen use are assumed to be constant for a given species in a fixed environment. Clearly, this ought not to apply to field experiments, where differences between seasons add to variability. Nevertheless, the relationships relating to efficient nitrogen use are remarkably good. A comparison of all of the bean data suggests similar slopes for efficient nitrogen use, unlike the slopes for maize. This indicates that leaf nitrogen makes a larger contribution to total plant nitrogen in beans than in maize.

When the choice of legume may influence whether any nitrogen is fixed, the choice of crop will also determine the amount of nitrogen that is removed from the system. In the field trials at Kiboko, beans, because of the higher percentage nitrogen content of their grain, removed more nitrogen per season from the soil ( $6\text{--}13 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) than maize. Although neither maize nor beans provide sus-

tainable cropping systems in semi-arid Kenya, surprisingly it is the production of beans which is the less sustainable system.

### ■ Management practices controlling crop production

Neither nitrogen fertilization nor changes in plant population density affected dry matter production. Yields of both maize and beans were usually no greater and often lower when grown in additive mixtures than when grown as sole crops. Consequently there is no benefit of intercropping maize and beans in terms of yield production in the marginal rainfall areas. This is probably because beans failed to fix nitrogen, and so failed to exploit a different niche from that of maize. However, there was some apparent complementarity in water use between the crops even though there was no difference in rooting depth. Slight differences in LER between seasons were attributed to the difference in timing and distribution of rainfall in relation to crop growth.

### ■ Towards more efficient evaporative losses

While total evaporative losses (E+T) constituted at least 90 % of the sea-

sonal rainfall in the absence of significant drainage, normally only one fifth to one quarter of this was transpired. Opportunities for increasing this small proportion by changes in crop management practice (e.g. fertilizer application, plant population density) are restricted because evaporation losses (E) from sandy soils quickly become supply limited rather than energy limited. Nevertheless, transpiration losses did increase as rainfall increased. A contributory factor to the small transpirational loss may have been the shallow rooting depths (<50 cm) at this site. Furthermore, the low-volume transpiration losses ensured large transpiration efficiencies for both maize (82.6 kg ha<sup>-1</sup> mm<sup>-1</sup>, on average) and bean (37.2 kg ha<sup>-1</sup> mm<sup>-1</sup>, on average). The species difference reflects their different photosynthetic pathways; C<sub>4</sub> species have higher efficiencies than C<sub>3</sub> species.

The data indicate a constraint on crop growth other than nitrogen availability. Water is an obvious limiting resource at this site. When additional water was supplied, the relationship between total dry matter and total nitrogen increased significantly ( $p < 0.05$ ). However, it must be doubtful whether this limitation due to water supply can be removed fully either naturally or artificially (by irrigation) given the constraining influence of the relationship between T/ET and water supply (rainfall and irrigation), whereby an addition of 109 mm of water are required for each 0.1 increase in T/ET. Changes in T/ET due to irrigation were less effective than those due to rainfall. Rainfall totals greater than 400 mm per season are uncommon and when they do occur other constraints such as disease may become important. Furthermore, developmental responses to temperature and photoperiod are such that there may be insufficient time for changes in rainfall frequency and distribution

to affect T/ET, and so crop productivity.

Finally, intercrops of maize and beans in semi-arid Kenya utilize nitrogen, water and carbon less efficiently than sole crop, and consequently yield less. Photosynthesis and the mineralization and uptake of soil mineral nitrogen are limited by rainfall frequency and distribution. Consequently, plant productivity is maximal given the constraints imposed not only by total water supply but also by the small proportion of rainfall that is transpired.

## Conclusions

On agronomic grounds alone, crop productivity in this region is limited first by crop selection (e.g. cowpeas yield more than beans), and second by the management practices used. Yields may be increased significantly by mono-cropping rather than inter-cropping.

However, additional increases in crop production in the region are unlikely without access to irrigation facilities. Rainfall volume and frequency ensures that evaporation from the soil surface is a very large component of evapotranspiration loss in the area. Consequently, volumes of transpired water are small, and yields commensurately low. Changes in crop management practices do not significantly increase the proportion of evapotranspiration that is transpiration, and offer few prospects for increasing productivity.

Soil nitrogen levels will inevitably decline, since both maize and beans commonly remove 40-50 kg N ha<sup>-1</sup> in their grain in a single rainy season. Furthermore, beans fail to nodulate and so to fix nitrogen. Consequently, without significant fertilizer inputs, even moderate levels of productivity of a maize-bean cropping system are

not sustainable in this area in the long-term. Nevertheless, it should be noted that changes in the rate of mineralization of soil nitrogen with soil moisture content are currently sufficient to meet plant requirements at times of rapid growth.

The data presented here are from a single site, nevertheless together they present a bleak prognosis for improvements in crop production in semi-arid Kenya, if they are more widely applicable. It is imperative that semi-arid regions are surveyed to discover the extent to which these findings may be generalized.

## Publications

Pilbeam C.J., Mahapatra B.S. and Wood M., 1993. Soil matric potential effects on gross rates of nitrogen mineralization in an orthic Ferralsol from Kenya. *Soil biology and biochemistry*, 25, 1409-1413.

Pilbeam C.J., Okalebo J.R., Simmonds L.P. and Gathua K.W. Analysis of maize-phaseolus bean intercrops in semi-arid Kenya. *Journal of agricultural science, Cambridge*.

Pilbeam C.J., Wood M. and Mugane P.G. Sustainability of nitrogen use in maize-grain legume cropping systems in semi-arid Kenya. *Biology and fertility of soils*.

Pilbeam C.J., Daamen C.C. and Simmonds L.P. Analysis of water budgets in semi-arid lands from soil water records. *Experimental agriculture*.

Pilbeam C.J., Mugane P.G., Wood M. and Kavilu A.W. Constraints to nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. in semi-arid Kenya. In : Proper soil management - a key to food security in our nations. 12th soil science society of East Africa meeting, Nakuru, Kenya. 30th November - 5th December 1992.

Pilbeam C.J. and Wood M. Importance of biological nitrogen fixation to the soil nitrogen budget in semi-arid Kenya. In : 4th AFRC Meeting on plant and soil nitrogen metabolism, Cranfield Institute, Silsoe Campus, 15-17 December 1993.

Pilbeam C.J. and Warren G.P. Studies with <sup>15</sup>N on fertilizer N recovery and N mineralization in semi-arid Kenya. In : International Symposium of nitrogen economy in tropical soil. The University of the West Indies, Trinidad, West Indies, 9-14 January 1994.

Contract number : **TS2-A-199**  
 Numéro de contrat :

- |   |   |
|---|---|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Improvement of N<sub>2</sub> fixation on beans by heat tolerant Rhizobium strains isolated from tropical trees.</i></b>   |
| Titre :   | <i>Amélioration de la fixation de l'azote chez le haricot par des souches de Rhizobium résistantes à la chaleur, prélevées sur des arbres tropicaux.</i>  |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | Jos Vanderheyden  |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | F.A. Janssens Laboratory of Genetics,<br>K.U. Leuven.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Willem de Croylaan 42,<br>B-3001 Heverlee.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +32-16-22 09 21 (extension 2403)  |
| ▼ FAX :   | +32-16-20 07 20   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Brazil : Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo, EMBRAPA, Rio de Janeiro.</li> <li>- Uruguay : Instituto de Investigaciones Biologicas Clemente Estable, Montevideo.</li> <li>- Scotland : Department of Biological Sciences, University of Dundee.</li> </ul>  |
| ▼ KEY WORDS :<br><br>Mots clés :                        | beans; nitrogen fixation; heat tolerance; leguminous trees; rhizobia; nodulation; microbiology; genetics; molecular biology; regulatory genes; field test.<br><i>haricot; fixation de l'azote; résistance à la chaleur; légumineuse arborée; rhizobium; nodulation; microbiologie; génétique; biologie moléculaire; gène de régulation; essai au champ.</i> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 420p. English.  |

# Improvement of N<sub>2</sub> fixation on beans by heat tolerant *Rhizobium* strains isolated from tropical trees

## Objective of the research

Biological nitrogen fixation in leguminous plants is a well-known process. Although the microbiology and the molecular biology of this process are intensively studied, some key problems with respect to agricultural practice remain largely unsolved. For beans (*Phaseolus vulgaris*), in particular, it is widely known that the efficiency of biological nitrogen fixation is very low, and that inoculation of beans with rhizobia is seldom effective. Initially it was thought that *Phaseolus vulgaris* can be nodulated by only one type of *Rhizobium*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. This concept was proven to be wrong and the thesis that «bean is a promiscuous host for rhizobia» was forwarded and validated. Based on this thesis, a screening for bean-nodulating rhizobia is considered. Within this screening program, emphasis should be given to the performance (nodulation, nitrogen fixation) of isolated strains at elevated temperatures, conditions that are believed to restrict biological nitrogen fixation in beans. It was decided to compare bean nodulating laboratory strains and field isolates for:

- rhizosphere competence,
- nodulation capability,
- nitrogen fixation effectiveness,
- compatibility with the host plant.

Moreover, given the knowledge on *nif* (nitrogen fixation) and *nod* (nodulation) genes in other systems, it could be speculated that studying these genes in bean-nodulating rhizobia will provide new insights into biological nitrogen fixation in beans. For that purpose, a concerted action with partners experienced in soil microbiology,



Figure 1 - Screening *Rhizobium* isolates for efficient nitrogen fixation on *Phaseolus vulgaris* at ambient temperature.

biochemistry, plant physiology and bacterial molecular genetics was proposed for financing to the European Commission.

## Material and methods

Unless otherwise stated, all experiments planned were conducted with *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca, a commercial bean variety, and *Leucaena leucocephala*. *Rhizobium* strains used in this study included laboratory collection strains (CNPAB, EMBRAPA) and field isolates.

Plant experiments were carried out either in plastic containers in a plant growth chamber, or in Leonard jars in greenhouses, or in the field. Inoculated plants were tested for acetylene reduction activity, plant dry weight, number and dry weight of nodules, light and transmission electron microscopy of nodules. Biochemical tests of rhizobia

involved electrophoretic analysis of proteins, membrane transport, labelling of proteins. Genetic analysis of rhizobia involved gene cloning, gene expression, DNA sequence analysis, construction of recombinant genes.

## Results

- Screening and identification of bean (*Phaseolus vulgaris*) nodulating rhizobia with a Nod<sup>+</sup>Fix<sup>+</sup> phenotype at elevated temperature

A collection of over 500 *Rhizobium* strains, isolated from nodules of *Leucaena leucocephala* and other leguminous trees, was tested for effective nodulation (Nod<sup>+</sup>Fix<sup>+</sup>) of bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Carioca). The screening was performed in two consecutive rounds. In the first round, strains were screened for nodulation (number and dry weight of nodules)



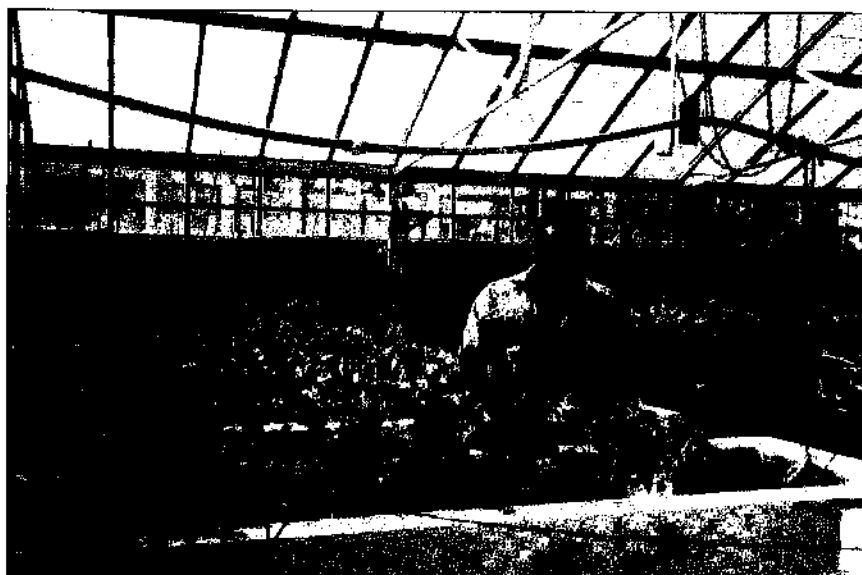


Figure 2 - Screening *Rhizobium* isolates for efficient nitrogen fixation on *Phaseolus vulgaris* at high temperature, using temperature-controlled watertanks.

and efficiency (acetylene reduction, total shoot dry weight) at fluctuating ambient temperature of the greenhouse. In the second round, the same experiments were performed at controlled elevated temperatures (38-40°C for 10 hours per day). Control experiments included controls without inoculation (with and without chemical N-fertilizer), inoculation with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (CNPAF 512), and strain CIAT899, previously identified as a heat-tolerant bean microsymbiont.

At ambient temperature most of the *L. leucocephala* isolates induced  $\text{Fix}^+$  nodules on beans. Some of these strains were superior to the control (laboratory) strains and even to the fertilized controls, in terms of shoot dry weight and acetylene reduction activity (ARA). At elevated temperature, only a few isolates (represented by F98.5; BR816; BR814) performed reproducibly better than the control strains and as well as the nitrogen control. These isolates, and a few intermediate strains, were retained for further studies at the molecular level and in field studies.

The collection of the *L. leucocephala* nodulating rhizobia, also able to nodulate *P. vulgaris*, was the basis to

propose a new *Rhizobium* species, *Rhizobium tropici*. At present, bean-nodulating rhizobia are classified in three species: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* and *R. tropici*. However it is important to note that many *Rhizobium* strains nodulating bean (e.g. BR816) cannot be classified in one of these three species, suggesting that the taxonomy of bean nodulating rhizobia is far more complex.

#### ■ Plant responses following inoculation of *Phaseolus vulgaris* with *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* or *R. tropici*

Significant differences exist in the growth and physiology of *Phaseolus vulgaris* subjected to «normal» and «high» root temperatures. However, the plants' reaction to temperature can be modified by inoculation with a heat-sensitive (CNPAF512) or a heat-tolerant *Rhizobium* strain (F98.5). Microscopical studies, comparing both type of nodules, indicate that the better performance of *R. tropici* inoculated plants may be explained by a thicker healthier cortex, thus allowing better control of gaseous diffusion into and out of the infected cells. This may also help in maintaining a healthy vascular system.

#### ■ Transport of C4-dicarboxylic acids in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. tropici*

C4-dicarboxylates (DCA) are essential substrates for supporting  $\text{N}_2$ -fixation in an active *Rhizobium*-legume symbiosis. DCA transport in both *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. tropici* is active and inducible. A common carrier system seems to be present for DCA and aspartate transport. Inhibition experiments suggest that free thiol groups are involved in the active site of the transport protein. However, a remarkable difference exists between *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. tropici* strains, regarding the role of divalent cations. EDTA inhibited succinate uptake in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. loti* and *Bradyrhizobium japonicum*. However, no EDTA effect was observed either in *R. tropici*, *R. meliloti* and *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Reconstitution assays in the presence of divalent cations showed that  $\text{Ca}^{2+}$  is the most effective, reconstituting EDTA inhibited transport in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

#### ■ Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains

In this study, we compared the effect of heat on symbiotic nitrogen fixation, cell survival, amino acid uptake and protein synthesis in a heat tolerant (CIAT899) and a heat sensitive (CNPAF512) bean nodulating *Rhizobium* strain. Acetylene reduction activity of nodulated roots excised from unstressed plants was strongly diminished at 35°C or 40°C, either when plants were nodulated by CIAT899 or CNPAF512. Survival at 40°C as well as the kinetics of L-( $^{35}\text{S}$ ) methionine uptake or protein synthesis at 35°C and 40°C indicated the higher tolerance of CIAT899 to thermal stress as compared to CNPAF512. The synthesis of heat shock proteins was detected in both strains although at a different temperature. Increased synthesis of 14 heat shock proteins in CNPAF512 and

of 6 heat shock proteins in CIAT899 was observed at 40°C and 45°C, respectively. A heat shock protein of approximately 21 kDa, of which the synthesis was strongest in both *Rhizobium* strains upon a temperature shift up was also observed in several other bean-nodulating rhizobia. Acquired thermotolerance in CIAT899 was shown to depend on protein synthesis.

There is no evidence that thermal stress induces genetic rearrangements, neither in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* nor in *R. tropici* strains, at least not in the *nif* region.

#### ■ Nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium tropici* strain CIAT899 and *Rhizobium* spp. BR816

The early steps of symbiotic nodule formation by *Rhizobium* on plants require coordinate expression of several *nod* gene operons, which is accomplished by the activating protein NodD and plant flavonoids that act as coinducer molecules. *R. tropici* CIAT899 contains five *nodD* alleles. Our study indicates that the *nodD* 1 allele contributes most to the NodD activity. Mutation of the NodD 1 of CIAT899 completely abolishes nodulation on *L. leucocephala* and severely reduces the nodulation of *P. vulgaris*. The four *nodD* alleles of *Rhizobium* sp. BR816, on the contrary, are all functional, but differences can be noticed when different host plants are tested. The *nodD*4 allele is unique in that it codes for a transcriptional regulator that can function in most common rhizobia, independently of a coinducer.

*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. etli* strains, also bean symbionts, are not able to form nodules on *Leucaena leucocephala*. Introduction of a recombinant plasmid, representing part of the pSym of *Rhizobium* sp. BR816, in the bean microsymbionts could extend their host range to *L. leucocephala*. The overall information carried on this plasmid is not known yet, but the presence of a *nodO* gene might explain the extension of the host range.

#### ■ Organization and regulation of nitrogen (*nif/fix*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*

Regulation of *nif/fix* gene expression, resulting in the synthesis of the nitrogenase, is a very complex process whereby a number of regulatory proteins act in a cascade mechanism.

These regulatory circuits have been studied in some free-living and symbiotic nitrogen-fixing bacteria, but almost nothing is known for bean-nodulating *Rhizobia*.

*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* strain CNPAF512 was chosen for such a study, because it shows relatively high nitrogenase activity in symbiosis with bean. Three *nifH* regions (two complete *nifHDK* operons and one *nifH* gene) were identified. All three copies were shown to possess a putative NifA-binding site. NifA is a key regulator in *nif/fix* gene expression. *nifA* is located downstream from a *fixABCX* transcriptional unit. Transcription of the *nifA* gene is subject to

a dual positive control. A first control mechanism is responsible for a basal level of *nifA* expression and occurs independently of the oxygen status of the cell. The second regulatory mechanism is NifA-dependent and accounts for an increased transcription of *nifA* under microaerobic growth.

Another element in the regulatory cascade is *fixLJ*, coding for a two-component (sensor/regulator) regulatory system. Surprisingly, *fixLJ* does not control expression of the *nifA* gene, but is required for the expression of the *nifII* genes. The *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* FixL does not contain an O<sub>2</sub>-binding domain, as was found for all other FixL proteins studied so far. This raises the question as to what the environmental signal for *nifH* gene expression might be in *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

#### ■ Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris*) cultures

First, *R. tropici*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. etli* strains, in combinations of two, were tested in monoxenic conditions for competitiveness of bean nodulation. All *R. tropici* strains used in these tests (F88.2; F92.5; CIAT899) were more competitive than the *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (CNPAF512) or *R. etli* (CFN42; W16.3SB) strains.

Subsequently, it was decided to perform a 3-year field experiment. Strains of *R. tropici*, CIAT899 and F98.5, and a *R. etli* strain, W16.3SB, were introduced into a field which had no history of bean culture. Plant dilution estimates showed that in the presence of its host (*P. vulgaris* cv. Carioca) during the cropping seasons and the subsequent fallow summer periods, the bean rhizobial populations increased from less than 30 to 10<sup>3</sup> per gram dry soil after 1 year and to 10<sup>4</sup> per gram soil after 2 years.

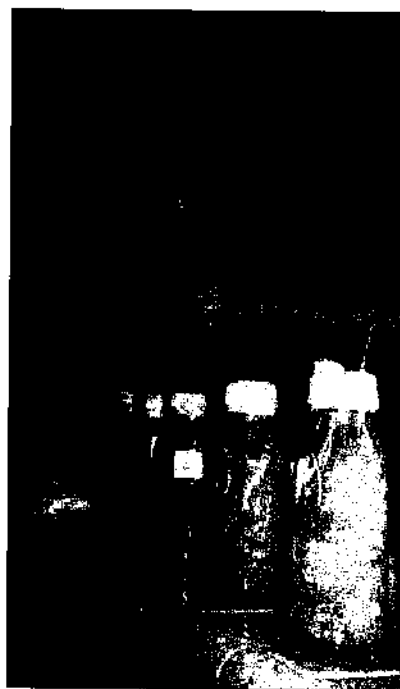


Figure 3 - Measuring nitrogen fixation of inoculated *Phaseolus vulgaris* plants, using acetylene reduction activity.

In the first-year crop, the inoculated strains occupied most of the nodules, which resulted in a higher nodulation and acetylene reduction activity. Without reinoculation at the second and third crop, however, little *R. tropici* was recovered from the nodules and the bean population consisted mainly of *R. etli* and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Reinoculation with the *R. tropici* strains before the second crop resulted in *R. tropici* occupying the main part of the nodules and a positive effect on nodulation and acetylene reduction activity, while a reintroduction of the inoculant strain in the third season did not have any effect anymore.

- Rhizobial inoculant using peat or oil as carriers for survival of *Rhizobium tropici* under water and heat stress

Rhizobial survival in the inoculant carrier depends, among many other factors, on the initial number of viable cells and storage conditions. After inoculation it will depend on environmental constraints, since high temperatures and/or water stress, for example, may significantly reduce rhizobial survival. Leguminous seeds are most commonly inoculated using a powdered peat-based inoculant as a carrier. However, chemical characteristics of the peat vary according to its origin. Problems are also detected on sterilization procedures, which are difficult or very expensive. In most cases peat sterilization is not done at all. An attempt was made to use oil-based inoculation to improve nodulation under water and temperature stress, using *R. tropici* strain CIAT899.

An experiment was conducted at field conditions, on sandy soil. Oil or peat-based inoculants and control without inoculation were combined with two conditions of humidity: irrigation of soil at planting or keeping the soil dry for 4 days of planting. Inoculant in oil was superior to peat for initial nodulation and final grain production.



Figure 4 - Field test of *Phaseolus vulgaris*, inoculated with heat tolerant *Rhizobium* isolates.

- Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) screening for tolerance to heat

A screening of bean cultures for heat tolerance, in symbiosis with previously selected *R. tropici* strains, was conducted, testing a total of 33 cultivars previously selected for drought tolerance at the Brazilian National Center of Research on Beans and Rice. This screening was included in the objectives of the original project since our experiments showed that, even using high amounts of nitrogen, when grown at 38°C, beans did show a decrease in development.

The experiments were planted in Leonard jars, as described for rhizobia selection, but plants were only grown at 38°C, with two treatments: supplied with nitrogen and inoculated with strain CIAT899, always including cultivar Carioca as a control.

For shoot dry weight, there was a significant effect of cultivars but many behaved similarly to the control. Some cultivars, when receiving mineral nitrogen, showed better development than cultivar Carioca, but showed opposite behaviour under symbiotic conditions. These results reflect the conditions of high nitrogen fertilizer generally used during bean breeding.

### Conclusions and any additional comments

Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) can be nodulated by a wide variety of *Rhizobium* strains. Some of the bean-nodulating *Rhizobium* species have a narrow host range, others like *R. tropici* have broad host range. The first level of host specificity is determined by *nodD*.

*R. tropici* strains, in particular CIAT899 and F98.5, can be considered as superior bean-nodulating strains, under conditions of heat stress. When used as bean inocula, they perform quite well (nodule occupancy, nitrogen fixation) under field conditions, provided that the indigenous rhizobial population, which at least in the field site used consists mainly of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* and *R. etli*, is below  $10^3$  per gram dry soil. Having selected bean-microsymbionts that are quite heat-tolerant, breeding programs for heat-tolerant bean cultivars under symbiotic conditions are feasible and should be considered. It is very likely that this will result in acceptable grain yields without fertilizer input. Engineering of *Rhizobium* strains, using *R. tropici* as start material, could lead to further increase of bean yields.

## Publications

- Martinez-Romero E., Segovia L., Mercante F.M., Franco A.A., Graham P. and Pardo M.A., 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Intern. J. of Systematic Bacteriology, 41(3), 417-426.
- Michiels J. and Vanderheyden J., 1993. Cloning and sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* *fixA* gene. Biochim. Biophys. Acta, 1144, 232-233.
- Michiels J., Vande Broek A. and Vanderheyden J., 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Rhizobium phaseoli* *recA* gene. Mol. Gen. Genet., 228(3), 486-490.
- Michiels J., d'Hooghe I., Verreth C. and Vanderheyden J., 1994. Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *nifA* gene, a positive regulator of *nif* expression. Arch. Microbiol., 161, 404-408.
- Michiels J., De Wilde P. and Vanderheyden J., 1993. Sequence of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *symM* gene. Nuc. Acids. Res., 21(16), 3893.
- Michiels J. and Vanderheyden J., 1994. Establishment and functioning of a nitrogen-fixing root nodule. World J. Microbiol. and Biotechnol., in press.
- Michiels J., Pelemans H., Vlassak K., Verreth C. and Vanderheyden J., 1994. Identification and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene that is important for nodulation competitiveness and shows structural homology to a *Rhizobium fredii* host-inducible gene. Mol. Plant-Microbe Interact., in press.
- van Rhijn P. and Vanderheyden J., 1994. The *Rhizobium*-legume symbiosis. Microbiol. Rev., in press.
- van Rhijn P., Desair J., Vlassak K. and Vanderheyden J., 1994. The different nodD protein of *Rhizobium* sp. BR816 differ in interaction with coinducers and in activity for nodulation of different host plants. Appl. Environ. Microbiol., in press.
- van Rhijn P., Desair J., Vlassak K. and Vanderheyden J., 1994. Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. Mol. Plant-Microbe Interact., in press.
- van Rhijn P.J.S., Feys B., Verreth C. and Vanderheyden J., 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* strains CIAT899 and BR816. J. Bacteriol., 175, 438-447.
- Van Soom C., Browaeys J., Verreth C. and Vanderheyden J., 1993. Identification and sequence analysis of four genes, *hupC*, *hupD*, *hupF* and *hupG*, downstream of the hydrogenase structural genes in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Mol. Biol., 234(2), 508-512.
- Van Soom C., Rumjanek N., Neves C. and Vanderheyden J., 1993. Hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*: Occurrence, genetics and effect of plant growth. World J. of Microbiol. Biotechnol., 9(6), 615-624.
- Van Soom C., Vanderheyden J. and Van Gool A., 1994. Characterization of *Bradyrhizobium japonicum* chromosomal genes involved in the regulation of *hup* gene expression in free-living conditions and in controlling hydrogenase activity. Graham P.J., Sadowsky M.J. and Vance C.P. (eds.), Symbiotic nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers, 147-152.
- Van Soom C., Verreth C., Sampaio M.J. and Vanderheyden J., 1993. Identification of a potential transcriptional regulator of the hydrogenase activity in free-living *Bradyrhizobium japonicum* strains. Mol. Gen. Genet., 239, 235-240.
- Vlassak K., Vanderheyden J. and Franco A.A., 1994. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. Biol. Fert. Soil, in press.
- Waelkens F., Voets T., Vlassak K., Vanderheyden J. and van Rhijn P., 1994. The *nodS* gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Lucaena leucocephala*. Mol. Plant-Microbe Interact., in press.

Contract number : **TS2-A-265**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Production of cassava cultivars with acyanogenic roots.***

Titre : *Production de variétés de manioc dont les racines sont dépourvues de cyanogènes.*

▼ PROJECT LEADER : Birger Lindberg Møller  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Royal Veterinary and Agricultural University,  
 Institution-hôte : Plant Biochemistry Laboratory, Department of Plant Biology.

▼ ADDRESS : Thorvaldsensvej 40,  
 Adresse : 1871 Frederiksberg C, Copenhagen, Denmark.

▼ TELEPHONE : +45-35-28 33 52

▼ FAX : +45-35-28 33 33

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :  
 - U.K. : University of Newcastle upon Tyne, Medical School, Department of Genetics, (Dr. M.A. Hugues).  
 - Thailand : Mahidol University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, (Prof. M. Chulavatnatol), Bangkok.

▼ KEY WORDS : cassava; cyanogenesis; biosynthesis of cyanogenic glucosides; degradation of cyanogenic glucosides; linamarase; oxynitrilase; updg glucosyltransferase; cytochrome pp450; enzymes; cdna; tissue culture; rflp mapping.  
 Mots clés : manioc; cyanogénèse; biosynthèse des glucosides cyanogéniques; dégradation des glucosides cyanogéniques; linamarase; oxynitrilase; glucosyltransférase updg; cytochrome pp450; enzyme; adnc; culture de tissu; cartographie du rflp.

▼ FINAL REPORT : 22p. English.  
 Rapport final :

# Production of cassava cultivars with acyanogenic roots

## Objective of the research

Cassava is a perennial, vegetatively propagated shrub and it is potentially one of the most efficient crops in terms of starch production, especially under suboptimal growth conditions. Cassava is however cyanogenic, that is hydrogen cyanide (HCN) is released from virtually all plant tissues when they are damaged. The release of HCN occurs following the hydrolysis of the cyanogenic glucoside linamarin by a  $\beta$ -glucosidase (linamarase) and an oxynitrilase. Medical studies have documented serious instances of cyanide toxicity in populations in a poor nutritional state, whose diets contain a large proportion of cassava products. The adverse effects are augmented under conditions where food shortage results in consumption of insufficiently processed cassava roots. The processing of cassava tubers results in an annual release of between 30,000 and 100,000 tons of cyanide into the atmosphere or rivers i.e. our environment. When processing is incomplete, part of the cyanide enters the human body directly.

The long-term aim of our research programme is to be able to understand, control and optimize the content of linamarin in cassava at the tissue level. We are taking into consideration the negative effect which the content of cyanogenic glucosides has with respect to the use of cassava as a safe stable food as well as the positive effect it may have to maintain a low and controlled content of cyanogenic glucosides in specific tissues of the cassava plant, if the cyanogenic glucoside content turns out to be of an advantage with respect to crop yield e.g. by improving the disease resistance of the cassava plant towards pests.

The content of cyanogenic glucosides in cassava thus constitutes an important environmental and nutritional problem at the same time as being an intellectually challenging problem of fundamental interest to our understanding of plant growth and development. In our research programme we have studied the biosynthesis and degradation of cyanogenic glucosides in cassava, sorghum and white clover using whole plants, tissue culture and *in vitro* systems.

## Material and methods

Seeds and stem cuttings of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) were obtained from CIAT, Cali, Columbia, or from IITA, Ibadan, Nigeria. *In vitro* systems were isolated as reported (3). Soluble as well as membrane bound proteins involved in biosynthesis and catabolism of cyanogenic glucosides were purified (1, 5, 18, 19). Isoforms of linamarase were isolated (1). cDNA cloning techniques used are described (13, 19). Linamarase was assayed (1, 5). Biosynthetic activity as catalyzed by the microsomal system was assayed (2, 10, 17). Difference spectroscopy was carried out (2). Non isotopic location of expression of linamarase in cassava was carried out (20).

## Results

**The membrane bound enzymes catalyzing the biosynthesis of cyanogenic glucosides :** combined use of the detergents CHAPS, Reduced Triton and Renex 690, has permitted solubilization of the microsomal enzyme system catalyzing the *in vitro* biosynthesis of cyanogenic glucosides in sorghum. By column chromatographic techniques, it has been possible to isolate the membrane

proteins NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, cytochrome b<sub>5</sub> and cytochrome b<sub>5</sub>-oxidoreductase.

A polyclonal antibody has been raised against the isolated NADP-cytochrome P450 oxidoreductase from sorghum. The antibody is specific and cross reacts with the reductase from cassava, maize, Jerusalem artichoke as well as from rape. Addition of the antibody to the microsomal enzyme system results in inhibition of the *in vitro* biosynthetic activity.

The involvement of at least two cytochrome P450's in the pathway has been demonstrated using inhibitor experiments. Details about the isolation procedures, characterization of the proteins and genes involved, will be disclosed after patenting. As soon as a suitable transformation system has been established, the full length clones obtained will be used in an attempt to control or block cyanogenic glucoside synthesis using anti-sense constructs. The development of a transformation system is given top priority at CIAT, Cali, Columbia, as well as at the Plant Biology Laboratory at The Salk Institute in La Jolla, USA. We are in close contact with these laboratories.

**The soluble UDPG-glucosyltransferase catalyzing the last step in the biosynthesis of cyanogenic glucosides :** the UDPG-glucosyltransferase which catalyzes the transfer of a glucosyl moiety to acetone cyanohydrin (and butanone cyanohydrin) to form linamarin (and lotaustralin) in cassava proved difficult to purify. Only partially purified enzyme from cassava leaves can be obtained. Loss of its activity during purification is the major problem that has not yet been solved. Using the partially purified UDPG-glucosyltransferase, three sub-

strate analogues were found to be strong inhibitors of the enzyme, namely 2-methylbutyraldehyde, isobutylamide and 2-methyl-2 butanol. These inhibitors are used in the tissue culture studies. Due to the lability of the UDPG-glucosyltransferase, further characterization of the enzyme has been carried out using the molecular approach outlined below. A different UDPG-glucosyltransferase activity has been detected in cassava leaves which can use fructose to accept a glucosyl moiety from UDPG to form sucrose. This sucrose synthase was much more stable and its purification is in progress. Cassava sucrose synthase may play a role in diverting UDPG from the synthesis of cyanogenic glucosides to the synthesis of sucrose for sweetness.

A major research effort has been devoted towards characterization of the putative cassava UDPG-glucosyltransferase cDNA clones identified in a cassava seedling cotyledon cDNA library using a heterologous UDPG-glucosyltransferase probe. Six different UDPG-glucosyltransferase genes (all of which contain the consensus UDPG-glucosyltransferase "PROSITE" signature) have been sequenced and their amino acid consequences deduced. In summary, these studies indicate that two of the clones designated pCGT4 and pCGT6 are likely candidates to represent the cyanogenic UDPG-glucosyltransferase gene.

Crosses were made in 1991 between white clover plants which were heterozygous at the *Ac* locus and plants which were homozygous for non-functional *ac* alleles. These crosses produced progeny which are segregating for the ability to produce cyanoglucosides. These plants have been used to test for the expression of cognate genes using the cassava UDPG-glucosyltransferase clones. This has not produced a clear picture

of the two clones (pCGT4 and pCGT6) not eliminated by cassava expression studies. pCGT4 gives an indication of higher signals in glucoside positive clover plants. However, due to the large number of different plant UDPG-glucosyltransferase genes and the inherent problems of using heterologous sequences in quantitative studies of related genes, this result is considered inconclusive.

**The soluble enzymes catalyzing the degradation of cyanogenic glucosides :** linamarase is the key enzyme involved in the degradation of cyanogenic glucosides in cassava. The gene for this enzyme has been cloned as cDNA. Three isoenzymes have been isolated in Bangkok and their partial amino acid sequence determined in Copenhagen. The protein sequence of the major isoenzyme matches the amino acid sequence deduced from the cDNA clone obtained in Newcastle. The two other isoenzymes show distinct differences in their sequence. The major isoenzyme was cleaved by a number of different treatments including hydroxylamin, formic acid, and cyanogen bromide treatment. The fragments produced were isolated and sequenced. Amino acid sequence data covering all five putative glycosylation sites deduced from the cDNA sequence were obtained and demonstrated that carbohydrate moieties are linked to all five sites. Chemical modifications of amino acid residues of the major isoenzyme of petiole linamarase were carried out to identify the nature of the active site of the enzyme. Linamarase from white clover has been crystallized and a study of this enzyme is in progress.

RFLP for sequences homologous to the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase gene is very high with a large number of bands (10) identified in many genotypes. There was no relationship between banding pattern and leaf enzyme level in a survey of 50 cassava landrace

cultivars. In view of the genomic complexity revealed by this analysis, the identification of a DNA sequence which will distinguish between the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase gene and other  $\beta$ -glucosidase genes in the genome is required for further analysis of genome organization.

**The effect of the environment on the expression of the identified genes :** the content of cyanogenic glucosides, linamarase, oxynitrilase, UDPG-glucosyltransferase and  $\beta$ -cyanoalanine synthase activity have been assayed in different organs of germinating cassava seedlings at different stages of development. mRNA has also been extracted from an equivalent set of seedlings. This material forms the basis of a continued analysis of the effect of environment on the production of the components of cyanogenesis.

**The expression of cyanogenesis in cassava tissue :** non-isotopic labelling of riboprobes has been used to demonstrate a remarkable cell specific localization of expression of the linamarase gene. The presence of high levels of linamarase in latex vessels has been confirmed with protein studies. Specific inhibitors of the biosynthesis of cyanogenic glucosides in cassava were applied to plantlets in tissue culture. Using petiole slices from tissue-cultured plantlets, several compounds were screened for inhibitory action on the linamarin biosynthesis from  $^{14}\text{C}$ -valine through the microsomal system and UDPG-glucosyltransferase. Two cytochrome P450 inhibitors, chlorpromazine and coumarin, were found to inhibit isotope incorporation into linamarin in petiole slices. Work continues to test these cytochrome P450 inhibitors as well as the UDPG-glucosyltransferase inhibitors mentioned above on the growth and cyanogenic glucoside content in cassava.

*Science publications  
resulting  
from work supported  
by the STD2 programme*

1. Essittikul T. and Chulavatnatol M., 1988. Characterization of cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Archives of Biochemistry and Biophysics, 266, 263-269.
2. Halkier B.A., Scheller H.V. and Møller B.L., 1989. The involvement of cytochrome P450 in the biosynthesis of cyanogenic glucosides. In : Cytochrome P-450 : Biochemistry and Biophysics (ed., I. Schuster), 154-157.
3. Halkier B.A. and Møller B.L., 1989. Biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involved, Plant Physiology, 90, 1552-1559.
4. Halkier B.A., Olsen C.-E. and Møller B.L., 1989. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. The (E)- and (Z)-isomers of p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime as intermediates in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Journal of Biological Chemistry, 264, 19487-19494.
5. Pócsi J., Kiss L., Hughes M.A. and Nanasi P., 1989. Kinetic investigation on the substrate specificity of the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) of white clover, Archives of Biochemistry and Biophysics, 272, 496-506.
6. Hughes M.A., Sharif A.L., Dunn M.A., Oxtoby E. and Pancoro A., 1990. Restriction fragment length polymorphism segregation analysis of the Li locus in *Trifolium repens* L., Plant Molecular Biology, 14, 407-414.
7. Hughes M.A., 1990. The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L., Heredity, 66, 105-115.
9. Møller B.L., Halkier B.A., Okkels S., Scheller H.V., Nielsen H.L., Olsen I. and Poulsen C., 1990. Perspektiver for udvikling af nye kulturplanter i jordbrugserhvervet, Forsknings rolle for landbrugers udvikling, Fordid, nutid, fremtid (eds. Nansen P., Rasmussen K. and Thomsen C.), DSR, Copenhagen, 149-179.
10. Halkier B.A. and Møller B.L., 1990. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench and the involvement of 1-aci-nitro-2- (p-hydroxyphenyl) ethane as an intermediate, Journal of Biological Chemistry, 265, 21114-21121.
11. Halkier B.A., Lykkesfeldt J. and Møller B.L., 1991. 2-Nitro-3- (p-hydroxyphenyl) propionate and aci-1-nitro-2- (p-hydroxyphenyl) ethane, two novel intermediates in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 88, 487-491.
12. Halkier B.A. and Møller B.L., 1991. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants, Involvement of cytochromes P450 in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Plant Physiology, 95, 10-17.
13. Oxtoby E., Dunn M.A., Pancoro A. and Hughes M.A., 1991. Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) from white clover, Plant Molecular Biology, 17, 207-219.
14. Møller B.L. and Poulton J., 1993. The biosynthesis of cyanogenic glucosides, Methods in Plant Biochemistry (eds. Dey P.M. and Harborne J.B.), Academic Press, Volume 9, 183-207.
15. Poulton J. and Møller B.L., 1993. The biosynthesis of glucosinolates, Methods in Plant Biochemistry (eds. Dey P.M. and Harborne J.B.), Academic Press, Volume 9, 209-237.
17. Koch B., Nielsen V.S., Halkier B.A., Olsen C.E. and Møller B.L., 1992. The biosynthesis of cyanogenic glucosides in seedlings of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Archives of Biochemistry and Biophysics, 292, 141-150.
18. Sibbesen O., Lykkesfeldt J., Koch B. and Møller B.L., 1992. Purification of the hydroxylating enzyme system involved in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450: Structure and Function, Biotechnological and Ecological Aspects (ed. Archakov A.I.), 324-326.
19. Hughes M.A., Brown K., Pancoro A., Murray B.S., Oxtoby E. and Hughes J., 1992. A molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Arch. Biochem. Biophys., 295, 273-279.
20. Pancoro A. and Hughes M.A., 1992. Non-isotopic localization of expression of the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) in leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), The Plant J., 2, 821-827.



I

AMELIORATION  
DES PRODUCTIONS AGRICOLES

IMPROVEMENT OF AGRICULTURAL  
PRODUCTS

PRODUCTION  
VEGETALE

---

*PLANT  
PRODUCTION*

Protection des cultures

Crop protection

Numéro de contrat : TS2-A-095  
Contract number :

▼ TITRE : ***Elaboration de stratégies de lutte efficace  
contre la cercosporiose noire, maladie très menaçante  
pour les bananiers et les productions vivrières de plantains.***

Title : *Development of efficient strategies for the control of the black leaf  
streak, a disease that threatens bananas and plantains.*

▼ CHEF DE PROJET : Xavier Mourichon  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique  
Host institution : pour le Développement, Département des Fruits et Agrumes,  
Laboratoire de Pathologie Végétale, (CIRAD-IRFA).

▼ ADRESSE : Rue du Général Clergerie 6,  
Address : 75116 Paris, France.

▼ TELEPHONE : +33-1-45 53 16 92

▼ FAX : +33-1-47 27 48 11 - Tx : 645992

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :  
- Cameroun : Centre Régional Bananiers et Plantains, (CRBP-IRA).  
- Costa Rica : CATIE.  
- France : Université P. et M. Curie, Laboratoire de Cytologie  
et de Morphogénèse Végétale.  
- Belgique : Laboratoire de Pathologie Végétale de la Faculté  
Agronomique de Gembloux.

▼ MOTS CLES : bananier; plantain; maladie des raies noires; mycosphaerella fijiensis;  
Key words : résistance; interaction hôte-pathogène.  
bananas; plantains; black leaf streak disease; mycosphaerella fijiensis;  
resistance; host-parasite interactions.

▼ RAPPORT FINAL : 71p. Français.  
Final report :

# Elaboration de stratégies de lutte efficace contre la cercosporiose noire, maladie très menaçante pour les bananiers et les productions vivrières de plantains

## Problématique et objectifs

Depuis 35 ans environ, les travaux de base menés dans divers pays ont permis d'étudier correctement la cercosporiose jaune, ou maladie de Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*), et de mettre au point des méthodes de lutte efficaces contre cette maladie.

Les travaux sur la cercosporiose noire, ou maladie des raies noires (*Mycosphaerella fijiensis*), ont débuté plus récemment. Nos informations sont encore très fragmentaires, et les nombreux résultats acquis sur *M. musicola*, bien qu'étant une base précieuse, sont très insuffisants pour lutter efficacement contre *M. fijiensis*.

Les dégâts enregistrés en Amérique Centrale sont très importants, se soldant par une diminution des rendements des plantains de plus de 50 % et par la quasi disparition des plantations villageoises. La reprise de la production n'est actuellement possible que dans des blocs de production industriels, ce qui modifie complètement les composantes socio-économiques de ces productions vivrières, au détriment du petit paysannat.

La lutte chimique, largement utilisée pour les bananeraies industrielles contre *M. musicola* (cercosporiose jaune) doit être adaptée pour lutter contre l'espèce *M. fijiensis* (cercosporiose noire). Elle s'avère toutefois très difficilement envisageable dans le cas des productions vivrières de plantains affectées seulement par *Mycosphaerella fijiensis*.

L'extension de cette espèce en Afrique (de l'Ouest, Centrale et de l'Est), en Amérique Latine et le Sud-Est Asiatique impliquaient d'élaborer rapidement des stratégies d'actions originales, visant à pouvoir maintenir et préserver les productions industrielles et vivrières actuelles de bananiers plantains face à cette grave composante parasitaire (solutions à court et moyen terme) et d'orienter les travaux d'amélioration génétique vers la production de génotypes résistants (solutions à plus long terme). Tels étaient les objectifs majeurs de ces recherches, soutenues par la communauté scientifique internationale, et conduites de façon concertée par deux partenaires situés dans deux zones géographiques différentes tant sur le plan écologique que socio-économique (Afrique et Amérique Centrale) et par trois laboratoires européens.

## Thématiques étudiées

Afin de répondre aux objectifs exposés précédemment, ce projet STD2 a été conçu autour de trois volets thématiques principaux :

- Etude de la diversité des populations pathogènes;
- Etude des interactions hôte-parasite et appui à l'amélioration génétique;
- Amélioration des stratégies de lutte.

## Résultats

Grâce à la contribution de la CCE-DG 12/STD, une action coordonnée de recherches sur la cercosporiose noire des bananiers et plantains, a été développée associant des laboratoires

européens, le CRBP/IRA au Cameroun et le CATIE au Costa Rica. Ce projet a bénéficié d'une large audience au travers d'une dynamique en réseau développée par l'INIBAP.

Les recherches conduites dans le cadre de ce projet reposaient pour l'essentiel sur trois thèmes dominants, l'étude des interactions hôte-parasite en relation très étroite avec le programme d'amélioration génétique des bananiers, l'étude de la diversité des populations pathogènes et l'étude des relations facteurs du climat-développement de la maladie (épidémiologie) comme base à une lutte plus raisonnée.

Les programmes d'amélioration des plantes pour la résistance aux maladies nécessitent, la plupart du temps, une bonne connaissance de la génétique des relations hôte-pathogène et du déterminisme génétique de la résistance. Ils sont, en général, conduits en tenant compte de la composante parasitaire.

Lorsque l'on consulte l'importante documentation sur les cercosporioses des bananiers, on est en mesure d'être surpris par le peu d'éléments concernant d'une part des domaines aussi essentiels que la biologie des interactions et les mécanismes de résistance, et d'autre part par tout ce qui est relatif à la diversité potentielle des populations pathogènes.

Pour analyser la résistance, il était impératif d'adopter une méthodologie permettant de révéler à la fois les aspects qualitatifs et quantitatifs des différents comportements des populations hôtes vis-à-vis de *M. fijiensis*.

Dans ce domaine, il faut reconnaître que ce n'est que depuis quelques années, et cela suite aux travaux conduits d'abord en Afrique centrale puis dans le cadre de ce projet au CRBP/Cameroun, que les méthodes d'évaluation de la maladie permettent d'apprécier plus finement la nature des réactions de l'hôte vis-à-vis d'une même pression d'inoculum. En effet, les travaux sur la sensibilité, conduits au Cameroun, permettent aujourd'hui de regrouper l'ensemble des variétés cultivées ou sauvages appartenant aux différents groupes génomiques en trois classes de comportement vis-à-vis de *M. fijiensis*. Deux types de résistance sont décrits et s'apparentent, soit à une résistance partielle (générale, horizontale) soit à une résistance totale qui se caractérise par un blocage naturel de la maladie à un stade précoce du développement des lésions (à ce jour ce type de résistance ne concerne que des bananiers à génome acuminata).

Parallèlement aux travaux conduits au CRBP/Cameroun, des études ont été menées au CIRAD/Montpellier, en collaboration avec l'Université Paris VI, dans le but d'acquiescer une meilleure connaissance des interactions. L'objectif étant de voir jusqu'à quel point les deux types de résistance vis-à-vis de *M. fijiensis*, observés dans la nature, étaient bien sous le contrôle de mécanismes distincts. Pour cela, les travaux ont été orientés vers l'étude des principaux aspects relatifs à la dynamique de l'infection et, plus particulièrement, ceux caractéristiques des premières phases du processus infectieux. L'étude du couple *Musa/Cercospora*, en conditions contrôlées, est aujourd'hui possible en utilisant un modèle expérimental, reposant sur la maîtrise de l'infection, mis au point depuis plusieurs années au CIRAD/Montpellier. Signalons que dans le cadre de ce projet ces techniques ont été développées avec succès au CATIE/Costa Rica. Ce modèle utilise 3 cultivars au stade plantule (post-vitro) représentatifs des niveaux de comportement observés dans la nature.



Figure 1 - Développement de la cercosporiose noire sur bananiers.

Une étude spatio-temporelle de l'infection, réalisée dans un premier temps, a servi de base pour une étude plus fine, au niveau structural et biochimique, de certains facteurs pouvant être impliqués dans la résistance à *M. fijiensis*. Ces travaux n'ont pas la prétention d'expliquer l'ensemble des mécanismes mis en jeu au cours des interactions étudiées. Plus simplement, ils ont permis d'illustrer la distinction entre les deux types de résistance :

#### ■ Résistance partielle (cas du cv. Fougamou)

La résistance partielle paraît être liée, pour une part, à la présence d'une composante cellulaire constitutive et plus précisément par la présence dans les tissus sains de cellules spécialisées au contenu vacuolaire très riche en polyphénols. Ces polyphénols une fois relargués dans les espaces intercellulaires au cours de l'infection pourraient, par leur forte affinité avec les parois fongiques, limiter l'extension des hyphes parasites dans les tissus parenchymateux.

Il apparaît toutefois clairement que cette composante préformée n'a pas de rôle déterminant lors des phases précoces de l'infection. Par contre, son rôle semble plus évident lors des stades plus

tardifs dans le développement de l'infection. Ces observations sont complémentaires de celles réalisées par la Faculté Agronomique de Gembloux/Belgique sur le rôle des toxines produites par *M. fijiensis*, dans la pathogénèse. En effet, ce partenaire a montré que ces médiateurs ne sont pas impliqués dans l'initiation de l'infection, ce qui, en outre, confirme le caractère biotrophe du parasite observé au cours de cette interaction compatible. Il est montré, par contre, que ces composés participent à l'extension des lésions. Des travaux vont être initiés pour analyser plus finement l'action conjointe de ces deux composantes : action des pathotoxines sur la perméabilité des membranes cellulaires (sensibilité à la toxine) et la décompartmentation accélérée des polyphénols (action directe sur le développement des hyphes mycéliens).

Ces hypothèses devront être confirmées avec une gamme beaucoup plus large de cultivars présentant différents niveaux de résistance partielle. Ces travaux devront nous indiquer quelle est la part de cette composante cellulaire dans la résistance partielle et par conséquent nous permettre d'une part d'estimer l'intérêt d'identifier un marqueur de la résistance utile aux programmes d'amélioration, et d'autre part d'évaluer la possibilité d'utiliser un médiateur toxique pour la sélection de la résistance partielle.

#### ■ Résistance totale (cas du cv. Yangambi)

Il apparaît clairement que la réaction d'incompatibilité observée dans ce cas, est liée à la capacité de l'hôte à apporter une réponse rapide à la pénétration du parasite en y engageant de nombreuses cellules. Ce type de réponse rapide suggère la mise en place d'un processus actif de défense caractérisé par une mort rapide et simultanée des cellules hôtes et du parasite, semblable aux réactions d'hypersensibilité décrites dans la littérature pour d'autres interactions hôte-parasite.



Figure 2 - Développement de la cercosporiose noire après inoculation expérimentale par *Cercospora fijiensis* de 3 cultivars de bananiers (plantules de 6 semaines, issues de culture *in vitro*) présentant différents niveaux de résistance.

Cette réaction de résistance totale a suscité, dès le début, un certain intérêt chez les sélectionneurs. En effet, il existe aujourd'hui non seulement d'autres cultivars présentant le même type de comportement, mais également des diploïdes fertiles utilisables dans les programmes d'hybridation.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet doivent inciter à une certaine prudence sur le choix des géniteurs dans ces programmes d'amélioration car on sait que, classiquement, le déterminisme génétique de ce type de réaction est généralement de nature mono ou oligogénique. Cet aspect est actuellement en cours d'étude : travaux conjoints CRBP/Cameroun CIRAD/Guadeloupe. Mais surtout, il est connu que ces réactions d'incompatibilité sont spécifiques sur le plan parasitaire et se traduisent généralement par des réactions différentielles hôte-parasite. Ce type de comportement a l'inconvénient d'être rapidement surmonté par certaines populations pathogènes en relation avec leur niveau de diversité. Une partie des recherches conduites dans le cadre de ce projet avait comme objectif de mieux comprendre la structure des populations pathogènes. En s'appuyant sur une méthodologie faisant appel

aux marqueurs moléculaires (RFLPs) bien adaptés aux études de populations, les travaux conduits au CIRAD/Montpellier ont permis de mettre en évidence un polymorphisme très important au sein d'isolats d'origines géographiques variées appartenant à l'espèce *M. fijiensis*. Cette diversité génétique est sans doute, pour une grande part, le résultat d'une sexualité importante observée dans la nature et surtout du caractère hétérothallique bien démontré chez cette espèce. Ces premiers résultats montrent l'intérêt de poursuivre ces travaux en relation avec l'étude de la diversité du pouvoir pathogène.

L'étude des composantes de la résistance à laquelle ce projet a contribué devrait permettre à terme de mieux gérer les stratégies d'amélioration génétique notamment en ce qui concerne la durabilité de la résistance. Nous pensons notamment à l'intérêt de la résistance partielle, durable, de nature polygénique, pour les productions vivrières d'autoconsommation (plantains).

Une part importante des recherches a également été conduite dans ce projet au CATIE/Costa Rica, et dévolue à la mise au point de techniques permettant

d'évaluer, voire de sélectionner, rapidement la résistance. Une telle sélection précoce pourra être envisagée grâce aux résultats obtenus dans le domaine de l'embryogénèse somatique et des cultures de cellules. De telles techniques non conventionnelles devraient à terme constituer des outils de sélection précieux en s'intégrant dans les schémas d'amélioration classique.

Le dernier thème de recherches conduit dans le cadre de projet avait pour vocation d'apporter des solutions plus rapides afin de préserver les productions actuelles de bananiers et plantains. Elles ont porté pour l'essentiel sur une meilleure connaissance des facteurs épidémiologiques de la maladie et plus particulièrement sur l'identification des principaux facteurs du milieu qui contrôlent le développement parasitaire. Ces recherches ont été conduites conjointement au Cameroun/CRBP et au Costa Rica/CATIE. Les résultats obtenus, bien que incomplets, indiquent quelques divergences sur l'importance respective de certaines composantes du climat et notamment l'hygrométrie et la pluviométrie (fréquence et quantité). Ces quelques résultats contradictoires vont prochainement être analysés plus finement afin d'en rechercher les raisons (liées au milieu, aux méthodologies, ...) et surtout afin de servir de base à une concertation plus étroite entre ces deux partenaires et générer de nouvelles orientations qui seront nécessaires à une amélioration des stratégies de lutte actuelles.

Compte tenu de ces résultats prometteurs et afin de maintenir l'effort déjà entrepris dans ces différents domaines, une nouvelle phase a été engagée dans le cadre de STD3, en étroite relation avec l'amélioration génétique.

Ce projet a permis de renforcer les relations entre institutions européennes et surtout entre ces dernières et des partenaires situés en zone de production.

Concernant la formation, un nombre non négligeable de stagiaires ont été mobilisés directement dans le cadre de ce projet et ces derniers ont naturellement été associés à la valorisation des résultats (publications, congrès). Quelques documents "mixtes" ont déjà été publiés, d'autres sont actuellement en cours de rédaction.

## Conclusions

Les travaux conduits dans le cadre de ce projet ont pour objectif final d'élaborer des stratégies d'actions originales, visant à pouvoir maintenir les productions industrielles et vivrières de bananiers face à l'importante menace parasitaire que constitue la maladie des raies noires causée par *Mycosphaerella fijiensis*.

### ■ Appui à l'amélioration génétique

- Des progrès importants ont été obtenus sur l'évaluation, pour la résistance, des bananiers sauvages et cultivés appartenant à différents groupes génomiques permettant d'apprécier plus finement la nature des réactions hôtes vis-à-vis d'une même pression parasitaire. Ces résultats doivent permettre aujourd'hui d'orienter judicieusement le choix des géniteurs dans les programmes d'hybridation;
- Des résultats prometteurs ont également été obtenus en vue d'une sélection précoce pour la résistance. Ils montrent que dans ce domaine les stratégies d'amélioration pourraient prochainement utiliser des méthodes de sélection efficaces, capables de différencier les génotypes résistants et sensibles;
- Utilisation de plantules issues des vitrométhodes. Ici les caractères recherchés vont se révéler au niveau de la plante entière (évolution et intensité des symptômes sous des conditions d'infections artificielles);
- Une sélection plus précoce est envisagée grâce aux résultats substantiels obtenus dans les do-

maines de l'embryogénèse somatique et de la culture de cellules;

- Utilisation de toxines : les résultats obtenus dans ce domaine démontrent le caractère de "déterminants secondaires" de ces composés, produits par le parasite, lors de l'infection. Leur utilisation comme agents de pression de sélection est toutefois envisageable dans le cadre d'un programme de sélection pour la résistance partielle;
- L'étude des interactions hôte-parasite en conditions contrôlées a permis d'identifier une composante cellulaire constitutive de la résistance partielle. La part de cette composante préformée doit être précisée afin d'évaluer l'intérêt d'utiliser un tel marqueur pour les programmes d'amélioration.

- Un inventaire de la diversité des populations pathogènes a été réalisé. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une diversité génétique très importante au sein même de l'espèce *Mycosphaerella fijiensis*.

Ces résultats montrent que les programmes d'amélioration génétique pour la résistance vis-à-vis de la maladie des raies noires ne peuvent plus être raisonnés sans tenir compte de la composante parasitaire.

### ■ Amélioration des stratégies de lutte actuelle

Les recherches conduites dans ce domaine ont pour vocation d'intervenir plus rapidement (solutions à court et moyen terme) pour préserver les productions actuelles. Elles ont porté essentiellement sur une meilleure connaissance des facteurs épidémiologiques de la maladie et notamment sur l'identification des composantes climatiques déterminantes dans le développement de la maladie. Les résultats obtenus serviront de base à une stratégie de lutte raisonnée respectueuse de l'environnement (réduction des pesticides).

## Publications et communications à des congrès

Beveraggi A. et Mourichon X., 1990. La maladie des raies noires des bananiers et plantains causée par *Mycosphaerella fijiensis*. Contribution à l'étude des interactions hôte-parasite. II<sup>e</sup> Congrès Société Française de Phytopathologie, Montpellier, novembre 90.

Carlier J. et Mourichon X., 1990. Polymorphisme de fragments de restriction (RFLP) chez les *Mycosphaerella* spp. pathogènes des bananiers et plantains. II<sup>e</sup> congrès Société Française de Phytopathologie, Montpellier, novembre 90.

Carlier J., Gonzalez De Leon D. et Mourichon X., 1992. Diversité génétique chez *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la maladie des Raies Noires. Intern. Symp. on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases, Montpellier CIRAD/INIBAP, septembre 1992.

Escalant J.V., 1990. Using tissue culture technique for production of new varieties of plantain and early screening against 'Black Sigatoka'. In "Proceedings Sigatoka leaf spot disease on bananas", Edt R.A. Fullerton and R. Stover, INIBAP, Montpellier, France.

Escalant J.V., Tapia A.C. et Sandoval J., 1991. Inducción de callos, suspensión de células y posibilidades de regeneración en *Musa* sp. previa presión de selección. In "Memorias del IX Congreso ACORBAT", Merida, Venezuela.

Escalant J.V., Sandoval J. et Villalobos V., 1991. Callogenesis, cell suspension and somatic embryogenesis regeneration in the genus *Musa*. In "Abstract, IV Conference of the International Plant Biotechnology Network, IPBNet", San José, Costa Rica.

Escalant J.V., 1992. La biotecnología en el mejoramiento del banano y del plátano. In "Actas del II Congreso Bananero", San José, Costa Rica.

Fouré E., 1989. Contribution to genetic control of banana and plantains Sigatoka leaf spot in Cameroon. Studies on varietal susceptibility. Early inoculation trials on plantlets produced by in vitro culture. Workshop on Sigatoka leaf spot diseases, San José, Costa Rica, INIBAP, mars 1989.

Fouré E., Mouliom Pefoura A. et Mourichon X., 1990. Étude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *M. fijiensis* Morelet au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétiques. Fruits, 45, 4, 339-345.

Fouré E., Moreau A. et Mouliom Pefoura A., 1990. Les cercosporioses des bananiers et des plantains en Afrique. Développement et répartition des différentes formes de cercosporiose. Résultats acquis et propositions de recherches. Musarama (en cours de publication).

Fouré E., 1992. Evaluation de la sensibilité à la cercosporiose noire de sept hybrides issus du programme d'amélioration génétique de la

- FHIA du Honduras. Workshop INIBAP, Buga Colombie, sept. 1992.
- Foure E., 1992. Sensibilité variétale des bananiers à *Mycosphaerella fijiensis* au Cameroun. Caractérisation des différents types de comportement observés et déterminisme génétique de la résistance. Symposium CI-RAD/IRFA. Montpellier, septembre 1992.
- Foure E., Moreau A. et Mouliom Pefoura A., 1992. Contribution à l'étude épidémiologique de la Cercosporiose noire au Cameroun. Fruits (sous presse).
- Lepoivre P. et Acuna C.P., 1989. Production of toxins by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and induction of antimicrobial compounds in banana : their relevance in breeding for resistance to black Sigatoka. Proceedings of an international workshop : "Sigatoka leaf spot diseases of bananas, San José, March 28-April, 1, p. 201207.
- Marroquin C., Paduscheck C., Escalant J.V. et Teisson C., 1991. Suspensiones de células y regeneración de plantas vía embriogénesis somática en *Musa acuminata* spp *burmanicoides* y *M. acuminata* spp *malaccensis*. In "Actas del X Congreso ACORBAT", Villahermosa, Mexico.
- Marroquin C., Paduscheck C., Escalant J.V. et Teisson C., 1992. Plant regeneration through cell suspension in *Musa* wild species. In "Proceeding, INIBAP Workshop of Biotechnology for Banana and Plantain Improvement", San José, Costa Rica.
- Marroquin C., Paduscheck C., Escalant J.V. et Teisson C., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspension in *Musa acuminata* spp *burmanicoides* and *Musa acuminata* spp *malaccensis*. Soumis à révision dans 'in vitro plant'.
- Marroquin C., Paduscheck C., Escalant J.V. et Teisson C., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata* spp *burmanicoides* and *Musa acuminata* spp *malaccensis*. In vitro Cellular and Developmental Biology, janvier 1993.
- Mouliom Pefoura A., 1989. Contribution à l'étude d'une interaction atypique entre *M. musicola* et les bananiers du sous-groupe plantain en zone d'altitude au Cameroun. DEA Paris VI.
- Mouliom Pefoura A. et Mourichon X., 1990. Développement de *Mycosphaerella musicola* (maladie de Sigatoka) et *M. fijiensis* (maladie des raies noires) sur bananiers et plantains. Etude du cas particulier des productions d'altitude. Fruits, (sous presse).
- Mourichon X., Beveraggi A. et Salle G., 1989. Preformed substances as potential protectants against *Mycosphaerella fijiensis* in banana leaves. Workshop on Sigatoka Leaf Spot Diseases, San Jose, Costa Rica, INIBAP mars 1989.
- Mourichon X. et Fullerton R.A., 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of Sigatoka Disease and Black Leaf Streak Disease in Bananas and Plantains. Fruits, 45, 3, 213218.
- Mourichon X., 1990. Les cercosporioses des bananiers et plantains. Programme de recherches à l'IRFA et Coopération Internationale. Fruits, numéro spécial bananiers.
- Mourichon X., Zapater M.F., Bivigou Y., 1990. Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis* (en préparation).
- Salle G., Pichard V. et Mourichon X., 1989. Cytological study of interaction between *Mycosphaerella fijiensis* and three cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. Workshop on Sigatoka leaf spot disease, San José, Costa Rica, INIBAP, mars 1989.
- Semal J. et Lepoivre P., 1990. Sélection de bananiers résistants à la cercosporiose et diagnostic du "Bunchy top". Journée Mondiale pour l'alimentation. KUL, Leuven, Belgique, 16 octobre 1990.
- Tapia A.C., Escalant J.V. et Arauz F., 1991. Distribución geográfica de *M. musicola* y *M. fijiensis* en Costa Rica. In "Actas del X Congreso ACORBAT", Villahermosa, Mexico.
- Tapia A.C., Sandoval J., Muller L., Escalant J.V. et Villalobos V., 1990. Estudio de la susceptibilidad a la sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* de plantas de *Musa* cv. 'Falso Cuerno' AAB micropropagadas. Turrialba, 40 (2) : 147151.
- Tapia A.C., Galindo J. et Escalant J.V., 1990. Estudio epidemiológico de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano en Costa Rica. In "Actas, reunión de la Sociedad Americana de Fitopatología división del Caribe. XXX Congreso Anual", Mayaguez, Puerto Rico.
- Tapia A.C., Escalant J.V. et Perez L., 1991. Adaptación del sistema de preaviso biológico para el manejo de la Sigatoka Negra en plátano en Costa Rica. In "Actas de la Reunión de La Sociedad de Fitopatología División del Caribe, XXXI Congreso Anual", San José, Costa Rica.

Contract number :  
 Numéro de contrat :

**TS2-A-124**

▼ TITLE : ***A study on host plant resistance in connection with the parasite weed Orobanche (broomrape).***

Titre : *Recherche sur la résistance de la plante-hôte en relation avec la plante-parasite Orobanche.*

▼ PROJECT LEADER : A.H. Pieterse  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Royal Tropical Institute, (KIT).  
 Institution-hôte :

▼ ADDRESS : Mauritskade 63,  
 Adresse : 1092 AD Amsterdam, The Netherlands.

▼ TELEPHONE : +31-20-568 83 07

▼ FAX : +31-20-568 84 44

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :

- Egypt : Field Crop Research Institute, Agricultural Research Centre, Giza.
- Egypt : University of Alexandria, Faculty of Agriculture, El-Shatby, Alexandria.
- Spain : Institute for Sustainable Agriculture, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Cordoba.
- Syria : International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, ICARDA, Aleppo.
- The Netherlands : Vrije Universiteit, VU, Department of Ecology and Ecotoxicology, Amsterdam.
- The Netherlands : Wageningen Agricultural University, Department of Plant Ecology and Soil Biology, Wageningen.

▼ KEY WORDS : parasitic weed; orobanche; integrated control; chemical control; cultural control; germination; ecology; egypt; spain.  
 Mots clés : *plante-parasite; orobanche; lutte intégrée; lutte chimique; lutte phytotechnique; germination; écologie; égypte; espagne.*

▼ FINAL REPORT : 414p. English.  
 Rapport final :

\* see also STD1 Publication, 1989; TSD-187 project, p. 130



# A study on host plant resistance in connection with the parasitic weed *Orobanche* (broomrape)

## Objective of the research

The objective of the present project was to contribute to the development of effective integrated means of control for the species *Orobanche crenata* and *O. cernua*.

## Materials and methods

### ■ General

The experiments were conducted in the field between 1988 and 1993 in Egypt, Spain and Syria, as well as under laboratory and greenhouse conditions in Amsterdam, Cordoba and Wageningen. As a thorough knowledge of the survival strategy is a prerequisite for an effective control programme, laboratory studies in Amsterdam and Cordoba, as well as field studies in Egypt, Syria and Spain were conducted on the ecology, in particular germination ecology, of *O. crenata*. In Spain population dynamics of *O. crenata* and *O. cernua* were also studied. In addition studies were conducted on the effect of ammonium fertilizer on *in vitro* germination of *O. crenata*, as well as on *O. crenata* infestation on faba bean in Syria. The effects of promising herbicides for *Orobanche* control were studied in Spain and Egypt. Interaction between newly developed, partly resistant lines of faba bean and *O. crenata* was studied in Egypt.

Integration of delayed sowing and herbicide application for the control of *O. crenata* as well as early sowing and herbicide application for the control of *O. cernua* were tested in Spain.

Furthermore in Cordoba, in order to identify biotypes, an isoenzyme analysis

was undertaken in *O. cernua*, by means of isoenzyme analysis.

Literature was reviewed regarding germination ecology of *Orobanche* (and the related parasitic weed *Striga*), and *Orobanche* control. The 3rd International Workshop on *Orobanche* was held from 8 to 12 November 1993 at the Royal Tropical Institute in Amsterdam.

### ■ Germination ecology

The time course of germination in *Orobanche crenata* was investigated at 8 different temperatures, ranging from 0 to 35°C. Three seedlots were compared, one from Egypt, half a year old and two from Syria, half a year and 6 years old. Lag time, germination rate and final germination percentage were estimated by fitting the data to a log-logistic distribution function.

The effects of conditioning temperature and length of the conditioning period on germination of seeds of the parasitic weed *Orobanche crenata* were investigated *in vitro*. Seed samples from Syria and Egypt, collected in various years, were compared.

*O. crenata* seeds, collected in Syria, Egypt and Spain, were buried in the field in Syria (all 3 seedlots) and Spain (only Spanish seeds), exhumed at regular intervals and tested for germination.

The effect of nitrogen, in the form of ammonium, nitrate and urea, on germination of *O. crenata* was investigated in a series of *in vitro* experiments.

The effect of pH during conditioning and during germination, *sensu stricto* (i.e. after addition of the germination

stimulant), on germination percentage and germ tube length of *O. crenata* seeds was investigated in two *in vitro* experiments. A buffer, containing 1mM barbituric acid, 1mM MES and 1mM barbital, and adjusted to pH 4, 5, 6, 7, 8 or 8.5, was used as incubation medium.

### ■ Biotype characterization

By means of polyacrylamide gelelectrophoresis the genetic diversity in field populations of *O. crenata* parasiting faba bean from various geographical areas in Southern Spain was studied as well as of *O. cernua* populations parasiting confectionery and oil sunflower from different areas in Southern Spain.

### ■ Population dynamics

Population dynamics of *O. crenata* in faba beans was studied in Alameda and Tomejil in Southern Spain. In addition, a survey was undertaken in July 1992 regarding the infestation level of *O. cernua* in oil sunflower cultivars in the provinces of Cordoba, Malaga and Sevilla.

### ■ Effect of ammonium fertilizer on *Orobanche* infestation

Three field studies were conducted, two in Northern Syria, in the 1989/1990 season and the 1990/1991 season, and a third in Egypt in the 1990/1991 season. The effect of ammonium and urea, in combination with nitrification inhibitors (N-serve or Didin) on *Orobanche crenata* infestation in faba bean and lentil was investigated (Fig. 1).

## ■ Effect of soil moisture on *Orobanche* infestation

The effect of soil moisture on *O. crenata* infestation in two cultivars of faba bean was studied in a field experiment in Giza, Egypt and in the greenhouse in Wageningen, The Netherlands. In the greenhouse, plants were grown in special boxes filled with soil, which were perforated so that the development of the root system could be studied in detail.

## ■ Effect of sowing date on *O. cernua* infestation

Field studies were conducted in 1988 and 1989 to determine the phenology and growth of broomrape in sunflower in relation to crop sowing dates.

## ■ Development of new herbicide treatments for *Orobanche* control

Twelve herbicides belonging to the imidazolinone, sulphonylurea, glyphosate-analogue and substituted amide families were tested in several locations in Southern Spain to determine their effectiveness for the control of *O. crenata* on faba bean.

In Egypt the herbicides glyphosate, imazethapyr and imazaquin were tested against *O. crenata* at the Giza and Bahtim Stations, as well as in farmers' fields in the Fayoum Governorate during the 1989/1990, 1990/1991 and 1992/1993 growth seasons, respectively. The herbicides were applied pre-emergence and post-emergence.

## ■ Interaction between *Orobanche* and partly resistant faba bean lines:

In Egypt, some newly derived lines of faba bean as well as Giza 402, all of which have shown a certain resistance against *O. crenata*, were tested in the field. For reasons of comparison, the susceptible cultivars Giza 3 and Reina Blanca were included in this test. Faba bean plants and *Orobanche* attach-

ments were regularly harvested and examined.

## ■ Integrated control

Field studies were conducted in Southern Spain to test the combined effect of herbicides, delayed and early sowing, and fertilizer treatment.

# Results and conclusions

## ■ Germination ecology

Final germination percentage was maximal within a narrow temperature range of 10-20 or 15-20°C, and decreased rapidly on either side of this optimum. At 0 and 35°C, no germination occurred. Lag time strongly increased with decreasing temperatures: at 25 and 30°C a lag time of one day or less was observed, whereas at 5°C lag time was approximately 20 days. Germination rate, expressed as the reciprocal of the time required to achieve 50 % of the final germination percentage, was highest between 25 and 30°C. The seedlots studied did not differ with regard to temperature dependence of lag time or germination rate. Concerning the final germination percentages, however, there was a slight difference: the 6 year old seeds from Syria were better capable of germinating at 5°C. Alternating temperatures of 25/15 and 10/5°C neither stimulated nor inhibited germination.

Optimum temperature for conditioning was 15 to 20°C for Syrian seeds and 20, or 15 to 20°C, for Egyptian seeds. At 20°C a conditioning period of 18 days was required for maximum germination. When conditioning at 20°C was prolonged beyond 7 weeks, germination decreased. This effect was more pronounced for Egyptian seeds than for Syrian seeds. Germination of Syrian seeds strongly declined after conditioning for more than 4 weeks at 15 or 10°C. A stepwise decrease in temperature during conditioning did not enhance this effect. Results of a tetrazolium test indicated that the seeds most probably did not die, but developed secondary dormancy.

When exposed directly for 7 days at 20°C to the synthetic germination stimulant GR24, seeds only germinated in autumn after the first rain and to a limited extent in the winter. When the seeds were conditioned for 10 days at 20°C prior to exposure to GR24, germination occurred during summer and autumn, but seeds were dormant in winter and early spring. The observed seasonal pattern in germinability, in relation to rainfall and soil temperature, was largely consistent with the results of *in vitro* experiments, investigating the effect of conditioning temperature and conditioning period on germination capacity and the development of secondary dormancy. Moisture and temperature can therefore be considered the major factors regulating induction of dormancy in buried *O. crenata* seeds.

During conditioning, ammonium sulphate (8 mM), in combination with the nitrification inhibitor N-serve, reduced the germination percentage from 46 to 26 %. A lower concentration (4 mM ammonium sulphate) or a different form of nitrogen (8 mM urea or 6 mM nitrate) did not inhibit germination. Germtube length was not affected by any of the nitrogenous compounds.

During the germination phase the effect of nitrogenous compounds was more pronounced.

Ammonium sulphate (4 mM) strongly inhibited germination, especially in combination with a nitrification inhibitor: germination was less than 5 %. Urea (8 mM) tended to reduce the germination percentage to a limited extent (from 58 to 40 %). When additionally an urease inhibitor was applied, the germination percentage was not affected. Urea reduced germtube length, irrespective of the presence of an urease inhibitor. Nitrate had no effect on germination percentage and germtube length. The inhibition of germination due to short term exposure of the seeds to ammonium was largely reversible and no increase in mortality could be detected. Between



Figure 1 - *Orobanche crenata* parasitizing faba bean.

pH 5 and 8.5, the effect of pH of the conditioning medium and germination medium on germination percentage was negligible. When the pH of the conditioning medium was 4, germination was reduced by about one fourth. At a pH of 4 during the germination phase, germination was strongly inhibited. Germtube length was not affected by pH during conditioning. However, germtube length increased with increasing pH of the germination medium, between pH 5 and 8.5. It was concluded that the effect of nitrogen application on *O. crenata* infestation in the field is not the result of a decrease in pH in the rhizosphere of the host.

#### ■ Biotype characterization

Regarding *O. crenata*, four genetic loci were interpretable and used for a population-genetic analysis of three populations. Levels of polymorphism were high in all populations. The inter-population variation was rather low indicating a slight level of genetic differentiation among populations. The estimates of the genetic distance  $D$  ( $= 0.025-0.053$ ) indicate that despite the short geographic distances there is a distinct genetic differentiation between the populations. In the populations of *O. cernua* tested, the isoenzyme patterns and its polymorphic index differed considerably.

#### ■ Population dynamics

In four faba bean fields near Cordoba (south-central Spain) *O. crenata* seed production was related to the height of the parasite and the severity of the infection. In those populations, an average individual broomrape plant of 35 cm height had 48 fertile capsules and produced about 217,000 seeds. The upper part of the broomrape inflorescence was more prolific than the lower part. On the other hand, early emergence broomrapes produced considerably more seeds than those emerging later. When several broomrapes parasitized the same crop plants, the individual production of seeds per broomrape plant decreased. However, the total seed production of *O. crenata* plants increased until a maximum was reached when a crop plant was parasitized by 12 to 13 broomrapes.

The infestation ( $n^\circ$  of emerged broomrapes/ $m^2$ ) ranged from 0.015 in 1982/83 to 28 in 1989/90 and from 0.013 in 1983/84 to 43 in 1989/90 in both locations, respectively. In the course of the study the seedbank in the soil varied from 0.67 to 12.5 seeds per g of soil in Alameda, and from 1.5 to 12.5 in Tornejil.

The *O. crenata* seedbank increased every year in the 20 cm depth arable layer until it reached approximately 4

million seeds ( $M$ ) $m^{-2}$ . Seed viability ranged between 53 % and 68 %, approximately half of the seeds remaining dormant. About  $3 \times 10^{-3}$  % of the seedbank became attached to the root system of the faba beans. Only 9 % of the attached broomrapes developed and emerged. Maximum *Orobanchaceae* seed production of a population of 53 emerged broomrapes/ $m^2$  was approximately 4  $M$  seeds  $m^{-2}$ . About 43 % of the seeds shed were not incorporated in the soil, most likely due to degradation, decomposition or dispersion.

When faba bean was cropped during successive seasons, the number of *O. crenata* plants increased from an average of 0.15 emerged plants to an average of 26 emerged plants  $m^{-2}$  (the maximum density was 40 to 45 emerged plant/ $m^2$ ). A highly significant relationship ( $P=0.001$ ) was found between the average population growth rate (PGR) and rainfall and soil temperatures between December and February, months of crop vegetative growth.

It appeared that *O. cernua* seeds were spread via sunflower achenes over large distances. *Orobanchaceae* was found in 46 % of the fields visited. Generally, the infestation level was relatively low. The average number of emerged broomrapes per sunflower plant was  $7 \times 10^{-3}$ . However, in about 10 % of the fields, infestation was relatively dense (4-6 emerged broomrapes per sunflower plant).

#### ■ Effect of ammonium fertilizer on *Orobanchaceae* infestation

A single application of 28 kg N/ha ammonium sulphate resulted in a reduction in the number of *O. crenata* shoots from 50 to 35 per  $m^2$ . After a twofold application (i.e. in total 56 kg N/ha) the reduction was somewhat higher, around 32 shoots per  $m^2$ . From soil samples it appeared that the applied ammonium did not penetrate beyond a depth of 5 cm in the first 11 days. Both nitrification inhibitors were to a certain extent effective in maintaining a higher

ammonium content in the soil. N-serve itself had no effect on *Orobanche* infestation, but in combination with ammonium sulphate it tended to annul the beneficial effect of ammonium sulphate. Since N-serve also had an adverse effect on the root system of the crop, the compound is not recommended for use in *Orobanche* control. Application of 20 kg/ha Didin in addition to ammonium sulphate had no significant effect on *Orobanche* infestation. However, the lowest number of *Orobanche* shoots was found in the treatments, where 28 kg N/ha ammonium sulphate was applied twice in combination with Didin.

During the following year, despite measures to improve distribution of the compounds over the upper 15 to 20 cm (50 mm irrigation in Syria; manual incorporation in the soil, followed by 10-20 mm irrigation, in Egypt) no significant effect of the application of ammonium sulphate (28, 56, 112 or 168 kg N/ha), alone or in combination with 20 or 30 kg/ha Didin, on broomrape infestation was observed. In Syria, soil samples showed that the applied ammonium remained in the upper 5 cm for at least 28 days, and probably 60 days, after sowing. The use of urea resulted in an increased ammonium content in the soil in the 0-5 cm layer, as well as in the 5-15 cm layer. When applied in combination with 20 kg/ha Didin the concentration remained relatively high for at least 28 days. However, although *O. crenata* tended to be slightly less abundant and the faba bean yield slightly increased in the urea treated plots, the differences were not significant ( $p > 0.05$ ). This was probably due to the extremely high level of infestation.

#### ■ Effect of soil moisture on *Orobanche* infestation

In contrast to previous reports dry weights and numbers of host and parasite were generally higher under moist than under dry conditions. During the entire growing period new roots were formed and young broom-

rapes established at various depths. Numbers of *O. crenata* and their position (depth) in the soil appeared to be related to the absolute values of dry weight, length and number of root tips of faba bean, as well as to the relative values (broomrape numbers per gram, per meter and per thousand root tips); usually the patterns of variation of both values were similar and the cumulative effects resulted in a substantial variation of broomrape numbers.

Differences between the tolerant (Giza 402) and the susceptible (Giza 2) cultivar were mainly related to variation of the relative values. Root weights were similar, but in Giza 402 roots seemed to grow deeper.

#### ■ Effect of sowing date on *O. cernua* infestation

Generally broomrape infections were much less at the first than at the second or third sunflower sowings, and caused fewer yield reductions. The duration of the broomrape emergence period increased when sowing date was delayed. Since sunflower yields were higher at earlier sowing dates, early sowing may be recommended for sunflower crops in broomrape infested areas under certain climatological conditions.

#### ■ Development of new herbicide treatments for *Orobanche* control

Generally, imazapyr applied pre-emergence at 25 g/ha was well tolerated by faba bean. The effect on *Orobanche* was rather poor and also depended on the type of soil. Applied post-emergence at single rates of 2.5-5.0 g/ha or as double applications of 2.5 g/ha at 2-weekly intervals, imazapyr provided good broomrape control without crop injury.

For the late planting/low yield cropping systems, when *O. crenata* infestations usually are low, crop pre-emergence treatments of imazethapyr at 75 to 100 g/ha and imazapyr at 12.5 to 25 g/ha resulted in efficient control

without damaging the crop. Imazaquin at about 80 g/ha and chlorsulfuron at about 6 g/ha applied pre-emergence were also active, but their performance was affected by soil conditions. Applied after crop emergence, imazethapyr at 40 g/ha and Mon-8000 at 60 g/ha gave similar results to the standard treatment of glyphosate at 60 g/ha. It was concluded that early planting/high yield cropping systems, which usually are heavily infested by *Orobanche*, require a combination of pre-emergence and post-emergence treatments.

Glyphosate effectively controlled *O. cernua* in sunflower. Doses of 60 g/ha<sup>-1</sup> were usually required to achieve effective broomrape control. Alternatively, two applications of 40 g/ha<sup>-1</sup> or three applications of 20 g/ha<sup>-1</sup>, 12 to 14 day-intervals were generally required to control 80 % of the broomrape. However, yields of treated sunflower plants were not higher than those of the untreated infested checks. This could be explained by the fact that glyphosate application to sunflower is to a certain extent phytotoxic.

Imazethapyr at 20 to 40 g/ha<sup>-1</sup>, imazapyr at 12.5 to 25 g/ha<sup>-1</sup> and chlorsulfuron at 4 to 6 g/ha<sup>-1</sup> controlled *O. cernua* efficiently without crop injury. Imazaquin at 20 to 40 g/ha<sup>-1</sup>, triasulfuron at 4 g/ha<sup>-1</sup>, CGA-136 at 3 g/ha<sup>-1</sup>, acetochlor at 4.4 kg/ha<sup>-1</sup> and metazachlor at 2 kg/ha<sup>-1</sup> were less efficient. Imazetabenz at 200 to 600 g/ha<sup>-1</sup> and metolachlor at 3.3 kg/ha<sup>-1</sup> were ineffective. Rainfall intensity after crop sowing considerably affects *O. cernua* control by means of a pre-emergence herbicide; high rainfall decreased the herbicide performance, probably due to enhanced degradation.

A pre-emergence treatment of Pursuit at 150 g/ha proved most effective for the control of *O. crenata* in Egypt. It was considered to be preferable to the recommended foliar post-emergence application of glyphosate at 64 or 34 g/ha combined with NPK treatments.

## ■ Interaction between *Orobanche* and partly resistant faba bean lines

The susceptible cultivars completely collapsed before the end of the growing season, whereas others, particularly line 402/294, remained alive until pod formation was completed. It appeared that fewer *Orobanche* spikes emerged on the new lines and on Giza 402. Evidence is given that this was not due to avoidance mechanisms, such as smaller root mass, a deeper root system or lack of germination stimulants. Numbers of *Orobanche* attachments per unit of lateral root length were found to be low. Hence, it could be concluded that these lines are partially resistant due to some defence mechanism in their roots. The few *Orobanche* plants attached grew very fast so that final *Orobanche* dry weight was similar in resistant and susceptible host plant. Further experiments, including broomrape free controls, are required to study whether some tolerance mechanism might be involved.

## ■ Integrated control

Imazethapyr at about 75 g/ha, imazapyr at 12 to 25 g/ha and chlor-sulfuron at 3 to 6 g/ha, all applied at crop pre-emergence, were very effective against *O. cernua* without causing crop toxicity.

Sowing dates considerably affected the interrelated crop/parasite infection evolutions and the efficacy of herbicidal treatments. In legumes, potential crop yield and parasite infections increased when the sowing date was fixed at an earlier time while the opposite occurred in sunflower. For broomrape control post-emergence applications of glyphosate at low rates were efficient in broad bean and lentil but not in other crops. Furthermore, imazethapyr and imazapyr could also be applied pre-emergence in legumes and sunflower and post-emergence only in broad bean and peas. The recommended herbicide treatments for broomrape control varied with the cropping systems and environmental conditions.

Broomrape control by means of glyphosate was enhanced when  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 3 % (w/v) or  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  at 4 % was added to the spraying solution. However, addition of these fertilizers also increased the phytotoxic effect of glyphosate on sunflower.

## ■ Literature reviews

Control of *Orobanche*, germination ecology of *Orobanche* and *Striga*, agronomic problems in Spain and Egypt were reviewed.

## ■ 3rd international Workshop on *Orobanche*

From 8 until 12 November 1993 the 3rd International Workshop on *Orobanche* was held at the Royal Tropical Institute in Amsterdam. The Workshop was attended by 102 participants from 20 different countries. Ninety papers were presented in the form of lectures and posters. These papers will be published in the proceedings of the Workshop.

## Publications

Al-Menoufi O.A., 1994. The *Orobanche* problem and management in Egypt. In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.) : Proceedings of the 3rd International Workshop on *Orobanche* held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

ter Borg S.J. and van Ast A., 1991. Soil moisture, root architecture and broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) infestation in faba bean (*Vicia faba* L.). In Wegmann K. and Musselman L.J. (eds.) : Progress in *Orobanche* Research, Proceedings of the (2nd) International Workshop on *Orobanche*, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany, 278-292.

ter Borg S.J., Willemsen A., Khalil S.A., Saber M.I., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1994. A comparative study on the interaction between the parasitic weed *Orobanche crenata* Forsk. and newly derived tolerant material of faba bean (*Vicia faba* L.) under field conditions in Egypt. Crop protection (in press).

Castejón-Muñoz M., Romero-Muñoz F. and García-Torres L., 1990. Control of broomrape (*Orobanche cernua*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) with glyphosate. Crop protection, 9, 332-336.

Castejón-Muñoz M., Romero-Muñoz F. and García-Torres L., 1991. *Orobanche cernua* seed dispersion and its incidence on sunflower in Andalusia (Southern Spain). In Wegmann K. and Musselman L.J. (eds.) : Progress

in *Orobanche* Research, Proceedings of the (2nd) International Workshop on *Orobanche*, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany, 257-277.

Castejón-Muñoz M., Romero-Muñoz F. and García-Torres L., 1991. *Orobanche cernua* seed dispersal through sunflower achenes. HELIA, 14, 51-54.

Castejón-Muñoz M., Romero-Muñoz F. and García-Torres L., 1993. Effect of planting date on broomrape (*Orobanche cernua* Loebl.) infections in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Weed Research, 33, 171-176.

Castejón-Muñoz M., Suso M.J., Romero-Muñoz F. and García-Torres L., 1991. Isoenzymatic study of broomrape (*Orobanche cernua* populations infesting sunflower (*Helianthus annuus*). In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.) : Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, CIMMYT, June 1991, 313-319.

García-Torres L., 1994. Progress in *Orobanche* control, an overview. In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.) : Proceedings of the 3rd International Workshop on *Orobanche* held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

García-Torres L. and López-Granados F., 1991. Control of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) in broad bean (*Vicia faba* L.) with imidazolinones and other herbicides. Weed Research, 31, 227-236.

García-Torres L. and López-Granados F., 1991. Progress on herbicide control of broomrape (*Orobanche* spp.) in legumes and sunflower (*Helianthus annuus* L.). In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.) : Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, CIMMYT, 306-309.

García-Torres L., Castejón-Muñoz M. and López-Granados F., 1992. Incidence, growth and herbicide control of broomrape (*O. cernua*) in sunflower in Spain : a review. In Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, held in Pisa, Italy, 166-171.

García-Torres L., Castejón-Muñoz M. and López-Granados F., 1994. The problem of *Orobanche* and its management in Spain (1994). In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.) : Proceedings of the 3rd International Workshop on *Orobanche* held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

García-Torres L., López-Granados F. and Saavedra M., 1991. New pre-emergence herbicides for broomrape (*O. crenata*) control in faba bean (*Vicia faba* L.). In Wegmann K. and Musselman L.J. (eds.) : Progress in *Orobanche* Research, Proceedings of the (2nd) International Workshop on *Orobanche*, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany, 200-208.

García-Torres L., López-Granados F. and Castejón-Muñoz M., 1993. New pre-emergence herbicides for the control of broomrape (*Orobanche cernua* Loebl.) in sunflower

(*Helianthus annuus* L.). Weed Research (in press).

van Hezewijk M.J., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1991. In Wegmann K. and Musselman L.J. (eds.): Progress in Orobanche Research, Proceedings of the (2nd) International Workshop on Orobanche, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany, 125-133.

van Hezewijk M.J., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1994. Effect of pH on germination of *Orobanche crenata* seeds. In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.): Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

van Hezewijk M.J., van Beem A.P., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1993. Germination of *Orobanche crenata* seeds, as influenced by conditioning temperature and period. Canadian Journal ..., 71, 786-792.

van Hezewijk M.J., Linke K.H., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1991. The effect of ammonium fertilizer in combination with nitrification inhibitors on *Orobanche crenata* infestation in faba bean. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.): Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, CIMMYT, 470-483.

van Hezewijk M.J., Linke K.H., López-Granados F., Al-Menoufi O.A., García-Torres L., Saxena M.C., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1994. Seasonal changes in germination response of buried seeds of *Orobanche crenata*. Weed Research (in press).

López-Granados F. and García-Torres L., 1991. Estimation of *Orobanche crenata* seed production. In Wegmann K. and Musselman L.J. (eds.): Progress in Orobanche Research, Proceedings of the (2nd) International Workshop on Orobanche, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany, 257-277.

López-Granados F. and García-Torres L., 1991. Eight years study on population evolu-

tion on *Orobanche crenata* Forsk. in *Vicia faba* L. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.): Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, CIMMYT, 352-355.

López-Granados F. and García-Torres L., 1993. Seed bank and other demographic parameters of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) populations in faba bean (*Vicia faba* L.). Weed Research, 33, 319-327.

López-Granados F. and García-Torres L., 1993. Population dynamics of crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in faba bean (*Vicia faba* L.). Weed Science, 44 (in print).

López-Granados F. and García-Torres L., 1994. Population dynamics of *Orobanche crenata* as affected by *Vicia faba* L. sowing date. In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.): Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

Pieterse A.H., 1991. The effect of nitrogen fertilizers on the germination of seeds of *Striga hermonthica* and *Orobanche crenata*. In Wegmann K. and Musselman L.J. (eds.): Progress in Orobanche Research, Proceedings of the (2nd) International Workshop on Orobanche, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany, 115-124.

Pieterse A.H. and Verkleij J.A.C., 1994. Germination ecology of *Striga* and *Orobanche* - an overview. In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.): Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

Pieterse A.H., García-Torres L., Al-Menoufi O.A., Linke K.H. and ter Borg S.J., 1994. Integrated control of the parasitic angiosperm *Orobanche* (broomrape). In Proceedings of the International Food Legume Conference, held in Cairo, Egypt, 12-16 April 1992 (in press).

Ramírez-Ortego R. and García-Torres L., 1993. Imazapyr for broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) control in broad bean (*Vicia faba* L.). FABIS Newsletter, 33-37.

Ramírez-Ortego R., López-Granados F. and García-Torres L., 1993. Enhancement effect of NPK to glyphosate for broomrape (*Orobanche crenata* Forsk.) control in broad bean (*Vicia faba* L.). FABIS Newsletter, 37-39.

Saber H., El-Hady M., Khalil S.A., El-Sherbeeney M.H. and Hassan M.W., 1994. New herbicides for *Orobanche* control in faba bean in Egypt. In Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg S.J. (eds.): Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche held in Amsterdam, The Netherlands, 8-12 November 1993 (in press).

Verkleij J.A.C., Koevoets P., López-Granados F., Egbers W.S., García-Torres L. and Pieterse A.H., 1991. Genetic variability in populations of *Orobanche crenata* from Spain. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.): Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, CIMMYT, 462-469.

## ■ Ph.D. Theses

Castejón-Muñoz M., 1989. Biología y control de *Orobanche crenata* en girasol. Doctorando: Universidad de Sevilla. Facultad de Ciencias Biológicas. Calificación: Apto "Cum Laude". Código Unesco 32105-15, 2417-18.

van Hezewijk M.J., 1994. Germination ecology of *Orobanche crenata* - implications for cultural control measures. Vrije Universiteit Amsterdam.

López-Granados F., 1991. Factores que afectan a la dinámica de las poblaciones y al banco de semillas en suelo de *Orobanche crenata* Forsk. en habas (*Vicia faba* L.). Universidad de Córdoba. Departamento de Agronomía. Calificación: Apto "Cum Laude". Código Unesco 2417-18.

Numéro de contrat : TS2-A-156  
Contract number :

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITRE :   | <b><i>Etude des relations Oryza sativa - Magnaporthe grisea et stratégie de sélection de variétés pourvues d'une résistance durable. *</i></b>   |
| Title :   | <i>Oryza sativa - Magnaporthe grisea relationships and breeding strategies for durable resistance.</i>   |
| ▼ CHEF DE PROJET :<br>Project leader :                  | J.L. Notteghem   |
| ▼ INSTITUTION-HOTE :<br>Host institution :              | Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Département Cultures Annuelles, CIRAD-CA.   |
| ▼ ADRESSE :<br>Address :                                | Avenue de la Belle Gabrielle 45bis,<br>94736 Nogent sur Marne Cedex, France.   |
| ▼ TELEPHONE :   | +33-1-43 94 43 00  |
| ▼ FAX :   | +33-1-43 94 44 91 - Tx : 264656 F  |
| ▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :<br>Associated Institutions : | - France : Université Paris Sud, Laboratoire de Cryptogamie.<br>- Brésil : Centro Nacional de Pesquisa, CNPAF/EMBRAPA.<br>- Côte d'Ivoire : Institut des Savanes, IDESSA.  |
| ▼ MOTS CLES :<br>Key words :                            | pyriculariose du riz; magnaporthe grisea; analyse de population; génétique de l'avirulence; riz pluvial; sélection récurrente; résistance durable.<br><i>rice blast; magnaporthe grisea; population analysis; avirulence genetics; upland rice; recurrent selection; durable resistance.</i> |
| ▼ RAPPORT FINAL :<br>Final report :                     | 272p. Français et anglais (différents articles en français et anglais).  |

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-242, p. 292

# Etude des relations *Oryza sativa* - *Magnaporthe grisea* et stratégie de sélection de variétés pourvues d'une résistance durable

## Objectif de la recherche

Ce projet a réuni quatre équipes qui étudient différents aspects de la plus importante maladie fongique du riz, la pyriculariose causée par *Magnaporthe grisea* Heb, anamorph *Pyricularia grisea* Cav. Pour deux équipes, celle de l'IDESSA en Côte d'Ivoire et celle du CNPAF au Brésil, l'objectif était d'innover en matière d'amélioration d'une résistance variétale durable à la pyriculariose. Les deux équipes françaises de l'Université d'Orsay et du CIRAD à Montpellier ont conduit des études de génétique de *M. grisea*, une analyse des populations et une étude du contrôle génétique de l'avirulence.

## Matériel et méthodes

La diversité génétique des populations de *M. grisea* a été conduite avec 75 isolats représentatifs des populations spécifiques des hôtes suivants : riz, blé, éleusine, digitale, mil, gingembre. Les marqueurs utilisés sont : les gènes de l'ARN ribosomique, le polymorphisme est analysé par étude des sites de restriction, comparaison de séquence de l'espaceur transcrit, mais aussi par analyse du polymorphisme de fragments d'ADN en copie unique, issus d'une banque génomique.

Une collection de plus de 1001 isolats provenant de 49 pays a été constituée au CIRAD à Montpellier. Les isolats monospores ont été testés pour leur type sexuel, leur fertilité et, pour certains d'entre eux, pour leur virulence. L'inoculation comparative d'isolats de référence et d'isolats

d'une localité sur des cultivars de référence et des cultivars de cette même localité permet une analyse de la résistance de ces cultivars. Cette méthode a été utilisée pour analyser les relations cultivars de riz - isolats de *M. grisea* du Burundi.

L'inoculation d'isolats de référence sur les descendants d'haplodiploïdes d'un croisement (IRAT 177 x Apura), a été réalisée dans le but d'identifier des gènes de résistance. Les croisements les plus fertiles entre isolats pathogènes du riz ont été réalisés. L'isolat GUY11 de type mat 1-2, femelle fertile, pathogène du riz, a été croisé avec 3 autres isolats de type sexuel mat 1-1, CD 128, ML 25 et JP4. L'avirulence des parents des croisements, leurs descendants et les descendants de test cross a été testée sur un grand nombre de cultivars.

La sélection récurrente est théoriquement efficace pour des caractères polygéniques comme la résistance partielle du riz à *M. grisea*. Elle a donc été utilisée à l'amélioration d'une population multiparentale (CNA-IRAT5) fondée avec 28 cultivars, dont une lignée d'IR36 possédant une stérilité male monogénique récessive utilisée pour réaliser les intercroisements. A partir de cette population, on sélectionne une sous-population compatible à un isolat choisi pour sa virulence (C169 en Côte d'Ivoire, ECJ5P88 au Brésil). Puis on compare l'efficacité de trois méthodes de sélection, une sélection massale pour la résistance foliaire en serre, une sélection massale pour les résistances foliaires et paniculaires au champ et une

sélection en S1 pour les deux types de résistance. La résistance est toujours testée avec l'isolat de référence virulent.

## Résultats

### ■ Analyse des populations de *M. grisea*

Les populations de *M. grisea* sont très polymorphes pour les marqueurs que nous avons utilisés et nous avons pu classer les 75 isolats de *M. grisea* étudiés en 7 haplotypes distincts (sites ADN<sub>r</sub>). Certains de ces haplotypes (2 et 5) ont été subdivisés en 2 sous-groupes à l'aide des marqueurs copies uniques et par la comparaison des séquences de leur ITS. Chaque haplotype (sites ADN<sub>r</sub> et copies uniques) correspond à des isolats provenant d'une seule plante hôte. L'espèce *M. grisea* est donc organisée en groupes génétiquement distincts caractérisés par une spécificité d'hôte particulière. L'analyse phylogénétique des séquences ITS 1 et ITS 2 montre que ces groupes sont divergés d'un ancêtre commun dans des directions différentes, pratiquement simultanément. Les groupes des isolats pathogènes du riz et du blé sont très homogènes, tandis que ceux isolés des éleusines et des mils sont constitués d'au moins deux phylums distincts. Cette dernière situation peut s'expliquer par l'apparition d'isolats capables d'attaquer le mil (ou l'éleusine) dans deux sous-populations de *M. grisea* très différentes. Pour l'ensemble de marqueurs utilisés, cette étude montre que les isolats pathogènes du riz forment un groupe très homogène et isolé génétiquement des autres isolats de *M.*



*grisea*. La diversité génétique de ce groupe est réduite et son évolution actuelle ne peut donc provenir que de l'apparition de mutations (pas de flux de gènes avec les autres isolats).

### ■ Analyse du déterminisme de l'avirulence

Même s'il a été possible d'obtenir le stade parfait par coinoculation de GUY11 et d'un autre isolat amélioré pour sa fertilité par rétrocroisement avec GUY11, la fertilité des isolats pathogènes du riz est faible ; c'est la principale limitation à l'analyse génétique de l'avirulence. Les meilleurs croisements entre GUY11, et chacun des autres isolats suivants ont néanmoins permis d'étudier l'avirulence de *M. grisea* vis-à-vis de 7 cultivars. Cette avirulence semble contrôlée par 4 gènes majeurs, la localisation de ces gènes est en cours. Pour un couple, le gène de résistance *Pita*<sup>2</sup> et le gène d'avirulence *Avr-Pita*<sup>2</sup>, nous avons pu établir l'existence d'une relation gène pour gène.

### ■ Analyse de la résistance

L'analyse conjuguée de ségrégations de descendants haplodiploïdes pour des caractéristiques de résistance et des marqueurs moléculaires est un moyen efficace de localiser et d'identifier des gènes de résistance majeurs. A partir du croisement IRAT177 x Apura, il a été possible d'identifier deux gènes de résistance dont un, *Pi(6)t*, a été localisé sur le chromosome 12 grâce à une collaboration avec le Dr Z.H. Yu (Cornell Univ.).

L'analyse comparative d'isolats et de cultivars sélectionnés au Burundi avec des isolats et des cultivars de référence a été démonstrative. En effet, il a été observé que la virulence de la population de *M. grisea* du Burundi est réduite et que la résistance de nombreux cultivars qui y sont sélectionnés est spécifique, elle sera donc rapidement surmontée. Des recommandations ont donc pu être adressées aux sélectionneurs de ce pays.

### ■ Sélection récurrente

En Côte d'Ivoire, les trois méthodes de sélection se sont montrées globalement efficaces. La méthode de sélection en S1 est plus précise mais moins de cycles sont possibles pendant la même durée. Une attention particulière a été apportée aux conditions de culture des populations de riz qui conditionnent l'expression de la résistance. Le diamètre de la tige paniculaire est un facteur de résistance qui a été pris en compte en plus des dimensions et nombre de lésions. Les conditions locales ont conduit à la définition d'un nouveau schéma de sélection plus efficace. 585 lignées prometteuses sont suivies en sélection généalogique pour l'obtention de cultivars lignées homozygotes améliorées pour la résistance partielle et pour leurs caractéristiques agronomiques.

Au Brésil, le matériel issu de la population CNA-IRAT5 a été utilisé pour une analyse de génétique quantitative. L'héritabilité au sens large et au sens strict a été évaluée, les progrès génétiques des lignées haplodiploïdes de S1, de populations améliorées par sélection massale ou de S1 ont été comparés. L'héritabilité de la résistance partielle est essentiellement additive. Des effets dominants ont été identifiés pour les résistances foliaires et paniculaires. L'épistasie est plus importante pour la résistance foliaire que pour la résistance paniculaire. La dimension et le nombre de lésions peuvent être utilisés pour sélectionner la résistance foliaire mais non la résistance paniculaire en plein champ. Ces informations sont utilisées pour poursuivre la sélection récurrente sur le matériel sélectionné à partir duquel des lignées en cours de fixation ont déjà été sélectionnées.

### Conclusions et commentaires

Les trois domaines de recherche abordés sont complémentaires pour l'amélioration d'une résistance partielle polygénique et ont permis de développer les réflexions utiles à

chacun. Pour la première fois, des méthodes de sélection récurrente ont été mises au point pour le riz. La "durabilité" de la résistance partielle obtenue dans ces programmes de sélection récurrente est bien meilleure que celle des résistances totales monogéniques autrefois recherchées. Cependant, cette durabilité mérite d'être évaluée face à la variabilité de *M. grisea*. On sait, suite aux travaux conduits dans le cadre de ce projet, que les populations de *M. grisea* sont spécifiques de chaque espèce hôte et qu'il n'y a probablement pas de flux géniques entre ces populations. Pour la population de *M. grisea* spécifique du riz, la variabilité de la pathogénie provient essentiellement de mutations. L'avirulence étant sous contrôle monogénique, elle peut être modifiée par des délétions, translocations ou des mutations par insertion. Par contre, le contrôle génétique de l'agressivité étant inconnu, il demeure difficile d'évaluer le risque de voir une résistance partielle surmontée par le parasite. Cependant, les progrès réalisés dans la maîtrise de l'évaluation des composantes quantitatives de la résistance, de la génétique formelle de *M. grisea*, et de la connaissance au niveau moléculaire du génome de ce parasite, sont importants. Les équipes impliquées dans ce projet espèrent à brève échéance une connaissance approfondie des gènes d'avirulence et des résultats sur le déterminisme génétique de l'agressivité.

### Publications

- Daboussi M.J., Gerlinger C., Bouvier J., Lebrun M.H., Brygoo Y., Djebali A., Blaiseau P.L., Cassan M. et Parisot D., 1989. Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. *Current genetics*, 15, 453-458.
- Prabhu A.S., Farias J.C. et Zimmerman F.J.P., 1989. Comparative yield loss estimates due to blast in some upland rice cultivars. *Fitopatologia Brasileira*, 14, 227-232.
- Silué D. et Notteghem J.L., 1990. Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants. *Mycological Research*, 94(8), 1151-1152.
- Lebrun M.H., Capy M.P., Garcia N., Dutertre M., Brygoo Y., Notteghem J.L. et Vales M., 1991. Biology and genetics of *Pyricularia oryzae* populations : current situation and development of RFLP markers. In *Rice Genetics 2* :

Proc. 2nd Int. Rice Symp., May 1990, IRRI press, Los Banos, Philippines, 836pp.

Silué D. et Notteghem J.L., 1991. Compatibilité et fertilité des souches de *Magnaporthe grisea*, agent de la Pyriculariose du riz. *Cryptogamie, Mycol.* 12(2), 87-95.

Filippi M.C., Veillet S. et Prabhu A.S., 1992. Evaluation of recurrent populations for partial resistance to blast in upland rice. *Fitopatologia Brasileira*, 17, 200-201.

Notteghem J.L. et Silué D., 1992. Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea*

populations pathogenic on rice. *Phytopathology*, 82, 4, 421-424.

Silué D. et Notteghem J.L., 1992. Identification of a cross between two compatible isolates of *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr and genetic analysis of avirulence/virulence of rice. *J. Phytopathology*, 135, 77-83.

Silué D., Notteghem J.L. et Chaume J., 1992. Etude de la résistance spécifique de *Oryza glaberrima* Steud. à la Pyriculariose du riz. *Agr. Trop.*, 46(2), 121-129.

Silué D., Notteghem J.L. et Tharreau D., 1992. Evidence of gene for gene relationship in the

couple *Magnaporthe grisea*-*Oryza Sativa*. *Phytopathology*, 82(5), 577-580.

Silué D., Tharreau D. et Notteghem J.L., 1992. Identification of *Magnaporthe grisea* avirulence genes to seven rice cultivars. *Phytopathology*, 82, 12, 1462-1467.

Yu Z.H., Mackill D.J., Bonnan J.M., McCouch S.R., Guiderdoni E., Notteghem J.L. et Tanksley S.D., 1993. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). Soumis à TAG.

Contract number : TS2-A-158  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Screening for resistance to nematodes and host-parasite studies of coffee in S. Tomé and Príncipe.***

Titre : *Sélection à la résistance aux nématodes et recherche sur les relations hôte-parasite du café à Sao Tomé et Príncipe.*

▼ PROJECT LEADER : Carlos José Rodrigues Junior, (1)  
 Chef de projet : Maria Susana Newton de Almeida Santos (2)

▼ HOST INSTITUTION : (1) Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, CIFC  
 Institution-hôte : Instituto de Investigação Científica Tropical,  
 (2) Universidade de Coimbra, Departamento de Zoologia.

▼ ADDRESS : (1) 2780 Oeiras, Portugal,  
 Adresse : (2) 3049 Coimbra Codex.

▼ TELEPHONE : (1) +39-1-442 33 23  
 (2) +39-34-729 30 31

▼ FAX : (1) Tx : 63698 EANP  
 (2) +39-268 11 - Tx : 52273 UNICOI P

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées:  
 - Italy : Istituto di Nematologia Agraria, Bari.  
 - Spain : Centro de Ciencias Medioambientales, Madrid.  
 - Portugal : Departamento de Fitopatologia, Estação Agronómica Nacional, Oeiras.  
 - Republica de S. Tomé and Príncipe : Estação Experimental Agronómica de Poto, S. Tomé.

▼ KEY WORDS : coffea spp.; nematodes; s. tome and principe; plant-nematode interactions; pathogenicity; resistance; susceptibility; hypersusceptibility.  
 Mots clés : *coffea spp.; nématode; s. tomé et principe; interaction plante-nématode; pathogénie; résistance; sensibilité; hyper-sensibilité.*

▼ FINAL REPORT : 63p. English.  
 Rapport final :

# Screening for resistance to nematodes and host-parasite studies of coffee in S. Tomé and Príncipe

## Objectives of the research

- To determine the species of parasite nematodes present in the coffee plantations in S. Tomé.
- To identify the biotypes of the root-knot nematodes encountered.
- To screen for resistance to the identified nematodes, the tetraploid interspecific hybrids of coffee which already display resistance to other diseases (rust, CBD) and possess good agronomical characters.
- To advise on the best resistant selections to be used in S. Tomé and Príncipe in order to rehabilitate coffee growing in the country.
- To improve the agricultural research ability of S. Tomé in coffee nematology and to improve the experimental and research ability of European laboratories for tropical regions.

## Material and methods

Surveys were made of plant-parasitic nematodes of coffee in the main growing areas of S. Tomé e Príncipe during the following periods : 15-22 September 1989, 25 June-3 July 1991 and 29 September-8 October 1992. Thirty-one soil and/or root samples were collected from the rhizosphere of the main growing coffee areas. Soil and root samples were processed by different methods (Fig. 1).

Egg masses collected from infected coffee roots were used to establish cultures of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Two populations

were maintained in the coffee plants brought from S. Tomé and Príncipe.

Free-living stages of plant-parasitic nematodes were selected, killed by heat, fixed in TAF and processed for mounting by Seinhorst's glycerol-ethanol method. Posterior cuticular patterns of *Meloidogyne* spp. were prepared. Some nematodes were also prepared and mounted in Spurr's resin and examined in the scanning electron microscope (SEM). The nematodes and the perineal patterns of *Meloidogyne* females were morphologically and/or morphometrically characterized using the light microscope and the Differential Interference Contrast system of Nomarsky. The computer program NEMAID was also used to evaluate that tool for the identification of *Helicotylenchus* species. North Carolina differential host tests were conducted to distinguish the races of the populations of *Meloidogyne* being present. *Meloidogyne* females were also extracted for biochemical studies. Electrophoresis and isoelectric focusing were carried out and females were characterized by their esterase and malate-dehydrogenase patterns using the Phastsystem.

Studies on pathogenic variation among species of root-knot nematodes were conducted in pots using two Portuguese populations of *Meloidogyne*, *M. hapla* and *M. javanica*, and two populations collected in S. Tomé and Príncipe, *M. javanica* and *M. megadora* and several coffee progenies. The degree of susceptibility or resistance was based on actual nematode reproduction in the host and damage to the plant.

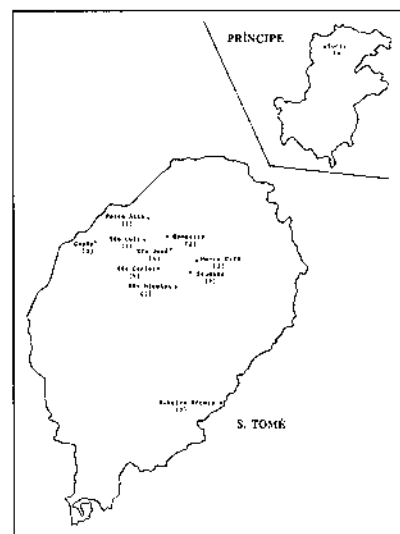
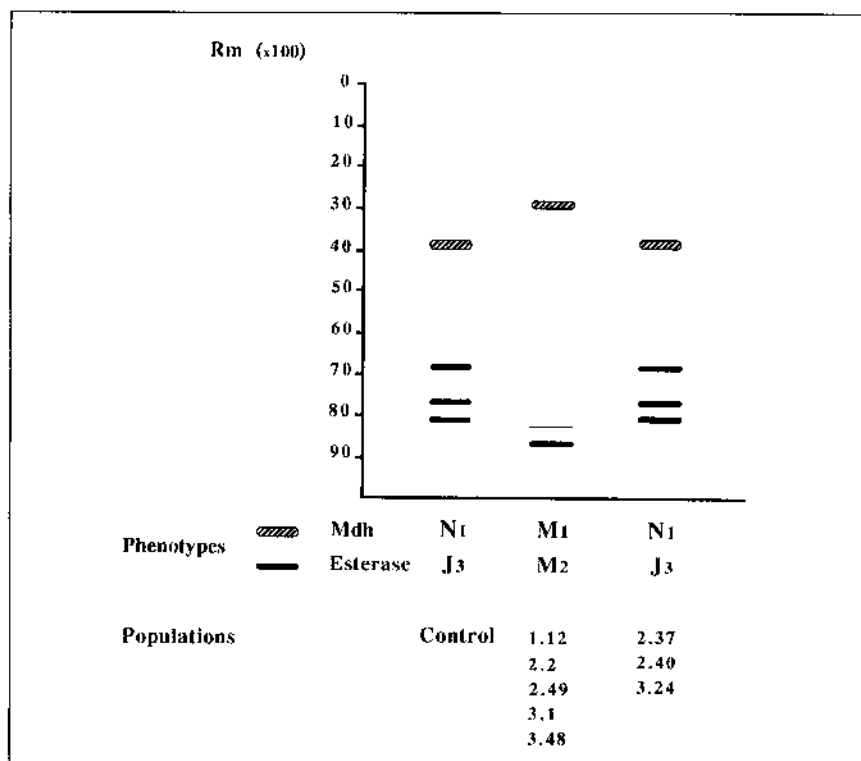


Figure 1 - Map of Republica de S. Tomé e Príncipe showing the number of samples taken and the localities of collection of soil and/or roots in coffee plantations.

Studies of pathogenic variation were also conducted using coffee root plants of *Coffea racemosa*, *C. arabica* cvs. Catimor, Caturra, Catuaí vermelho, Catuaí amarelo and *C. canephora* cv. Robusta, and *Meloidogyne megadora*.

Histological studies were made on field infected coffee root material and/or artificially inoculated coffee seedlings with four endoparasitic or semi-endoparasitic species identified before (*Meloidogyne megadora*, *Hoplolaimus pararobustus*, *Rotylenchulus reniformis* and *Trophotylenchulus obscurus*). Root segments were fixed in FAA, dehydrated in tertiary butyl alcohol series and embedded in 58°C melting point paraffin. Root sections 10-12 µm thick were stained with safranin and fast-green, mounted in Dammar balsam and examined with a compound microscope.



J=*M. javanica* phenotype, M=*M. megadora* phenotype, N=non-specific phenotype.

Figure 2 - Malate-dehydrogenase (Mdh) and esterase phenotypes observed in eight populations of *Meloidogyne* spp. following electrophoresis.

The relationship between initial population densities of two Italian root-knot nematode species, *M. incognita* and *M. javanica*, and growth of coffee seedlings was studied in a glasshouse experiment. The populations were reared separately on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Roma VF in a glasshouse at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . When large egg masses were formed, the roots were finely chopped and numbers of eggs and juveniles were estimated by processing ten samples with 1 % aqueous solution of sodium hypochlorite; then the roots were thoroughly mixed with 5 kg of sterilized sandy soil and used as inoculum. Ninety-six clay pots were each filled with 0.5 l of steam sterilized sandy soil (sand 88.1 %, silt 3.9 %, clay 7.0 % and organic matter 2.5 %). Appropriate amounts of the inoculum were mixed into the soil in each pot to give population densities of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 or 256 eggs and juveniles/cm<sup>3</sup> soil. Four pots of each inoculum level and nematode population were used. A single three-month-

old seedling of *Coffea arabica* "S. Tomé local variety" was transplanted in each pot. The pots were arranged in a randomized block design on a glasshouse bench at  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . Three months after transplanting, fresh weights of tops and roots were recorded. Nematodes in the roots were extracted by Coolen's method and counted. Data of total and top plant fresh weight were analyzed by Seinhorst's equation and root fresh weight and nematodes extracted from the roots were statistically analyzed and LSD's calculated.

## Results

In eight samples from different areas two species of root-knot nematodes were identified. Three populations were identified as *M. javanica* and possessed the morphological characters of the described species. All gave the J3 esterase and N1 malate dehydrogenase phenotypes using electrophoresis. The esterase phenotypes

obtained by isoelectric focussing revealed 6 electromorphs; a new designation, J6, is proposed. Results from the differential host tests were obtained only for one of the populations and revealed the occurrence of *M. javanica* race 2. In all the other samples the root-knot nematodes which were found resembled *M. megadora*. Most features of second-stage juveniles, females and males, were similar to those originally described for that species. Distinct esterase phenotypes were found using either electrophoresis or isoelectric focussing and are designated by M2 and M5, respectively. The malate dehydrogenase phenotype obtained by electrophoresis consisted of a single major band with an electrophoretic mobility of 28-30 %. According to the same authors, designation M1 is proposed. In three samples some egg masses protruding from the galls and some of the females were found to be parasitized by a fungus. Pure cultures of the fungus are being established. The fungus will be identified. *Pasteuria* sp., bacterial parasite, was detected in *Meloidogyne* juveniles, in two samples (Fig. 2-4).

Some other genera and/or species of nematodes have been found associated with coffee.

Studies on the pathogenic variation showed that only slight differences between *M. hapla* and *M. javanica* were found regarding the gall indices but no population increases occurred ( $R=0$  or  $< 1$ ) in any of the coffee plants. At the end of the experiment non-inoculated coffee and tomato plants were not infested so splashing of inoculum among pots did not occur. Inoculum ability was proved to be high since the reproduction factor of the nematode populations were high in all 'Rutgers' tomato plants. At the end of the experiments only few *M. hapla* young females, males and some juvenile stages infecting the roots were found. All stages seemed to have died as their internal contents had degenerated. *C. arabica* cv. Catuaí amarelo was successfully infected by the root-

knot nematode *M. megadora*. This nematode did not reproduce in the five progenies of Sarchimor. Root galling was induced in these plants. Galls contained few nematodes, mainly young females and males, that seemed to have died as their internal contents had degenerated.

Galls induced on coffee roots were variable in size and location. They were usually present on root tips but large spherical galls were also present along the root axis. Transverse sections of galls induced by the root-knot nematode, *M. megadora*, showed that the giant cells were formed around the anterior portion of the nematode and always in the vascular cylinder of the root. The histological modifications observed in coffee roots, caused by *M. megadora*, are similar to the patterns reported for other root-knot nematode species. *Rotylenchulus reniformis* and *Hoplolaimus pararobustus* induced the reactions already described in the literature (Fig. 5-6).

One paper about the relationship between initial population densities of root-knot nematode species and growth of coffee seedlings has already been published in *Nematologia Mediterranea* (1991), 19, 253-258.

## Conclusions and additional comments

### ■ Conclusions

Root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* are widely distributed throughout the country in nurseries and coffee plantations.

Besides *Meloidogyne*, *Trophotylenchulus* and *Helicotylenchus* were the most widespread nematodes in coffee plantations. *Rotylenchulus reniformis*, although found in only one sample, is a severe pathogen for several crops in tropical and subtropical regions.

Two species of root-knot nematodes, *M. javanica* and *M. megadora*, were found attacking coffee plants and this

is the first report of the two species from S. Tomé and Príncipe. *M. megadora* has been reported only from Angola and Uganda. The effects of *M. megadora* on coffee plantations seem more severe than those of *M. javanica*. New data on the morphology, morphometrics and biochemistry of *M. megadora* were obtained.

A very important source of root-knot dissemination and yield decrease is the occurrence of infected seedlings in nurseries and planting in the areas of old infested coffee plantations.

In S. Tomé and Príncipe, as nurseries are heavily infested with *M. megadora*, the method of cultivating coffee in the field, by using transplanted seedlings produced in nurseries, provides a very efficient dissemination of the nematode.

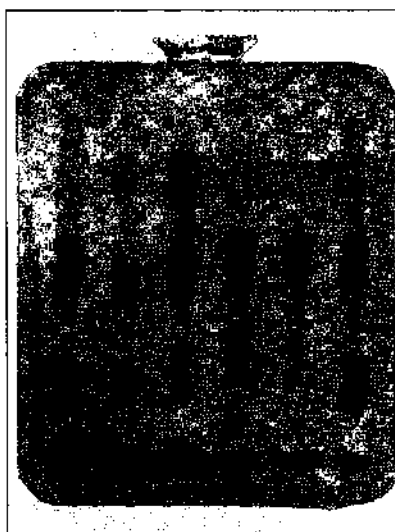
A root-knot nematode species, *Meloidogyne decalineata*, has been reported from coffee in S. Tomé and Príncipe. Our results indicate that this species does not occur in the region.

Two species of spiral nematodes (*Hoplolaimus dihystra* and *H. erythrinae*) were found associated with coffee. Little is known of their biology and their effects on plant growth should be evaluated.

Many of the nematode species isolated from coffee roots and adjacent soil have additional host plants in the same or in other agricultural areas (e.g. *Hoplolaimus pararobustus* on banana *Musa* sp.). This fact must be taken into account in any phytosanitary control programmes.

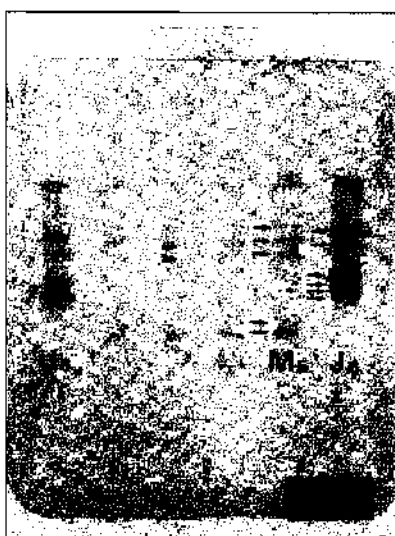
New morphological and morphometrical characteristics for some of the nematode species found were obtained by light and scanning electron microscopy.

Research work is needed to evaluate the potential of the fungus and the bacteria, *Pasteuria* sp., in reducing nematode populations.



J=*M. javanica* phenotype,  
M=*M. megadora* phenotype.

Figure 3 - Photograph of a polyacrylamide gel (Phastsystem) showing the malate dehydrogenase (Mdh) and esterase phenotypes following electrophoresis of crude homogenates from single females of two of the eight populations of *Meloidogyne* spp.



J=*M. javanica* phenotype,  
M=*M. megadora* phenotype.

Figure 4 - Photograph of a polyacrylamide gel (Phastsystem) showing the esterase phenotypes following isoelectric focusing of crude homogenates from single females of the two populations of *Meloidogyne* spp.

Glasshouse experiments led to the conclusion that *M. javanica* did not reproduce in all progenies tested. *M. hapla* failed to reproduce in nine progenies but reproduced poorly in three, with a reproduction factor  $<1.0$ . However six progenies (*C. arabica* cv. Catuaí vermelho 8223, Sarchimor 15287, Catimor 16037, *C. arabica* cv. Caturra 1637/10-261, Icatur 15683 and *C. arabica* cv. Caturra x Catimor 16058) were hypersusceptible.

Glasshouse experiments studies led to the conclusion that *M. megadora*, the root-knot nematode more widely spread in S. Tomé and Príncipe, did not reproduce in five progenies of the Sarchimor coffee plants tested. However two (Sarchimor 16718 and 16722) were hypersusceptible.

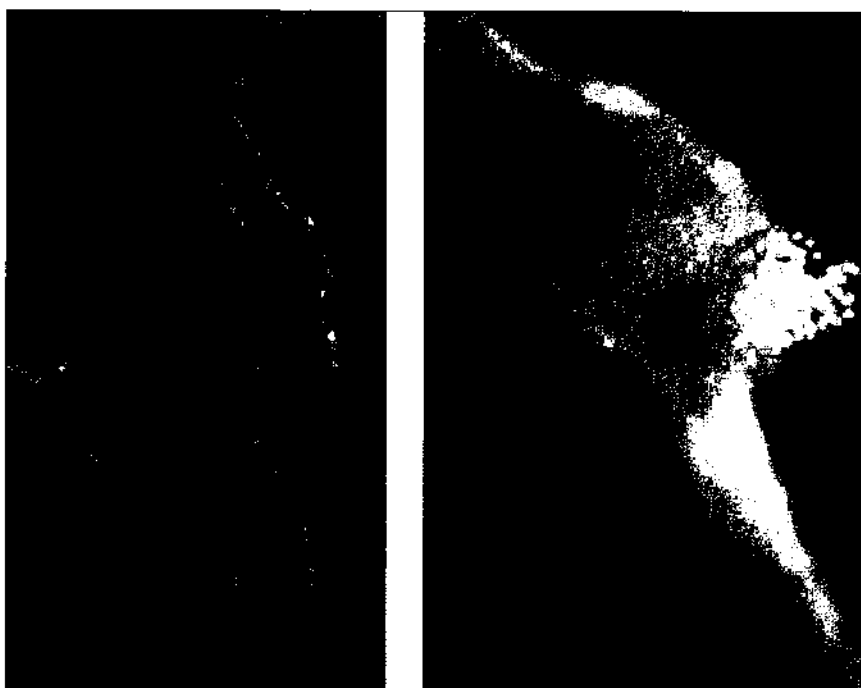
Glasshouse experiments led to the conclusion that *C. arabica* cv. Catuaí amarelo 16919 is susceptible to *M. megadora*.

Coffee response to nematodes should be measured using nematode reproduction and damage caused by the nematode. Non-hosts may suffer significant damage.

The magnitude of the observed reactions among coffee progenies indicate that screening and selection of plants for root-knot resistance is possible.

In Monte Café, S. Tomé and Príncipe, a very special effort is being made to develop coffee as a main crop. Resistant progenies should therefore be tried; specific attention should be paid to nurseries to avoid nematode dissemination.

The root-knot nematode *M. megadora* is becoming widespread in S. Tomé and Príncipe. This species may now be or may become a serious pathogen of other plants, because some of the coffee plantations are being changed to other crops and serve as possible hosts. Accordingly, it is now an urgent necessity to establish the host range of the species.



A. Coffee roots heavily galled.

B. Coffee root gall with egg mass protruding from the root surface.

Figure 5 - Coffee roots parasitized by the root-knot nematode, *Meloidogyne megadora*.

#### ■ Additional comments

It was not possible to obtain good results by using coffee root explants growing *in vitro* to test their resistance to root-knot nematodes. A suitable medium for growing coffee root explants is being investigated. Coffee root explants growing *in vitro* may prove to be useful to study the development of, and host response to, *Meloidogyne*.

Information about the biology, ecology and hosts of *M. megadora* is lacking. First of all research work was done to gain information about a suitable host to maintain and increase the population in order to obtain inoculum for the experiments. Several vegetables (cultivars of bean, carrot and tomato) were tested. Bean, *Phaseolus vulgaris* "Vermelho Mocho" was susceptible to *M. megadora* and was used to culture the nematode.

Glasshouse experiments are being conducted with the following objectives : to gain information about the influence of various vegetables com-

monly grown in S. Tomé and Príncipe on the multiplication of *M. megadora*; to assess the host status and relative resistance of the plants; and to compare the development of the nematode in the plants. This work will be part of a M. Sc. dissertation to be submitted by Ana Maria Santos Figueiredo Almeida to the University of Coimbra, Portugal.

Experiments are being conducted with the following objectives : to clarify the host-parasite relationship of taro (*Colocasia* spp.) and tannia (*Xanthosoma* spp.), called "matabala" in S. Tomé and Príncipe, and used as staple food or as subsistence crop, and *Meloidogyne* spp.; and to evaluate the effects of "matabala" extracts on the nematode. This work will be part of a M. Sc. dissertation to be submitted by Cristina Isabel Cabral Galhano to the University of Coimbra, Portugal.

Experiments are being conducted to evaluate the influence of temperature on *Meloidogyne megadora* egg hatch.

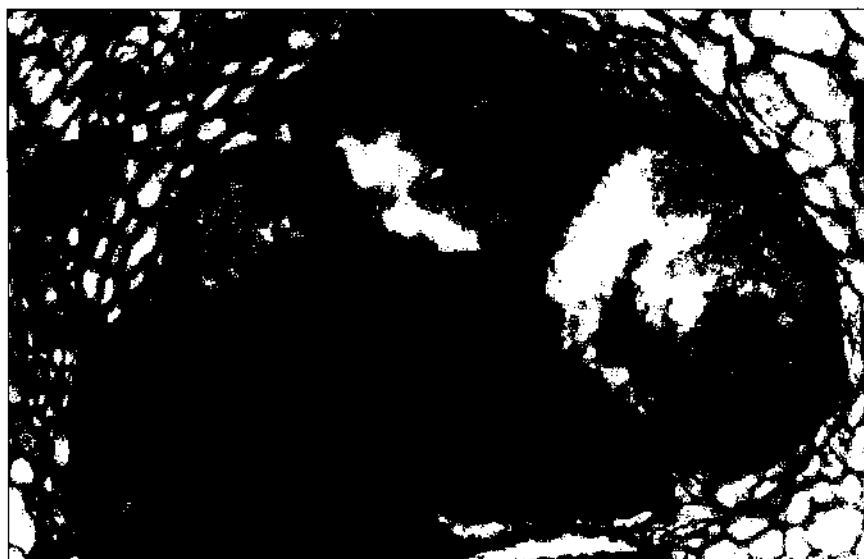


Figure 6 - Cross section of coffee root showing anatomical changes induced by *Meloidogyne megadora*. Note the stelar disorder caused by the giant cells expansion.

During the surveys carried out in S. Tomé and Príncipe, soil and/or root samples were collected in several fields and natural environments. The objectives of this work are as follows : to examine the distribution, frequency and relative importance of nematode populations. Species of nematodes are being identified.

Plant-parasitic nematodes which are found in association with several weeds increase the likelihood of the populations surviving between crops and subsequent infestation of them.

Soil samples and plant material that were examined for plant-parasitic nematodes frequently contained many nematodes that are not plant parasites or whose feeding habitats are imperfectly known. The most common found were the omnivorous Dorylaimids. Future investigations on the biodiversity of these nematodes can prove useful in indicating the degree of soil and environmental conservation.

Research group meetings and other meetings : During the research group meetings progress on the project was reviewed and future plans were discussed. Meetings were held in S. Tomé, S. Tomé and Príncipe (1991 and 1992), Madrid, Spain (1991), Bari, Italy (1992) and Coimbra, Portugal (1993). Other meetings took place with Director of Estação Experimental Agronómica de Potó, S. Tomé, the Minister of Economic and Financial Affairs of S. Tomé and Príncipe, the EC Counsellor in S. Tomé and Príncipe, Mr. B.N. Crumbie and with the World Bank representative in S. Tomé and Príncipe, Eng. A. Alves Viera.

Training : Mr. Pedro Joaquim, Eng. Severino Neto do Espírito Santo and Mr. Bernardino Zola held EC grants for training at Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra, Portugal. A Nematology Lab, having the main equipment for nematode and plant analyses, has been organized in Estação Experimental Agronómica de Potó, S. Tomé. The Nematology Labs

in Italy, Portugal and Spain have improved their knowledge about nematology in tropical regions. M. Susana N. de A. Santos has been invited to participate in a round table about *Nematodes of coffee* held during the XVII Brazilian Congress of Nematology, UNESP, Jaboticabal, 8-12 February, 1993. She gave a lecture about : *Root-knot nematodes in coffee plants : identification of Meloidogyne species and races*. C.J. Rodrigues Júnior and M. Susana N. de A. Santos had the pleasure of being invited to the "Jornadas sobre a Agricultura de S. Tomé e Príncipe" (1<sup>st</sup> Symposium on Agriculture in S. Tomé e Príncipe) which will be held in Lisbon, Portugal, 9-10 December, 1993, and give a lecture on : *Nematodes of coffee in S. Tomé and Príncipe*.

## Publications

Santos M.S.N. de A., Rodrigues A.C.F. de O. and Abrantes K.M. de O., 1990. Response of coffee plant cultivars to *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica*, 36, 389.

Vovlas V. and Lamberti F., 1990. Histological alterations induced by *Rotylenchulus reniformis* on *Coffea arabica* roots. *Nematologia mediterranea* 18, 77-81.

Vovlas N. and Di Vito M., 1991. Effect of root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on the growth of coffee (*Coffea arabica* L.) in pots. *Nematologia mediterranea*, 19, 253-258.

Rodrigues A.C.F. de O. and Abrantes I.M. de O., 1992. Differentiation of *Meloidogyne* species by means of isoelectric focusing. *Nematologica*, 38, 432.

Santos M.S.N. de A., Abrantes I.M. de O. and Rodrigues A.C.F. de O., 1992. Response of coffee plant progenies to *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica*, 38, 433.

Santos M.S.N. de A., Abrantes I.M. de O., Rodrigues A.C.F. de O. Espírito Santo S.N. and Joaquim P., 1992. Root-knot nematodes in coffee in S. Tomé and Príncipe. *Nematologica*, 38, 434.

Trindade Z.M.C. de A., Conceição I.L.P.M. da. Santos M.S.N. de A. and Abrantes I.M. de O., 1992. Isoelectric focusing of soluble proteins of *Heterodera* populations. *Nematologica*, 38, 439.



Contract number : **TS2-A-236**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Studies on the biology and ecology of the parasitic weed  
 Striga in connection with integrated control schemes. \****

Titre : *Recherche sur la biologie et l'écologie de la plante parasite Striga  
 dans le cadre d'une lutte intégrée.*

▼ PROJECT LEADER : A.H. Pieterse  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Royal Tropical Institute, (KIT).  
 Institution-hôte :

▼ ADDRESS : Mauritskade 63,  
 Adresse : 1092 AD Amsterdam, The Netherlands.

▼ TELEPHONE : +31-20-568 83 07

▼ FAX : +31-20-568 84 44

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :

- Benin : Direction de la Recherche Agronomique, DRA.
- Burkina Faso : Institut d'Etudes et de Recherches Agricoles, INERA.
- Mali : Institut d'Economie Rurale, IER.
- Senegal : Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, ISRA.
- The Netherlands : Free Univ. Amsterdam, Dep. Ecology and Ecotoxicology.
- The Netherlands : Wageningen Agricultural University, Department of Vegetation. Science, Plant Ecology and Weed Science.
- The Netherlands : University of Nijmegen, Dep. of Organic Chemistry.
- France : Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Cytologie Expérimentale et Morphogenèse Végétale.
- France : Museum National d'Histoire Naturelle.
- France : Université de Montpellier, Phytochimie et Mycologie.

▼ KEY WORDS : parasitic weed; striga; integrated control; sorghum; maize; cowpea;  
 millet; benin; nigeria; sahelian countries; kenya.  
 Mots clés : *plante parasite; striga; lutte intégrée; sorgho; maïs; niébé; mil; bénin;  
 nigéria; pays sahélien; kenya.*

▼ FINAL REPORT : 99p. English (Dutch team); 41p. French (French team).  
 Rapport final :

\* see also STD1 Publication, 1989; TSD-250 project, p. 304

# Studies on the biology and ecology of the parasitic weed *Striga* in connection with integrated control schemes

## Summary

---

Studies on the parasitic weed *Striga* were conducted under laboratory conditions in Amsterdam and Paris as well as in the field in Benin, Burkina Faso, Kenya, Mali and Senegal. In addition, literature was reviewed regarding the effect of soil conditions on *Striga* development.

### ■ Laboratory studies

The germination rate of freshly harvested seeds of *S. hermonthica* generally increased during storage. However, under conditions of 100 % relative humidity (R.H.) and a relatively high temperature of 35 °C the germination rate eventually decreased. According to a viability staining test this decrease was due to dying of the seeds.

The ultrastructure of isolated chloroplasts of *S. hermonthica* and *S. aspera* was similar to autotrophic plants of the C3 type. However, the chloroplasts of these *Striga* species contained less chlorophyll. It was observed that as a result of *S. hermonthica* infestation chloroplasts of sorghum degenerate leading to a decrease in photosynthesis.

*Striga* species could be identified according to their polyphenols.

Chemical studies on the strigol skeleton showed that the CD-part of the molecule is primarily responsible for germination stimulation of *Striga*. A molecular mechanism which accounts for all bioactive strigol analogues was proposed.

### ■ Field studies

Based on annual field trips to Burkina Faso, Mali and Senegal, it was con-

cluded that in addition to *S. hermonthica*, *S. gesnerioides* and the related species *Alectra vogelii*, crop plants are also increasingly attacked by *S. aspera*, *S. passargei*, and two other species of Scrophulariaceae, i.e. *Buchnera hispida* and *Rhamphicarpa fistula*. Although from a practical point of view these species may be considered less important, they are a potential threat as apparently they are capable of adapting themselves to crop plants. In contrast to earlier conclusions it appears that in Africa also perennial *Striga* species occur. A new *Striga* species was described: *S. ellenbergeri* A. Rayn.

Application of urea resulted in a significantly higher number of *S. hermonthica* plants. On the other hand, when the urea treatment was repeated the number of *Striga* plants was significantly lower than in the controls. It was concluded that the timing of the urea application was more important than the total amount of urea applied. Studies on seed germination did not reveal that secondary dormancy was induced in *S. hermonthica* seeds in the course of the rainy season.

It was revealed that compared to the susceptible full season maize varieties "H511" and "H622", the early maturing maize variety "Katumani" develops fewer roots in the 10 cm top layer of the soil and the roots also expanded to a lesser extent in a horizontal direction. Consequently, root distribution was considered the primary reason that "Katumani" supported fewer *Striga* plants than the other varieties.

Testing of different germplasm showed that development of resistant or tolerant host plants is most promis-

ing for cowpea (Suvita 2, B 301 and IT82D-849). In sorghum some material is available which is less heavily attacked by *Striga*. In millet no tolerant or resistant material has been obtained so far.

Results of experiments on chemical control showed that 2,4-D amine is at present the most suitable herbicide for use by small-scale farmers in Africa. Results of experiments on integrated control including fertilizer, intercropping, different crop varieties and 2,4-D amine were not significantly different, apart from a slight decrease in the level of *Striga* infestation if 2,4-D amine was applied.

### ■ Literature review

Based on available literature, a direct relationship between soil structure and *Striga* infestation has not irrefutably been demonstrated. Soil structure may play an indirect role, for example via moisture content and the occurrence of micro-organisms. There are however strong indications that nitrogen brings about an effect on *Striga*.

## Objective of the research

---

In various developing countries in Africa, especially in the Sahelian zone, the yields of maize, sorghum, millet and cowpea are considerably reduced by *Striga* infestation. Although exact data are lacking, it is generally assumed that the overall losses in crop yields are in the order of 30 to 60 per cent. The available, effective control methods are too expensive or too hazardous to human health, to be used by small scale-farmers. The objective of the present study was to promote integrated control of *Striga*, through

standardization of protocols based on existing knowledge, and to provide additional inputs to this strategy from new technologies and information arising from laboratory studies.

## Results and conclusions

A *Striga* survey was conducted in the northern provinces of Benin, i.e. Borgou in the east and Atacora in the west. In both provinces, with the exception of the southern parts, *Striga hermonthica* (Del.) Benth. was found to be a serious problem on sorghum, maize, pearl millet, and, to a lesser extent, fonio and rice. *S. gesnerioides* (Willd.) Vatke was common on cowpea and on wild hosts. *S. aspera* (Will.) Benth. and *S. asiatica* (L.) Kuntze were only found in wild vegetation. It has been concluded that *Striga* is not only an agricultural problem, but also a socio-economic problem, as it is particularly linked to small-scale farmers who have little opportunity to change from one field to another or to practise rotation.

Literature on the effect of soil conditions on the development of *Striga* has been reviewed and discussed. A direct relationship between soil structure and *Striga* infestation has not irrefutably been demonstrated. Possibly, soil structure plays an indirect role, for example via moisture content and the occurrence of microorganisms. There are strong indications that nitrogen brings about an effect on *Striga*. However, much more detailed chemical soil analyses in direct relationship to *Striga* are needed. In general, it has been shown that a high soil moisture content is unfavourable for *Striga* development. It has been concluded that much basic research is needed, both in the laboratory and in the field, for a clearer understanding of the responses of the parasite to different soil conditions.

The germination rate of freshly harvested seed of *S. hermonthica* from Dumbi Duzi in Nigeria and Guéné in Benin has been determined at regular intervals, after storage under various

conditions of temperature and relative humidity (R.H.). During storage, germination generally increased. At 100 % R.H. this after-ripening process was more rapid than under lower R.H. tested conditions. However, under conditions of 100 % R.H. and a relatively high temperature of 35 °C (the Nigerian population also at 15 °C), the germination rate eventually decreased. According to a variability staining test, this decrease was due to dying of the seeds. By transferring seeds from dry (0 % R.H.) to humid conditions (100 % R.H.) it was demonstrated that, to a certain extent, exposure to humid air could replace conditioning. The results, in line with previous work on *S. asiatica* in the United States, have been discussed in relation to the "wet dormancy" phenomenon, i.e. dormancy induced by prolonged conditioning.

The ultrastructure of isolated chloroplasts of *S. hermonthica* and *S. aspera* was similar to autotrophic plants of the C3 type. However, the chloroplasts of these *Striga* species contained less chlorophyll. It was observed that as a result of *S. hermonthica* infestation chloroplasts of sorghum degenerate, leading to a decrease in photosynthesis.

*Striga* species could be identified according to their polyphenols (flavonoids and esters of caffeic acid). Two of the polyphenols could be identified as verbascoside and strigoside.

Chemical studies on the strigol skeleton showed that the CD-part of the molecule is primarily responsible for germination stimulation of *Striga*. A molecular mechanism which accounts for all bioactive strigol analogues was proposed. In this molecular mechanism a certain receptor site may act as the nucleophile. On the basis of this mechanism novel potential germination stimulants can be designed.

In connection with the possible use of N-fertilizer in integrated control programmes regarding the parasitic weed,

*S. hermonthica*, experiments were conducted at the "Station de Recherche sur les Cultures Vivrières" at Ina in the Republic of Benin. The effect of urea on *S. hermonthica* in sorghum was tested and simultaneously  $\text{NH}_3^+$  and  $\text{NO}_3^-$  were analyzed in soil samples from plots exposed to the various treatments. Urea was applied 5 days after sowing (in seven treatments) and also 21 days after sowing (in two treatments). The nitrification inhibitor Didin was tested in combination with urea (two treatments) and in the absence of urea (one treatment). A single urea treatment resulted in a significantly higher number of *Striga* plants as compared to the control. On the other hand, when the urea treatment was repeated the number of *Striga* plants was significantly lower than in the control. Didin did not bring about a significant effect. It was concluded that the timing of the urea application was more important than the total amount of urea applied. This is probably due to an effect of urea on the initial stages of *Striga* development. As far as the application of N-fertilizer in integrated control programmes of *Striga* is concerned, it was concluded that a better understanding of the N-fertilizer effect is a first priority.

Viability and germination rate of seeds of *S. hermonthica* was tested under field conditions in Benin as well as in Kenya in the course of a rainy season (in Benin from June until November 1991, in Kenya from February until July 1992). Simultaneously, studies were conducted into the effect of the sowing date of the crop on *Striga* infestation. For reasons of comparison an *in vitro* study of the effect of prolonged conditioning, i.e. exposure to moist conditions, on seeds from Benin was included. The results did not indicate that secondary dormancy, i.e. "wet dormancy", is induced in *S. hermonthica* seeds in the course of a rainy season. Results of the *in vitro* test suggested a decrease in the viability of the seeds at the higher temperatures tested (30 °C and higher). Although, in accordance with the results

of previous studies a decrease in *Striga* infestation was observed after delayed sowing, it was concluded that this was not connected with "wet dormancy".

From June to August 1992 an additional field experiment was conducted at Ina Station in Benin on seed viability and "wet dormancy" of *S. hermonthica* seeds. Seeds from two different ecological zones were used in two experiments. The ecological zones included the Zou Department, characterized by a bimodal, and the Borgou Department by a unimodal rainfall pattern. Seeds harvested at Ina Station in the Borgou Department seemed to enter a secondary dormancy pattern. However, after seven consecutive dry days the seeds recovered from this "wet dormancy". Although heavy rains were recorded in the course of the experiment, no additional "wet dormancy" pattern was observed. It was assumed that "wet dormancy" might occur, but once the seeds have recovered they do not become dormant for a second time. Seeds from the Zou Department, where the rainfall pattern is bimodal, did not enter a state of "wet dormancy". This may have been due to the ecological adaptation of the seeds. The tetrazolium colour test used to assess viability, was not reliable. Viability data based on the germination test were often below the germination percentages recorded.

In Western Kenya, the early maturing maize variety "Katumani", which in previous studies had shown a certain degree of tolerance to *S. hermonthica*, and the susceptible full season varieties "H511" and "H622" were tested in the field at the KARI National Sugar Research Centre in Kibos and at the KARI substation in Alupe. "Katumani" supported significantly less *Striga* than the two late maturing varieties. As a consequence, on a heavily infested field in Kibos the yield of "Katumani" was significantly higher than that of "H511" or "H622", whereas in the absence of *S. hermonthica* this is quite the reverse. It was revealed that compared to "H511" and "H622" fewer roots of "Katumani"



Figure 1 - *Striga hermonthica* parasitizing maize.

were present in the 10 cm top layer of the soil and that they expanded to a lesser extent in a horizontal direction. On the other hand, root exudate of "Katumani" more effectively induced germination of conditioned *S. hermonthica* seeds than root exudate of "H511" or "H622". Consequently, root distribution was considered the primary reason that "Katumani" supported less *Striga* than the other varieties. Avoidance, rather than resistance, might better describe the mechanism associated with the reduced *Striga* attack of "Katumani".

When the maize varieties "Katumani", "H511" and "H622" were cultivated in pots in a greenhouse it appeared that the number of *Striga* attachments per gram root weight differed to a large extent. It was the lowest on "Katumani" and the highest on "H622". The difference between "Katumani" on the one hand and the other two varieties on the other hand was significant. Consequently, it was concluded that apart from avoidance, true resistance may also account for the relatively low infestation of "Katumani" by *Striga* in the field.

Testing of different germplasm showed that development of resistant

or tolerant host plants is most promising for cowpea (Suvita 2, B 301 and IT82D-849). In sorghum some material is available which is less heavily attacked by *Striga*. However, the prospects for millet are not very good as tolerant or resistant material has not been obtained so far.

Results of experiments on chemical control showed that 2,4-D amine is at present the most suitable herbicide for use by small-scale farmers in Africa. Results of experiments on integrated control including fertilizer, intercropping, different crop varieties and 2,4-D amine were not significantly different, apart from a slight decrease in the level of *Striga* infestation when 2,4-D amine was applied.

## Publications

### ■ Reports

Batus P.C.W., 1992. Effects of planting date and maize variety on crop yield and *Striga hermonthica* development in Western Kenya. M. Sc. Thesis, Wageningen Agricultural University, Department of Vegetation Science, Plant Ecology and Weed Science, Wageningen, The Netherlands, 48pp.

Egbers W.S., 1989. Report of a visit to IITA, Ibadan, Nigeria and IAR/ABU, Samaru, Zaria, Nigeria, August 28-September 28, 1989, 12pp.

Egbers W.S., 1990. Report of a mission to the Borgou and Atacora provinces of the Republic of Benin: survey of the *Striga* problem, October 2-October 30, 1990, 10pp.

Gbehounou G., 1992. A study on viability and "wet dormancy" of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. seeds in the course of the rainy season. M.Sc. Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 30pp.

Hojelse C.M., 1991. Phenolic compounds in the root parasite *Striga* spp. Rapport de stage réalisé au laboratoire de Botanique. Phytochimie et Mycologie de la faculté de Pharmacie, Montpellier, France, 62pp.

Lutikholt L., 1992. Invloed van ureumbestemming, al dan niet in combinatie met een nitrificatieremmer, op *Striga hermonthica* (Del.) Benth. infestatie. Invloed van handwielen van *Striga hermonthica* (Del.) Benth. op de waardplant. M.Sc. Thesis, Free University Amsterdam, Department of Ecology and Ecotoxicology, Amsterdam, The Netherlands, 25pp.

Martin A., 1992. The early development of *Striga* spp. on different hosts. M.Sc. Thesis, Free University of Amsterdam, Department of Ecology and Ecotoxicology, Amsterdam, The Netherlands, 35pp.

Ouedraogo O., 1992. Quelques méthodes d'études de problème du Striga au Burkina Faso. D.E.S.U. de Biologie Végétale Tropicale, UPMC, Paris, France, 41pp.

Sallé G., Raynal-Roques A. and Tuquet C., 1989. Rapport de mission en Grande-Bretagne réalisée du 31 mai au 4 juin, 7pp.

Sallé G., Raynal-Roques A. and Tuquet C., 1989. Rapport de mission au Sénégal, Burkina Faso et Mali réalisée du 24 septembre au 16 octobre, 16pp.

Sallé G., Raynal-Roques A. and Tuquet C., 1990. Rapport de mission au Sénégal, Burkina Faso et Mali réalisée du 26 septembre au 16 octobre, 23pp.

Raynal-Roques A., 1991. Rapport de mission au Mali réalisée du 10 au 23 janvier, 15pp.

Raynal-Roques A., 1991. Rapport de mission à Londres et Kew réalisée du 8 au 12 avril, 4pp.

Sallé G., Raynal-Roques A. and Tuquet C., 1991. Rapport de mission au Sénégal, Burkina Faso et Mali réalisée du 24 septembre au 14 octobre, 22pp.

Sallé G., Raynal-Roques A. and Tuquet C., 1992. Rapport de mission au Sénégal, Burkina Faso et Mali réalisée du 23 septembre au 12 octobre, 13pp.

Scheppers P., 1992. A study on seed germination and seed viability of *Striga hermonthica* (Del.) Benth. under field conditions in Kenya. M.Sc. Thesis, Wageningen Agricultural University, Department of Vegetation Science, Plant Ecology and Weed Science. Wageningen, The Netherlands, 43pp.

Schoenmakers F., 1992. Een onderzoek naar de "wet dormancy" van zaden van *Striga hermonthica* (Del.) Benth. onder veldcondities. Invloed van de zaaidatum van mais op de infestatie van *Striga hermonthica* (Del.) Benth. M.Sc. Thesis, Free University of Amsterdam, Department of Ecology and Ecotoxicology. Amsterdam, The Netherlands, 29pp.

## ■ Publications

Baltus P.C.W., Ransom J.K., Odhiambo G., Egbers W.S., Ter Borg S.J., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1993. A comparative study on the defense mechanism(s) of the maize variety "Katamani" against the parasitic weed

*Striga hermonthica* under field conditions in Kenya. Plant and Soil (submitted).

Dembele B. and Sallé G., 1990. Recherche de méthode de lutte contre le Striga au Mali. 14ème Conférence du COLUMA. Versailles, 23-24 janvier, 3, 371-377.

Egbers W.S., Pieterse A.H. and Verkleij J.A.C., 1991. Germination of freshly harvested seed of *Striga hermonthica* under various temperature and relative humidity conditions. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, CIMMYT, 407-414.

Egbers W.S., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1991. A study of the iso-enzyme variations among populations of *Striga hermonthica* in Africa obtained from in vitro cultivation of seedlings. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, CIMMYT, 485.

Ghebounou G., Egbers W.S., Verkleij J.A.C. and Pieterse A.H., 1991. A survey on *Striga* infestation in Borgou and Atacora provinces in Benin. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, CIMMYT, 484.

Mangnus E.M., 1992. Strigol analogues. Design, Synthesis and Biological Activity. Ph. D. Thesis, University of Nijmegen, 135pp.

Paré J. and Raynal-Roques A., 1992. The genus *Striga* (Scrophulariaceae) : taxonomy, geography, distribution: first embryological results in *Striga hermonthica* (Del.) Benth., scourge of food crops in tropical Africa, with special reference to the action of an herbicide on seed development. Acta Biologica Cracoviensis, Series : Botanica (in press).

Pieterse A.H. and Verkleij J.A.C., 1991. Effect of soil conditions on *Striga* development - a review. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, CIMMYT, 329-339.

Pieterse A.H., Schoenmakers F., Scheppers P., Yehounou A., Ransom J.K., Odhiambo G., Egbers W.S., Baltus P.C.W., Ter Borg S.J. and Verkleij J.A.C., 1993. A comparative study of

parasitic weed *Striga hermonthica* (Del.) Benth. regarding seed dormancy and sowing date of the host crop in Benin and Kenya. Tropical Agriculture (submitted).

Raynal-Roques A. and Sallé G., 1989. *Striga* Lour. (Scrophulariaceae). Essai étymologique. Journ. Agric. Trad. et Bot. Appl., 34, 47-49.

Raynal-Roques A., 1990. Un nouveau *Striga* (Scrophulariaceae) de l'Ouest africain. Bull. Mus. nat., Hist. nat. Paris, 4ème série, II, sect. B. Adansonia 4, 351-354.

Sallé G. and Raynal-Roques A., 1989. Le *Striga*. La Recherche, 206, 251-261.

Sallé G., Dembele B., Tuquet C. and Raynal-Roques A., 1990. Le *Striga* en Afrique : impact économique, biologie et méthodes de lutte. 14ème Conférence du COLUMA. Versailles, 23-24 janvier, 3, 361-369.

Tuquet C. and Sallé G., 1991. Biochemical features of chloroplasts isolated from hemiparasitic angiosperms. In Ransom J.K., Musselman L.J., Worsham A.D. and Parker C. (eds.), Proceedings of the 5th International Symposium on Parasitic Weeds. Nairobi, CIMMYT, 262-269.

Tuquet C., Farineau N. and Sallé G., 1990. Biochemical composition and photosynthetic activity of chloroplasts from *Striga hermonthica* and *Striga aspera*, root parasites of field-grown cereals. Physiologia Plantarum, 78, 574-582.

Verkleij J.A.C., Luttikholt L., Yehounou A., Egbers W.S. and Pieterse A.H., 1993. Interaction between N-fertilizer and the parasitic weed *Striga hermonthica* (Del.) Benth. Proceedings 3rd International Workshop on Orobanche (submitted).

Wade M., 1990. Statut de trois Scrophulariacées du genre *Striga* dans le terroir de Sob au Sénégal, Sahel PV Info, 21, 9-18.

## ■ Training materials

Circular entitled : Les *Striga* : fléaux des cultures vivrières au Sahel.

Video entitled : Les *Striga* : fléaux des cultures vivrières au Sahel (SECAM) and an English version : *Striga* : scourge of food crops in the Sahel (PAL)2.

Numéro de contrat : **TS2-A-269**  
Contract number :

▼ TITRE : ***Lutte biologique contre les Bruchidae ravageurs du niébé en Afrique de l'Ouest.***

Title : *Biological control of bruchids, pests of cowpea in West Africa.*

▼ CHEF DE PROJET : Jacques Huignard  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Institut de Biocénologie Expérimentale des Agrosystèmes,  
Host institution : URA CNRS 1298.

▼ ADRESSE : Parc de Grandmont, Avenue Monge,  
Address : 37200 Tours, France.

▼ TELEPHONE : +33-47 36 69 65

▼ FAX : +33-47 36 70 40

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :  
- Pays-Bas : Université Agronomique de Wageningen, Département d'Entomologie.  
- Niger : Université A. Moumouni, Niamey.  
- Niger : Département de Formation en Protection des Végétaux, Niamey.

▼ MOTS CLES : niébé; coléoptère bruchidae; parasitoïde oophage; parasitoïde larvaire; dynamique des populations des insectes; lutte biologique en stockage; protection des cultures.  
Key words : cowpea; coleoptera bruchidae; egg parasitoids; larval parasitoids; insect population dynamics; biological control during storage; crop protection.

▼ RAPPORT FINAL : 80p. Français.  
Final report :

# Lutte biologique contre les bruchidae ravageurs du niébé en Afrique de l'Ouest

## Objectifs de la recherche

Les graines de niébé (*Vigna unguiculata*) peuvent représenter une source de protéines importante pour de nombreuses populations sahéliennes. Or, les cultures de niébé sont en régression car il est très difficile de conserver les graines en raison des pertes dues à deux espèces de Coléoptères Bruchidae: *Bruchidius atrolineatus* (Pic) et surtout, *Callosobruchus maculatus* (F).

La lutte biologique à l'aide d'hyménoptères entomophages peut être utilisée dans les systèmes de stockage pour contrôler les populations de bruches. Dans les systèmes de stockage, trois espèces d'hyménoptères ont été recensées, deux espèces ectoparasitoïdes sont larvophages; *Eupelmus vuillei* (Craw) (Eupelmidae) et *Dinarmus basalis* (Rond.) (Pteromalidae) et une est oophage; *Uscana lariophaga* (Steph.) (Trichogrammatidae). Ces parasitoïdes ne parviennent pas à contrôler les populations de bruches dans les stocks de graines.

Les recherches réalisées à l'Université de Tours (France), à l'Université Agricole de Wageningen (Pays-Bas) et à l'Université de Niamey (Niger) avaient pour objectif :

- de recenser les conditions de stockage du niébé dans les zones productrices au Niger et au Nigéria et les méthodes de protection utilisées par les agriculteurs pour contrôler les populations de bruches;
- de suivre, dans les conditions de stockage proches de celles utilisées par les agriculteurs au Niger, l'évolution des populations de bruches et de leur parasitoïdes et d'analyser l'impact de chaque espèce de parasitoïde sur la dynamique des populations de bruches;
- d'analyser au laboratoire l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur le comportement, la fécondité et le développement des Bruchidae et de leurs parasitoïdes;
- de proposer à partir des données de base ainsi obtenues une méthode de lutte biologique à l'aide des hyménoptères parasitoïdes, permettant un contrôle efficace des populations de Bruchidae dans les différents systèmes de stockage.

## Résultats obtenus

### Analyse des conditions de stockage du niébé

48 agriculteurs ont été interrogés dans quatre départements au Niger et 40 dans trois zones au Nigéria. Les points suivants ont pu être dégagés :

- Les deux espèces de bruches et les trois espèces d'hyménoptères sont présentes dans tous les systèmes de stockage. Les pertes dues aux bruches sont souvent très variables d'une zone à l'autre et entre les greniers d'un même village.
- Les agriculteurs utilisent des méthodes de protection variées (sable, cendres, plantes aromatiques réputées insecticides, ...) souvent peu efficaces. Les insecticides sont parfois utilisés, mais leur impact sur les populations de bruches et de parasitoïdes reste à préciser. Il y a de moins en moins de stockage du niébé dans les greniers traditionnels. Les agriculteurs vendent le niébé dès la récolte à des prix souvent bas. Cette faible rentabilité du niébé est également un facteur qui limite l'extension des cultures.
- Il existe plusieurs types de greniers traditionnels, en paille de céréales, en banco (terre séchée). Le choix des matériaux et la forme des greniers

diffèrent suivant les régions. Au Nigéria, des structures de stockage plus modernes utilisant le ciment sont utilisées et tendent de plus en plus à remplacer les greniers traditionnels.

### Evolution des populations de bruches et de parasitoïdes dans les systèmes de stockage traditionnels au Niger

Des gousses ont été récoltées en octobre 1991 dans des cultures de niébé dans la région de Boukoulou (150 km au nord de Niamey) et les graines sont stockées par lots de 3 kg dans des jarres de 30 litres. Les variations des effectifs de bruches et de parasitoïdes sont suivies de décembre 1991 à mai 1992, durant toute la saison sèche à l'intérieur des jarres. 89 % des adultes de bruches émergeant des graines sont de *C. maculatus* appartenant au morphe non voilier. Six ou sept générations de cette espèce se succèdent et détruisent toutes les graines stockées. Par contre, les populations de *B. atrolineatus* en diapause reproductrice ne s'accroissent pas.

- Les parasitoïdes larvaires représentent 30 % des insectes recensés durant toute l'étude. Au cours du stockage, *E. vuillei* devient progressivement dominant, il représente, à partir de mars, plus de 90 % des hyménoptères émergeant des graines.
- Le suivi des pontes de bruches dans d'autres systèmes de stockage montre qu'*U. lariophaga* est toujours présent et a parasité à la fin de l'étude 40 à 50 % des oeufs de *C. maculatus*.

Des expériences ont donc été réalisées en conditions naturelles afin d'estimer l'impact de chaque espèce de parasitoïde sur la dynamique de populations de *C. maculatus*. Dans chaque jarre,

on introduit 3 kg de graines saines, 200 larves de *C. maculatus* et 20 couples de parasitoïdes. Les effectifs de bruches sont comparés à ceux obtenus lorsque *C. maculatus* est seul (lot témoin).

- Lorsque *E. vuilleti* est introduit seul, il ne provoque qu'une réduction de 29 % des effectifs de *C. maculatus* par rapport au lot témoin. L'introduction de *D. basalis* provoque une réduction de 70 % des effectifs de *C. maculatus* par rapport au lot témoin.
- Lorsque *U. lariophaga* est introduit dans des stocks de graines de niébé portant des oeufs de *C. maculatus*, les populations de bruches les mieux contrôlées sont celles où la densité initiale d'oeufs est la plus élevée. Le taux de parasitisme est élevé (80 %) et se maintient jusqu'à la fin de l'étude. Les pertes en graines sont alors de 4 % contre 23 % dans les lots témoins.
- La compétition interspécifique entre *D. basalis* et *E. vuilleti* entraîne une réduction progressive des effectifs de *D. basalis* et se révèle favorable aux populations de bruches. De même, les interactions entre *U. lariophaga* et *D. basalis* limitent l'efficacité parasitaire de l'oophage, mais affectent peu celle de *D. basalis*.

#### ■ Analyse de quelques caractéristiques physiologiques des coléoptères bruchidae

Un fort taux d'adultes de *B. atrolineatus* est en diapause reproductrice dès le début du stockage et ne provoque donc que des dégâts limités. Cette diapause est induite au cours du développement post-embryonnaire et dépend des conditions thermopériodiques, photopériodiques et hygrométriques dans lesquelles a lieu le développement. La diminution de la photopériode, l'accroissement de l'hygrométrie permettent chez les mâles la levée de la diapause reproductrice. Chez les femelles, des stimulations gustatives ou trophiques issues de la plante-hôte sont en plus nécessaires pour permettre le démarrage de la

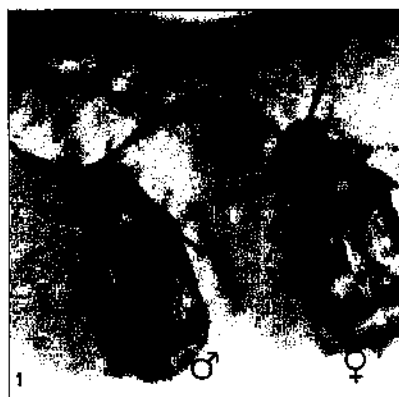


Figure 1 - *Callosobruchus maculatus* adultes forme voilière.

reproduction au moment de la phase de fructification du niébé.

*C. maculatus* présente un polymorphisme imaginal avec alternance de formes voilières et non voilières. Les conditions observées au cours du stockage (températures élevées, hygrométrie basse) favorisent l'émergence des adultes de la forme non voilière à fécondité élevée, très bien adaptée aux conditions climatiques régnant dans les stocks durant la période la plus chaude de la saison sèche.

#### ■ Analyse du comportement des parasitoïdes dans les systèmes de stockage expérimentaux

Les informations chimiques jouent un rôle important dans la localisation de l'habitat de l'hôte et dans la découverte de l'hôte.

Les femelles *U. lariophaga* sont attirées par l'odeur du substrat sur lequel se sont déplacés les adultes de *C. maculatus*, les odeurs de la graine de niébé saine ou celles des graines portant des oeufs. L'odeur de graines de niébé saines, de larves de bruches ou de leur fecès attirent les femelles d'*E. vuilleti*. Seule, l'odeur de graines stimule le comportement locomoteur. Ces capacités de détection sont acquises au début de la vie imaginaire et permettent aux femelles d'exploiter très rapidement les hôtes disponibles.

*U. lariophaga* et les parasitoïdes larvaires sont capables de se déplacer à l'intérieur des systèmes de stockage,



Figure 2 - *Callosobruchus maculatus* adultes forme non voilière.

de découvrir et d'exploiter leurs hôtes, même lorsque ceux-ci sont peu denses. Chez *U. lariophaga*, l'odeur des oeufs joue un rôle important dans ce comportement. Le comportement des parasitoïdes larvaires est plus complexe. Les femelles de *E. vuilleti* sont capables de détecter les hôtes déjà parasités; elles évitent le superparasitisme, mais non le multiparasitisme. Elles tuent à l'aide de leur ovipositeur les oeufs ou les larves de *D. basalis*. Elles sont même capables de se développer en hyperparasites aux dépens des larves de *D. basalis*.

Les femelles de *D. basalis* détectent également les hôtes multiparasités par *E. vuilleti*, mais évitent de pondre sur des hôtes parasités par *E. vuilleti* et répartissent leurs oeufs sur les hôtes sains.

Les deux espèces de parasitoïdes présentent donc, en situation de multiparasitisme, deux stratégies différentes. Le comportement agressif de *E. vuilleti* vis-à-vis de *D. basalis* permet de comprendre pourquoi ce dernier parasitoïde se maintient à un niveau très bas dans les conditions de stockage. La réduction des populations de *D. basalis*, *E. vuilleti*, limite l'efficacité de la lutte biologique et permet le maintien de populations denses de bruches. Ces phénomènes de reconnaissances interspécifiques entre *D. basalis* et *E. vuilleti* sont assez exceptionnels et témoignent probablement d'une longue coévolution entre ces deux espèces de parasitoïdes au niveau de leurs hôtes.



# ■ Analyse de quelques paramètres influençant la biologie des populations de *U. lariophaga*

Un bon agent de lutte biologique doit contrôler les populations de ses hôtes quelle que soit la densité (réponse fonctionnelle). Les études réalisées montrent que la réponse fonctionnelle de *U. lariophaga* est indépendante de la densité de l'hôte. Toutefois, la réponse agrégative des femelles au niveau de "patches" denses compense cette absence de réponse à l'accroissement de la densité.

La capacité parasitaire d'*U. lariophaga* dépend de la température, elle est maximale entre 25 et 30°C. Le taux de développement de cette espèce s'accroît lorsque la température d'élevage varie de 17 à 35°C puis décroît de 35 à 40°C. Le taux intrinsèque d'accroissement de la population ( $r_m$ ) est maximal entre 30 et 37°C. Il est toujours plus élevé que celui de *C. maculatus*, quelle que soit la température.

L'apport de nourriture (du miel) augmente de façon importante la longévité des femelles, leur fécondité et le taux intrinsèque d'accroissement des populations d'*U. lariophaga*. Il augmente de façon significative la capacité parasitaire de cette espèce.

## ■ Evolution des populations de bruches et de parasitoïdes en conditions contrôlées

Les données biologiques obtenues nous ont permis d'analyser au laboratoire, en conditions contrôlées, l'évolution des populations de bruches en présence ou en absence de parasitoïdes.

Les capacités d'accroissement des populations de *C. maculatus* sont toujours très importantes et dépendent de la température et de l'hygrométrie. Ce sont les conditions sèches qui permettent le plus fort taux d'accroissement de la population (210). Les conditions humides, en facilitant l'émergence de



Figure 3 - Femelles de *Eupelmus vuillesti* émergeant de la graine de *Vigna unguiculata*.

formes voilières à faible fécondité, limitent cet accroissement.

Les taux d'accroissement des populations de *B. atrolineatus* sont toujours plus faibles que ceux de *C. maculatus*, même dans les conditions climatiques non inductrices de la diapause. Le groupement entraînant une forte mortalité larvaire et un accroissement du taux d'adultes diapausants est probablement à l'origine de ce phénomène.

Comme dans les conditions naturelles, *E. vuillesti* ne provoque qu'une réduction limitée des effectifs de ses hôtes. Par contre, *D. basalis* peut réduire très rapidement les populations de bruches et les éliminer, même lorsque la densité des hôtes est élevée. Cette importante efficacité parasitaire confirme les données précédentes et montre que *D. basalis* est un excellent agent de lutte biologique.

Une première tentative de modélisation, réalisée à partir du modèle de May (1978) analyse les différences de durée de développement de *C. maculatus*, *D. basalis* et *U. lariophaga* et leurs conséquences sur la succession des générations de bruches. Le modèle



Figure 5 - Femelle d'*Eupelmus vuillesti* en cours d'oviposition.



Figure 4 - Nymphe de bruches avec oeufs de *Eupelmus vuillesti*.

montre que la présence simultanée des deux parasitoïdes peut provoquer une désynchronisation temporelle de leurs cycles par rapport à ceux de leurs hôtes qui se maintiennent à un niveau élevé.

## Conclusions et recommandations

Ces nombreuses études réalisées à la fois sur le terrain et au laboratoire démontrent les capacités de développement et d'adaptation de *C. maculatus* dans les systèmes de stockage. Elles permettent de comprendre les dégâts provoqués par ces insectes dans les stocks.

*Dinarmus basalis* et *Uscana lariophaga* sont deux excellents agents de lutte biologique. Ils possèdent de très bonnes capacités de détection de leurs hôtes dans les systèmes de stockage et peuvent très bien contrôler les populations de leurs hôtes quelle que soit leur densité. Grâce aux nombreuses données obtenues, l'utilisation pratique de ces deux parasitoïdes en situation de stockage, dans différentes conditions climatiques, peut être maintenant développée.



Figure 6 - Femelle de *Dinarmus basalis* en cours d'oviposition.

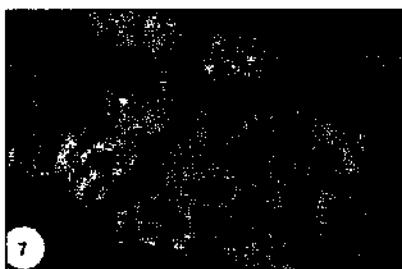


Figure 7 - Dégâts provoqués par *Callosobruchus maculatus* dans des grains de *Vigna unguiculata*.



Figure 8 - Dégâts provoqués par *Callosobruchus maculatus* dans des grains de *Vigna unguiculata*.

Dans les systèmes de stockage, les interactions entre les parasitoïdes larvaires et *D. basalis* et *U. lariophaga* sont complexes et peuvent limiter l'efficacité du contrôle parasitaire. C'est pourquoi l'analyse de ces interactions doit être poursuivie car leur compréhension est l'une des clés du succès de la lutte biologique que nous mettons en place.

La recherche de différentes techniques de conservation facilitent le développement de *D. basalis* et de *U. lariophaga* aux dépens de leurs concurrents, représentant l'un des principaux thèmes de recherche qui doit être dès maintenant développé dans divers zones climatiques.

## Bibliographie

Van Alebeek F.A.N., 1991. Interspecific host discrimination by two solitary ectoparasitoids of immature stages of Bruchidae. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 56/3B, 1011-1020.

Van Alebeek F.A.N., D. Rojas-Rousse et Lévêque L., 1993. Interspecific competition between *Eupelmus vuilleti* and *Dinarmus basalis*, two solitary ectoparasitoids of Bruchidae larvae and pupae. Entomol. exp. appl. (in press).

Cortesero A.M., Monge J.P. et Huignard J., 1993. Response of the parasitoid *E. vuilleti* to odours of its host and host plant in an olfactometer. Entomol. exp. appl. (in press).

Desroches P. et Huignard J., 1991. Effect of larval density on development and induction of reproductive diapause in *Bruchidius atrolineatus*. Entomol. exp. appl., 61, 255-263.

Glitho I.A., Lenga A. et Huignard J., 1991. Intensity of the male reproductive diapause in *Bruchidius atrolineatus* Pic (Coleoptera Bruchidae) is affected by induction conditions. Invertebrate Reproduction and Development, 19(3), 233-243.

Van Huis A., Wijkamp M.G., Lammers P.M., Klein Goldewijk C.G.M., van Seeters J.H. et Kaashoek N.K., 1991. *Uscana lariophaga* (Hymenoptera : Trichogrammatidae), an egg parasitoid of bruchid beetle (Coleoptera Bruchidae) storage pests in West Africa : host-age and host-species selection. Bull. Entomol. Res., 81, 65-75.

Van Huis A., 1991. Biological methods of bruchid control in the tropics : a review. Insect. Sci. Applic., 12(1/2/3), 87-102.

Van Huis A., Arendse P.W., Schilthuizen M., Wieggers P.P., Heering H., Hulshof M. et Kaashoek N.K., 1992. *Uscana lariophaga* (Hym. Trichogrammatidae), egg parasitoid of bruchid beetle (Col. Bruchidae) storage pests of cowpea in West Africa : the effect of temperature and humidity. Entomol. Exp. Appl. (in press).

Lenga A., Thibeaudeau C. et Huignard J., 1991. Influence of thermoperiod and photoperiod on reproductive diapause in *Bruchidius atrolineatus* Pic (Coleoptera Bruchidae). Physiol. Entomol., 16, 295-303.

Lenga A. et Huignard J., 1992. Effects of changes in the thermoperiod on reproductive diapause in *Bruchidius atrolineatus* Pic (Coleoptera Bruchidae). Physiol. Entomol., 17, 247-254.

Lenga A., Glitho I. et Huignard J., 1993. Interactions between photoperiod relative humidity and host plant cues on the reproductive diapause termination in *Bruchidius atrolineatus*. Invertebrate Reprod. (sous presse).

Lévêque L., Monge J.P., Rojas-Rousse D., Van Alebeek F. et Huignard J., 1993. Analysis of multiparasitism by *Eupelmus vuilleti* (Craw) (Eupelmidae) and *Dinarmus basalis* (Rond.) (Pteromalidae) in the presence of one of their common hosts, *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Coleoptera Bruchidae). Oecologia, 94, 272-277.

Monge J.P. et Huignard J., 1991. Population fluctuations of two bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F) and *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Coleoptera Bruchidae) and their parasitoids *Dinarmus basalis* (Rond.) and *Eupelmus vuilleti* (Craw) (Hymenoptera, Pteromalidae, Eupelmidae) in a storage situation in Niger. J. Afr. Zool., Revue de Zoologie africaine, 187-196.

Ouedraogo P.A., Monge J.P. et Huignard J., 1991. Importance of temperature and seed water content on the induction of imaginal polymorphism in *Callosobruchus maculatus*. Entomol. exp. appl., 59, 59-66.

AMELIORATION  
DES PRODUCTIONS AGRICOLES

IMPROVEMENT OF AGRICULTURAL  
PRODUCTS

PRODUCTION  
VEGETALE

---

*PLANT  
PRODUCTION*

Forêts

Forests

Numéro de contrat : TS2-A-070  
Contract number :

▼ TITRE :

***Pénurie de bois et passage de l'autoconsommation  
à la commercialisation rurale et urbaine du bois de feu  
dans le bassin du Pondori au Mali  
et dans le département de l'Atlantique au Bénin.***

Title :

*Fuelwood scarcity and transition from subsistence supplying  
to rural and urban fuelwood trade in the Pondori basin in Mali  
and in the Atlantic department in Benin.*

▼ CHEF DE PROJET :

A. Bertrand

Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE :

Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique  
pour le Développement, Département des Forêts,  
(CIRAD-ex Centre Technique Forestier Tropical).

Host institution :

▼ ADRESSE :

Avenue de la Belle Gabrielle 45 bis,  
94130 Nogent sur Marne Cedex, France.

Address :

▼ TELEPHONE :

+33-1-43 94 43 00

▼ FAX :

+33-1-43 94 43 29

▼ INSTITUTIONS

ASSOCIEES :

Associated Institutions :

- Mali : Direction Nationale des Eaux et Forêts, DNEF.
- Mali : Institut d'Economie Rurale, IER.
- Bénin : Faculté des Sciences Agronomiques, FSA.
- Belgique : Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat  
de Gembloux, CRA.

▼ MOTS CLES :

bois-énergie; économie rurale; sociologie rurale; système d'exploit-  
ation agricole; foresterie rurale; produit de cueillette; jachère; régime  
foncier; filière.

Key words :

*fuelwood; rural economy; rural sociology; farming systems; rural  
forestry; gathering products; fallows; land tenure; economic channels.*

▼ RAPPORT FINAL :

Final report :

57p. Français.

# Pénurie de bois et passage de l'autoconsommation à la commercialisation rurale et urbaine du bois de feu dans le bassin du Pondori au Mali et dans le département de l'Atlantique au Bénin

L'opération de recherche a été réalisée par une équipe multidisciplinaire animée par :

- Alain Bertrand, économiste forestier (CIRAD-CTFT),

composée de :

- Abou Lamine Berthe, ingénieur forestier (DNEF),
- N'faly Dembele, agro-économiste (IER),
- Ibrahima Cissé, sociologue (IER),
- Yves Schenkel, énergies renouvelables (CRA),
- Fousseyni Mariko, agro-économiste (IER),
- Valentin Agbo, sociologue (FSA),
- Théophile Ahouansou, agro-économiste (MDRAC-FSA),
- Jean-Marie Petit, ingénieur forestier (FSA).

## Le projet de recherche

Le projet de recherche proposait d'étudier l'évolution des pratiques d'autoconsommation et de commercialisation du bois de feu et leurs conséquences dans deux cas précis :

- la zone du Pondori (basse vallée du Bani au Mali) où on assiste, du fait de la pénurie des ressources ligneuses, à un passage de l'autoconsommation vers la commercialisation rurale du bois de feu induisant des modifications fondamentales des systèmes agraires;

- la province de l'Atlantique au Bénin, proche de Cotonou, où la croissance des besoins urbains en bois de feu et charbon de bois, donne à ces produits une valeur commerciale croissante. Ceci induit des comportements de production et de commercialisation de plus en plus complexes qu'il importe d'étudier en tenant compte des variations locales et de leurs effets sur le fonctionnement et la structuration des systèmes agraires.

## Objectifs de recherche et méthodologie

Dans le Pondori, compte tenu de la superficie limitée de la zone et de sa diversité, il fut décidé de réaliser trois enquêtes selon la stratification suivante :

- niveau village,
- niveau unité agricole de production,
- niveau ménage,

et de les compléter par des entretiens systématiques auprès des institutions administratives présentes sur la zone.

Dans le département de l'Atlantique, compte tenu des informations recueillies, de ses diverses zones agro-socio-économiques, des objectifs de connaissance retenus, il fut décidé de bâtir un dispositif d'investigation en deux phases complémentaires :

- première phase d'enquêtes statistiques;

- deuxième phase d'enquêtes plus approfondies par entretiens.

Le département de l'Atlantique fut, après une analyse multi-critères, divisée en cinq zones différentes homogènes selon :

- la densité de la population et la pression foncière,
- la nature générale et la fertilité des sols.

Pour atteindre les objectifs de recherche, une série de 5 enquêtes a été réalisée :

- enquête villages scindée en 3 entretiens;
- enquête unité de production;
- enquête ménage;
- enquête vente bord de route ou piste;
- enquêtes qualitatives.

## ■ Les objectifs de recherche dans le Pondori au Mali

Les thèmes des investigations à mener ont été précisés dès le début des travaux au Mali. On a choisi de porter principalement l'effort sur les thèmes suivants :

- la commercialisation du bois-énergie en milieu rural;
- les résidus agricoles et les combustibles accessoires;
- les produits de cueillette et la place de l'arbre dans les systèmes agraires;
- les attitudes paysannes par rapport à l'arbre et à la plantation.

## ■ Les objectifs de recherche dans le département de l'Atlantique au Bénin

Les thèmes des investigations à mener ont été précisés dès le début des travaux au Bénin et compte tenu du retard pris pour le démarrage des travaux dans ce pays en raison des événements économiques, sociaux et politiques, ont largement bénéficié de l'acquis des travaux menés au Mali. On a choisi de porter principalement l'effort sur les thèmes suivants:

- la commercialisation du bois-énergie en milieu rural et les revenus de cette activité pour les paysans;
- la pratique de la jachère, la gestion paysanne de la fertilité et les attitudes paysannes par rapport à l'arbre;
- les relations entre les différentes activités de rente des paysans;
- le foncier: la propriété de la terre et la propriété de l'arbre;
- la gestion paysanne de l'arbre dans la parcelle cultivée;
- les produits de cueillette et la place de l'arbre dans les systèmes agraires.

## Principaux résultats de recherche

### ■ Les principaux résultats de recherche obtenus dans le Pondori au Mali

Sans entrer dans le détail des résultats présentés au tome II du rapport «Pénurie de bois et passage de l'auto-consommation à la commercialisation rurale et urbaine du bois de feu dans le bassin du Pondori au Mali», il importe de souligner ici de façon synthétique les principaux résultats obtenus au cours de la réalisation des travaux de recherche.

#### ■ Les systèmes agraires et le régime foncier

Dans la zone du Pondori, les systèmes agraires sont caractérisés par la quasi inexistence de l'équipement agricole et la pratique d'une agriculture exclusivement manuelle. D'autre part, leur

complexité reflète une composition ethnique dont la diversité (les Bambara, les Peuhl, les Marka, les Rimaïbé et le Bozo sont les groupes les plus importants alors que les Somono, les Dogon, les Bobo, les Sonraï et les Tamachek sont très minoritaires) est ancienne malgré des évolutions récentes importantes. Coexistent dans la zone des agriculteurs pratiquant principalement la riziculture de décrue sur les zones inondables, des pasteurs permanents ou transhumants, des agriculteurs cultivant principalement le mil en culture pluviale, des pêcheurs.

Les ventes de bois et de produits forestiers de cueillette restent une source secondaire et complémentaire de revenus; toutefois, dans certains villages bien dotés en ressources forestières naturelles, le bois constitue la deuxième source de revenus monétaires après les ventes de céréales.

#### ■ La consommation et la commercialisation des énergies domestiques en milieu rural

Sur le plan de l'énergie domestique (qui représente la quasi totalité de l'énergie consommée dans la zone pour les usages réellement domestiques comme pour l'artisanat qui s'inscrit dans le cadre des ménages ruraux), on observe une très nette dichotomie entre des:

- villages producteurs, et
- des villages non producteurs.

Du fait de l'inondation, le système d'approvisionnement et d'utilisation des énergies domestiques est complexe. Contrairement à ce qui se passe dans de nombreuses zones rurales en Afrique de l'Ouest, on observe selon les lieux et les saisons (selon les conditions d'accessibilité et les difficultés de circulation liées à l'inondation) des différences importantes:

- dans la nature des combustibles utilisés; bois de feu, résidus de récoltes, herbes sauvages, et
- dans les modalités d'approvisionnement; chaque fois et pendant les périodes où ils sont possibles, l'autoapprovisionnement et l'autoconsommation restent la règle, mais

dans la zone il est des cas où des périodes où, pour certains combustibles, ils sont impossibles. Trouvent alors leur place des systèmes d'approvisionnement commerciaux ruraux dont l'existence est encore rare en Afrique de l'Ouest.

#### Le bois de chauffe

Le bois de feu constitue la principale source d'énergie dans la zone du Pondori, aussi bien dans la zone exondée que dans la zone d'inondation. Dans la zone d'inondation, les ressources en bois sont presque inexistantes. On distingue donc deux catégories principales de villages:

les villages producteurs qui disposent de ressources ligneuses (celles-ci pouvant juste suffire à la consommation du village ou au contraire être suffisamment abondantes pour assurer une commercialisation à l'extérieur du terroir en direction des autres villages démunis. Dans les villages producteurs, l'autoapprovisionnement est quasi-général; il est assuré par les femmes;

les villages consommateurs dépourvus de ressources ligneuses naturelles s'approvisionnent en bois-énergie auprès des villages producteurs aux saisons où la circulation dans la zone inondable est facile (hors de la période d'inondation). L'exploitation commerciale du bois est généralement réalisée par les villageois (et quelques rares «professionnels»; des Bellah opèrent ainsi au carrefour de Djenné) et les femmes y jouent un rôle très important.

#### Les herbes sauvages et les résidus agricoles

Les résidus agricoles utilisés dans la zone sont essentiellement les tiges de mil et de sorgho. Ils sont utilisés par environ 75 % des ménages de la zone.

Les herbes sauvages sont utilisées comme combustible domestique dans la zone inondable depuis toujours, essentiellement en saison froide et sèche (période où l'inondation persiste). Celles-ci sont obtenues par

autoapprovisionnement. Les ressources ont diminué du fait de la sécheresse, de la baisse des niveaux d'inondation et de l'afflux des troupeaux; la consommation a donc baissé au profit des achats de bois de chauffe.

#### **La bouse de vache**

Comme pour les herbes sauvages, l'utilisation de la bouse de vache comme combustible domestique est, dans les villages de la zone inondable, immémoriale. Elle concerne généralement plus de 70 % des ménages.

#### **Une situation difficile à améliorer**

Dans les villages de la zone inondable, les combustibles accessoires sont utilisés comme combustible domestique exclusif ou dominant pendant la période d'inondation; dans les villages de la zone exondée, ils ne jouent qu'un rôle complémentaire par rapport au bois de chauffe. Il semble à l'heure actuelle difficile, voire impossible, d'améliorer l'utilisation des résidus agricoles ou pastoraux dans le Pondsori.

- L'attitude des paysans par rapport à l'arbre: les produits de cueillette

Dans cette zone peu et mal pourvue en ressources végétales naturelles, une large proportion des essences ligneuses présentes est utilisée à des titres divers. Cela implique qu'une attention particulière et des efforts réels soient consacrés pour maintenir la variété de la flore.

- L'attitude des paysans par rapport à l'arbre: les plantations forestières et arborées

Les populations expriment de diverses manières, mais très généralement, une claire conscience de la rareté des produits de l'arbre disponibles dans la zone d'étude, mais cela n'influe pas directement sur l'attitude des paysans par rapport à la plantation de l'arbre. Celle-ci est conditionnée par d'autres facteurs et résulte de façon complexe à la fois des conditions locales (disponibilités foncières, organisation de la société villageoise, composition ethnique,...) et des relations avec les administrations et les organismes de développement (l'Administration fores-

tière, mais aussi les ONG, Organisations Non Gouvernementales), comme des modalités des actions entreprises pour inciter les populations rurales à planter l'arbre.

#### **■ Les principaux résultats de recherche obtenus dans le département de l'Atlantique au Bénin**

Sans entrer dans le détail des résultats présentés au tome II du rapport «Pénurie de bois et passage de l'autoconsommation à la commercialisation rurale et urbaine du bois de feu dans le département de l'Atlantique au Bénin», il importe de souligner ici de façon synthétique les principaux résultats obtenus au cours de la réalisation des travaux de recherche.

- Un régime foncier transformé et encore en mutation

Le département de l'Atlantique présente un régime foncier relativement spécifique puisqu'on y est passé en quelques décennies d'un régime de gestion des terres selon le schéma traditionnel en Afrique de l'Ouest par des maîtres de terre à une généralisation d'un système de quasi-propriété privée.

- Un système agraire relativement uniforme, mais en crise

Les paysans du département de l'Atlantique sont parfaitement conscients individuellement et collectivement d'être confrontés à une crise majeure de leur système de culture et de se trouver actuellement enfermés, pour la plupart d'entre eux, dans un véritable cercle vicieux de sur-exploitation des terres cultivées, de raccourcissement de la jachère, de dégradation de la fertilité des sols et de baisse des rendements agricoles.

- Le bois: une ressource monétaire indispensable pour les paysans

Le bois contribue en moyenne aux revenus pour une part comprise entre 5.000 et 10.000 F CFA/personne et par an; il représente la source de plus d'un tiers du revenu monétaire. Cela explique qu'un paysan de l'Atlantique nous

ait déclaré: «Pour négliger de vendre le bois de défriche des jachères, il faut être fou ou millionnaire», et que la majorité d'entre eux déclarent qu'il s'agit pour eux d'un revenu secondaire, mais important et surtout indispensable.

- Une préoccupation majeure pour les paysans: la fertilité des sols

Dans le département de l'Atlantique, la jachère est une jachère forestière et donc l'arbre joue un rôle central dans la reconstitution de la fertilité. Mais l'arbre ne disparaît pas complètement avec l'exploitation du bois, le défrichement et la remise en culture de la parcelle, il subsiste quelques arbres que le paysan conserve dans la parcelle cultivée et surtout il reste dans la parcelle cultivée les souches vivantes des arbres qui reconstitueront la prochaine jachère.

- Une régression actuelle des activités forestières dans le département de l'Atlantique et ses causes; la commercialisation du bois-énergie vers Cotonou

Les différentes enquêtes réalisées permettent de dresser un schéma d'ensemble des diverses chaînes de production-commercialisation du bois-énergie à partir du département de l'Atlantique vers le marché urbain de Cotonou. Elles permettent aussi d'apporter beaucoup d'informations sur les stratégies et les revenus des acteurs et d'apprécier le rôle particulier joué par le département de l'Atlantique dans l'approvisionnement en bois-énergie de la capitale.

- Les produits forestiers autres que le bois-énergie dans le département de l'Atlantique; l'utilisation énergétique des sous-produits agricoles

La production paysanne des perches de teck est en régression du fait de la crise durable de surproduction de ce produit qui conduit les paysans à arracher les souches et à reconvertir les sols vers d'autres spéculations agricoles. Les produits de cueillette ne jouent dans le département de l'Atlantique qu'un rôle très secondaire. Les

sous-produits agricoles ayant une utilisation énergétique sont principalement les sous-produits du palmier à huile.

### *Les questions nouvelles et les problèmes mis en lumière par l'opération de recherche*

#### ■ Dans le Pondori et dans le Delta intérieur du Niger au Mali

Dans le Pondori, comme ailleurs et particulièrement dans tout le delta intérieur du Niger au Mali (dont le Pondori, malgré ses spécificités peut être considéré comme un élément représentatif et caractéristique), le thème du bois-énergie renvoie aux problèmes de gestion des ressources naturelles et de l'utilisation des espaces couverts par la végétation ligneuse naturelle.

Ces espaces occupent dans le Pondori, comme dans le delta, des superficies restreintes à une part résiduelle des zones exondées. Ces espaces sont évidemment particulièrement disputés et leur devenir pose le problème des relations entre les différents systèmes de production ruraux coexistant dans la zone:

- systèmes d'agriculture de décrue,
- systèmes d'agriculture pluviale,
- systèmes pastoraux,
- systèmes piscicoles.

C'est cette question des relations entre les divers systèmes de production ruraux présents dans la zone qui apparaît maintenant comme la question fondamentale pour une compréhension plus approfondie et moins descriptive du problème du bois-énergie et de sa relation avec les autres composantes de la vie des exploitations agricoles, pastorales et piscicoles.

#### ■ Dans le département de l'Atlantique au Bénin

Le problème nouveau qui est maintenant identifié comme un des plus importants à résoudre est celui des méthodes à mettre en oeuvre pour une diffusion aussi spontanée et autonome que possible des modèles techniques proposés aux paysans. Il y a là un véritable thème de recherche à la fois sociologique, anthropologique et économique sur lequel des travaux devront être menés comme cela est explicitement proposé au chapitre suivant.

### *Propositions d'actions à partir des résultats de la recherche*

#### ■ Un projet de recherche-développement concernant l'ensemble du delta intérieur du Niger au Mali

L'équipe de recherche a élaboré une proposition d'action de recherche-développement visant à résoudre une partie des problèmes étudiés et à mettre au point un arsenal de solutions techniques, socio-économiques, organisationnelles et institutionnelles plus performantes.

La sylviculture (au sens large) est très peu développée à l'intérieur de la zone inondable du delta intérieur du Niger, il n'existe pas de résultats de recherche fiables sur les essences forestières à proposer aux paysans dans des conditions physiques particulièrement difficiles caractérisées par l'inondation pendant plusieurs mois et une sécheresse très prononcée pendant le reste de l'année sur des sols généralement lourds et peu percolants. Ceci explique le très faible taux de réussite des actions de plantations villageoises réalisées dans la zone.

On observe par ailleurs, du fait de la sécheresse, l'apparition de nouveaux peuplements forestiers spontanés sur des sols antérieurement inondés régulièrement et que la baisse du niveau des

crues a contraint l'agriculture à abandonner. Ces peuplements forestiers sont susceptibles de répondre aux importants besoins d'énergie domestique des populations rurales de la zone, mais sont menacés par les pratiques d'émondage prédatrices et destructives de certains pasteurs (troupeaux ovins et surtout caprins). Il apparaît donc nécessaire d'imaginer et de mettre en place des modes de gestion sylvicoles et pastoraux assurant à la fois une production pérenne de bois et de fourrage aérien tout en garantissant la permanence des peuplements.

Ce projet pourrait être intitulé comme suit:

«Projet de recherche-développement pour la gestion des ressources ligneuses naturelles et l'agro-foresterie dans le delta intérieur du Niger au Mali».

Ce projet pourrait être structuré en deux volets:

- volet «Recherches forestières et agro-forestières»,
- volet «Développement en milieu paysan de l'agro-foresterie et de la gestion des ressources ligneuses naturelles».

#### ■ Le projet proposé au terme de cette recherche pour le département de l'Atlantique au Bénin

L'objectif de cette recherche était de pouvoir proposer des actions susceptibles d'aider à résoudre les problèmes étudiés et de sortir du cercle vicieux de sur-exploitation des terres cultivées, de raccourcissement de la jachère, de dégradation de la fertilité des sols et de baisse des rendements agricoles.

C'est pourquoi on présente maintenant une proposition de projet pilote agro-forestier qui devrait constituer une première étape courte (sur 4 ans) de diffusion en milieu paysan des modèles agro-forestiers établis sur la base des travaux de la FSA et de l'équipe de recherche.



Ce projet pourrait être présenté à un financement par la Commission des Communautés Européennes (FED) conjointement par le MDRAC, la FSA et le CIRAD/CTFT, comme l'aboutissement du travail de recherche mené sur financement de la Commission des Communautés Européennes dans le cadre de STD II (DG XII).

Ce projet pourrait être intitulé comme suit:

«Projet pilote agro-forestier de rénovation de la jachère et de restauration de la fertilité des sols agricoles dans le département de l'Atlantique».

Ce projet pourrait être structuré en quatre volets:

- volet «Opération pilote de test et de diffusion de modèles agro-forestiers en milieu paysan»;
- volet «Etudes foncières et aménagement de l'espace départemental»;
- volet «Recherche agro-forestière en station sur *Acacia auriculiformis*»;
- volet «Contribution à la formation sur l'agro-foresterie».

Nous proposons que ce projet soit réalisé sous la tutelle du MDRAC, Ministère du Développement Rural et de l'Action Coopérative, et que sa réalisation soit confiée à un groupe constitué principalement par:

- une ONG béninoise ayant à la fois des compétences en agro-économie et en gestion de l'environnement,
- le CIRAD/CTFT.

D'autres intervenants pourraient être associés pour la réalisation d'un ou plusieurs des trois volets du projet proposé:

- la FSA, Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université de Cotonou
- le CNEARC, Centre National d'Etudes Agronomiques des Régions Chaudes (Montpellier, Prof. F. Mary)

- l'Université de Paris I (Laboratoire d'Anthropologie juridique, APRE-FA; Prof. E. Le Roy)
- l'Université de Hohenheim (Allemagne, Stuttgart; Centre tropical, Prof. von Oppen)
- la DRA, Direction de la Recherche Agronomique au Bénin.

### ***Conclusion générale: les résultats communs des travaux réalisés au Mali et au Bénin***

Au terme des travaux de cette Opération de Recherche, il apparaît possible, par delà la masse très considérable des résultats obtenus de dégager quelques conclusions générales importantes.

#### **■ La gestion de l'arbre et des ressources naturelles sont des révélateurs des systèmes agraires**

Le rôle de l'arbre et l'état des ressources naturelles résultent de l'impact des pratiques et des stratégies paysannes qui façonnent l'espace pour assurer le bon fonctionnement des systèmes agraires. En ce sens, les modes de gestion de l'arbre et des ressources naturelles sont des résultantes des systèmes agraires en place, de leurs problèmes et leurs évolutions.

C'est bien ce que montrent tant les travaux réalisés dans le Pondori où la place résiduelle et pourtant indispensable des formations ligneuses naturelles résulte des inter-relations entre les différents systèmes de production ruraux, que les résultats obtenus dans le département de l'Atlantique où il apparaît que la persistance actuelle de la pratique des jachères et l'évolution des systèmes agraires qu'elle traduit (à l'inverse de ce qui est constaté dans le département voisin du Zou) résultent de l'existence du marché du bois à

Cotonou et des ressources qu'il procure aux paysans.

#### **■ Les produits forestiers et les revenus qu'ils procurent sont indispensables au fonctionnement des systèmes agraires et à leur reproduction**

Bien que les ventes de bois ou d'autres produits forestiers ne soient jamais la principale source de revenu monétaire pour les paysans et que les activités correspondantes puissent toujours être qualifiées de «secondaires» (par rapport aux activités principales que sont généralement l'agriculture, l'élevage ou la pêche), il apparaît que ces revenus «forestiers» sont jugés dans la plupart des cas indispensables par les paysans.

Une différence existe néanmoins à ce sujet entre le Pondori au Mali et le département de l'Atlantique au Bénin:

- au Mali, dans le Pondori, les revenus «forestiers» des paysans sont faibles voire très faibles, ils n'en sont pas moins indispensables;
- au Bénin, dans le département de l'Atlantique, le bois de feu assure environ le tiers des revenus monétaires des paysans qui pratiquent cette activité; les revenus sont souvent jugés importants mais ils sont beaucoup plus souvent indispensables.

Le caractère indispensable des produits forestiers résulte:

- dans certains cas, de ce que les produits forestiers répondent à des besoins que les populations rurales ne pourraient pas résoudre sans eux: pharmacopée, énergie domestique, bois de construction, ...
- dans d'autres, et c'est en particulier le cas dans le département de l'Atlantique au Bénin, les revenus monétaires des produits forestiers sont indispensables pour assurer la reproduction des systèmes agraires.

- Le bois-énergie, le foncier et les produits de cueillette constituent de bonnes «entrées» opérationnelles pour la compréhension des systèmes agraires et de la gestion des ressources naturelles

Dans ces conditions, il apparaît que les thèmes:

- du bois-énergie ou de l'énergie domestique,
- du foncier et de la gestion de l'espace et des ressources naturelles,
- des produits de cueillette,

constituent de bons thèmes d'investigation pouvant être considérés comme des «entrées» pour accéder plus facilement à la compréhension des systèmes agraires, de leurs contraintes et blocages et des solutions mises en pratique ou acceptables par les populations rurales pour les faire évoluer.

De même, l'«entrée» de l'arbre ou du bois-énergie débouche directement

sur le problème de la gestion des ressources naturelles.

Cette conclusion qui valide la démarche scientifique qui a présidé à l'élaboration de la proposition de recherche nous paraît particulièrement importante et justifie la poursuite proposée des travaux.

### *Les publications en cours ou à venir*

La dispersion géographique et institutionnelle des membres de l'équipe de Recherche ne facilite pas l'établissement d'une liste exhaustive des publications envisagées ou déjà en cours de rédaction:

«*Faidherbia albida*: une essence anthropique, oui, mais parfois aussi une essence pionnière; l'exemple du bassin du Poudori au Mali»: cet article déjà rédigé par A. Bertrand et A.L. Berthé devrait être publié dans un prochain cahier scientifique du CTFT/CIRAD consacré aux travaux réalisés sur le *Faidherbia albida*.

«Agro-foresterie au Sud-Bénin, quel modèle et comment ?»: cet article rédigé par J.M. Petit a été présenté aux «Journées agro-forestières» or-

ganisées par le CIRAD/CTFT en 1989 et devrait être prochainement publié.

«Les revenus du bois et des produits forestiers en milieu rural»: cet article est en cours de rédaction par A. Bertrand et devrait être présenté en 1992 dans le cadre d'un groupe de travail (consacré aux aspects économiques et sociaux des forêts dans les pays en développement) de l'IUFRO (Union Internationale des Centres de Recherche Forestière) à Berlin à l'occasion du 20<sup>e</sup> anniversaire de cette organisation.

«Le paysans et la plantation d'arbres; la sylviculture paysanne, le foncier et le marché»: cet article est également en cours de rédaction par A. Bertrand à partir des résultats obtenus au Mali, au Bénin, mais aussi à Madagascar (dans un autre cadre institutionnel) et devrait être présenté pour publication en 1992.

«Bois-énergie, jachères et systèmes agraires au Sud-Bénin»: cet article en cours de conception devrait associer A. Bertrand, T. Ahouansou, Y. Schenkel et J.M. Petit; le texte devrait être préparé et finalisé pour la fin 1992 ou le début 1993.

«Les combustibles non ligneux dans la région du Poudori au Mali»: cet article en préparation sera rédigé par Y. Schenkel; le texte devrait être finalisé pour la fin 1992.

«La valorisation énergétique du palmier et de la fabrication de l'huile de palme dans le milieu rural du département de l'Atlantique au Bénin»: cet article en préparation sera rédigé par Y. Schenkel; le texte devrait être finalisé au Bénin.

Numéro de contrat : TS2-A-081  
Contract number :

▼ TITRE : ***Etude de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes, forestières et graminéennes, dans le but de leur aménagement au Sénégal. \****

Title : *Study of the productivity and growth of natural mixed formations composed of trees and grass in Senegal for management purposes.*

▼ CHEF DE PROJET : J.P. Goudet, (Division Production Forestière du CTFT)  
Project leader : P.N. Sall, (ISRA-DRPF, Sénégal)

▼ INSTITUTION-HOTE : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique  
Host institution : pour le Développement, Département des Forêts, (CIRAD-ex Centre Technique Forestier Tropical).

▼ ADRESSE : Avenue de la Belle Gabrielle 45 bis,  
Address : 94736 Nogent sur Marne, France.

▼ TELEPHONE : +33-1-43 94 43 00

▼ FAX : +33-1-43 94 43 81

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES : - Sénégal : ISRA-DRPF - BP 2312, Dakar.  
Associated Institutions :

▼ MOTS CLES : aménagement forestier; forêt tropicale sèche; inventaire forestier;  
Key words : productivité; accroissement; sénégal.  
forest management; tropical woodland; forest inventory; productivity; growth; senegal.

▼ RAPPORT FINAL : 86p. Français (+ annexes).  
Final report :

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-235, p. 340

# Etude de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes, forestières et graminéennes, dans le but de leur aménagement au Sénégal

## Objectifs

Les lacunes dans le domaine de la méthodologie liée aux inventaires et à leur traitement informatique, ainsi que dans le domaine de la productivité des formations de la zone sèche, méritaient un effort de recherche.

Les principaux objectifs étaient les suivants :

- approfondir les résultats acquis lors de la première phase;
- connaître la productivité naturelle en bois de feu et la croissance des formations ligneuses naturelles dans différentes zones écologiques;
- quantifier la productivité obtenue dans des conditions simples d'aménagement telles que la mise en défens contre le feu et le bétail, et l'exploitation en taillis ou taillis sous-futaie;
- améliorer les techniques de mesure et d'estimation des volumes utilisés dans ce type de formation ligneuse;
- renforcer l'activité de l'ISRA dans le domaine de la connaissance de la productivité de ces formations.

## Matériel et méthodes

Les parcelles permanentes ont été installées dans trois sites différents : à Vélor au Siné-Saloum ainsi qu'à Séfa et aux Bayottes en Casamance. Dans chacune de ces trois expérimentations, on a voulu étudier l'effet de traitements sylvicoles simples sur les formations existantes. Chaque traitement a été répété quatre fois.

### ■ Dispositifs particuliers

A Vélor : quatre traitements ont été appliqués au début de l'année 1987:

- Pas d'exploitation en 1987; pas de protection contre le bétail.
- Pas d'exploitation en 1987; grillage de protection.
- Exploitation en taillis simple en 1987; pas de protection.
- Exploitation en taillis simple en 1987; grillage de protection.

A Séfa : 8 traitements ont été mis en place:

- Pas d'exploitation en 1987; pas de protection contre le bétail, feu précoce
- Pas d'exploitation en 1987; grillage de protection, feu précoce.
- Exploitation en taillis sous-futaie en 1987; pas de protection (bétail); feu précoce.

- Exploitation en taillis sous-futaie en 1987; grillage de protection, feu précoce.
- Pas d'exploitation en 1987; pas de protection, pas de feu précoce.
- Pas d'exploitation en 1987; grillage de protection; pas de feu précoce.
- Exploitation en taillis sous-futaie en 1987; pas de protection, pas de feu précoce.
- Exploitation en taillis sous-futaie en 1987; grillage de protection; pas de feu précoce.

Aux Bayottes : quatre traitements ont été installés:

- Pas d'exploitation en 1987; pas de protection contre le bétail.
- Pas d'exploitation en 1987; grillage de protection.
- Exploitation en taillis sous-futaie en 1987; pas de protection.
- Exploitation en taillis sous-futaie en 1987; grillage de protection.



Figure 1 - Mesure du diamètre des arbres au ruban forestier à Vélor.

Le CIRAD-Forêt, après avoir initié et soutenu ce projet, s'est limité contractuellement à un rôle d'appui aux recherches :

- élaboration de la méthodologie et 4 missions d'appui durant la première phase;
- une mission d'appui en janvier 1992, dont le rapport de mission détaillait toutes les études à entreprendre avant la fin du contrat;
- un stage de formation durant la première phase et deux stages de formation (en France au CIRAD-Forêt en 1992) à l'outil informatique pour deux ingénieurs sénégalais;
- élaboration des programmes de traitement informatique des données.

L'action de l'ISRA-DRPF était centrée sur la réalisation pratique, à travers ses ingénieurs, techniciens et personnels de terrain sur les 3 sites : Vélor, Séfa, Bayottes. La maintenance des dispositifs expérimentaux, les inventaires périodiques et les études annexes (pédologiques, climatiques, agrostologiques), la saisie, le dépouillement et le traitement des données sur ordinateur étaient du ressort de l'ISRA-

DRPF, ainsi que l'établissement de tarifs de cubage.

Des événements politiques graves se sont produits en Casamance, ce qui n'a pas permis de mener à bien l'encadrement des équipes de comptage sur le terrain; et en outre ces événements ont empêché de réaliser les inventaires finaux en 1993 aux Bayottes et à Séfa.

Ainsi, les inventaires intermédiaires n'ont pas pu être contrôlés et apurés pour ce qui est des trois dispositifs et ce n'est que pour le site de Vélor qu'un inventaire final a pu être réalisé et que des résultats fiables sont donc disponibles.

## Résultats

### ■ Première phase (1985-1987)

- l'identification, la délimitation et la protection des répétitions dans les trois sites;
- l'inventaire exhaustif initial de toutes les parcelles traitées ou non (témoins);

- l'exploitation (en taillis simple ou en taillis sous-futaie) selon le protocole établi;
- le calcul de tarifs de cubage (individuels et de peuplement);
- quatre missions d'appui au Sénégal;
- un stage de biométrie en France pour un ingénieur sénégalais.

### ■ Deuxième phase (1988-1993)

- un inventaire annuel exhaustif de la futaie;
- un inventaire annuel partiel, sur échantillon, du taillis;
- des études de milieu (sol, végétation);
- une mission d'appui au Sénégal d'une semaine (janvier 1992);
- une mission d'un mois au Sénégal (octobre 1993) pour l'inventaire final de Vélor<sup>(1)</sup>;
- deux stages en biométrie en France au profit de deux chercheurs sénégalais;
- quatre rapports annuels traitant des inventaires annuels et leur exploitation, sommairement présentés (histogrammes d'effectifs par parcelles pour la futaie seule).

	Non exploité		Exploité	
	Non clôturé	Clôturé	Non clôturé	Clôturé
Composition floristique	Pas d'effet observé			
petites tiges dont	<<	<	>	>>
<i>Acacia seyal</i>	<<	<	>	>
<i>Dicrostachys</i>	>	>>	>	>
<i>Grewia</i>	>	>>	>	>
<i>Guiera</i>	-	-	<	<
<i>Lannea</i>	-	-	<	>
<i>Anogeissus</i>	-	-	-	>
moyennes tiges	>	>>	-	-
Surface terrière	pas d'effet observé (bloc 4)			
peuplement initial jeune				
sinon	>	>	>>	>>
Volume	>	>	-	-

< indique une diminution, << indique une forte diminution;

> indique une augmentation, >> indique une forte augmentation.

Figure 2 - Récapitulation des effets observés par traitement (entre 1987 et 1993 exclusivement à Vélor).

(1) rappel : seules les données de Vélor sont fiables (exclusivement celles des inventaires initial et final).

## Conclusions et discussion

### ■ Conclusions

Nous sommes en présence d'une forêt assez robuste, à base d'*Acacia seyal*, qui contribue très largement à la productivité de cette forêt soudano-sahélienne.

L'exploitation par coupe à blanc induit un effet positif sur la régénération naturelle, sans pour cela créer de perte sur la diversité botanique. Rappelons que la régénération dont il est question dans ce rapport est constituée principalement de rejets de souche, de semis naturels et de drageons, sans que l'on puisse les quantifier séparément.

La clôture, qui ne protège que des dégâts occasionnés par le bétail domestique (et non de la faune sauvage), a un effet bénéfique sur l'effectif de petites tiges.

L'exploitation en coupe rase ne peut être envisagée que sur de faibles surfaces, si l'on veut éviter les problèmes liés à l'érosion et conserver une certaine ambiance forestière. En conséquence, l'aménagement qui pourrait être conseillé, devrait proposer des coupes à blanc non contiguës à réaliser progressivement dans le temps, ce qui correspond à ce que les villageois pourraient mettre en place, dans le cadre d'une gestion participative.

### ■ Améliorations générales à apporter à ce type de dispositif

Ce type d'expérimentation ne peut être réellement valorisé que s'il est poursuivi pendant une trentaine d'années. Durant cette période, les équipes de terrain qui se succèdent dans le temps doivent adopter une même rigueur scientifique et doivent assurer un suivi permanent des parcelles d'essai. Au vu des résultats des inventaires intermédiaires (1988 à 1992), il semble que ce genre d'essais implique une bonne acceptation des règles de recherche et un respect intégral de la méthodologie

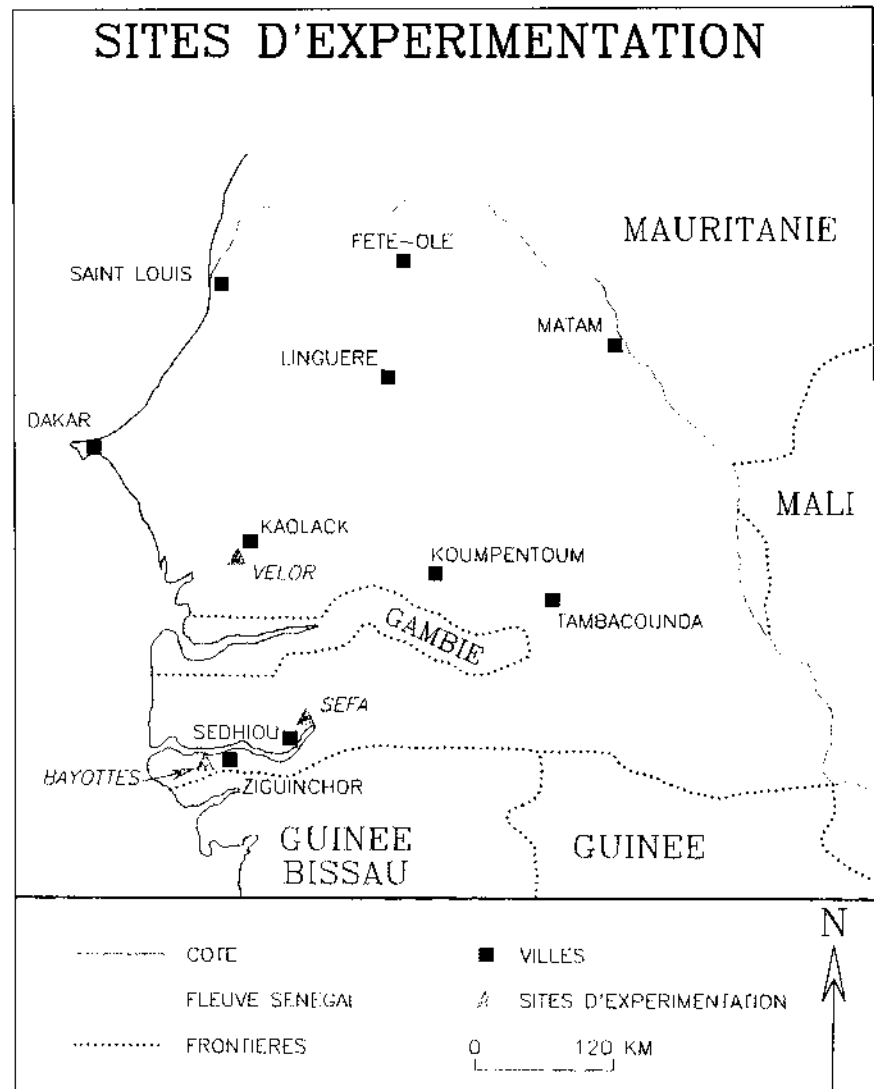


Figure 3 - Situation des trois expérimentations.

d'une année à l'autre. Ces conditions n'ont pu être contrôlées par l'équipe sénégalaise, en particulier du fait de l'insécurité.

Il semble nécessaire d'alléger le programme de prises de mesure et de remplacer les inventaires annuels par un inventaire précis et complet tous les 3 ou 4 ans, tout en assurant une présence quasi-continue. Ceci pourrait être réalisé, en associant plus étroitement les services forestiers locaux. Il n'y a que le service forestier qui puisse assurer la viabilité des expérimentations et la pérennité de l'ensemble du dispositif. La pose de rubans dendrométriques sur quelques espèces en fonction des classes de diamètre et leur surveillance pourrait être confiée au

service forestier local. Des passages répétés du feu ont perturbé les dispositifs expérimentaux: ainsi, à Vélor, un incendie en 1987, a eu un impact certain sur la régénération naturelle; aucune cartographie du passage du feu n'a été réalisée. Il convient de motiver les populations locales et le service forestier en leur accordant une prime annuelle lorsqu'il n'y a pas eu de feux tardifs à déplorer.

La délimitation des placettes ou layons a, semble-t-il, été réalisée de manière variable d'une année à l'autre. Les mêmes arbres n'ont pas été mesurés d'une année à l'autre. La numérotation individuelle sur l'écorce, à 1 mètre de haut, doit être reprise chaque année pour les arbres de la futaie.

Le traitement des données d'inventaire doit impérativement débiter immédiatement après l'inventaire (notamment saisie et apurement); les données de l'inventaire doivent être comparées aux mesures de l'année précédente. Toute anomalie décelée doit faire l'objet d'une vérification immédiate sur le terrain. De même, un contrôle rigoureux de la saisie informatique des données doit être réalisé. Une prime d'encouragement pourrait être attribuée lorsque les résultats sont cohérents.

Même si les clôtures paraissent partout en parfait état dans les dispositifs, il est impératif de programmer un contrôle fréquent pour réparer les éventuels dégâts constatés (chute d'arbres ou de branches, enlèvement des lianes, dégradation volontaire, ...).

L'étude du type de régénération naturelle doit être envisagée; elle porterait sur une à deux années après l'application du traitement sylvicole et aurait pour but de déterminer pour chaque espèce la part de régénération attribuée aux semis, aux drageons, ainsi qu'aux rejets.

Une bonne connaissance de la répartition spatiale, pour les espèces intéressant les riverains et les forestiers, permettrait d'améliorer la conception des plans d'aménagement. Ce type d'étude peut être envisagé à l'aide des systèmes d'information géographique.

Dans ce type de formations mixtes, il est également indispensable d'améliorer la compréhension de son fonctionnement, notamment en ce qui concerne la production graminéenne et les produits non ligneux.



*Figure 4 - Mesure des hauteurs à Vélor. Bloc 4 Thiénéké.*



*Figure 5 - Pâturage dans une parcelle non clôturée à Vélor. Bloc 3 Boli.*

*Liste des rapports  
disponibles  
(deuxième phase)*

1	I. Thomas ISRA-DRPF	1990	Contrat TSD n° TS2-0081-F CEE/CIRAD-CTFT. Renforcement des activités de recherche menées dans les pays africains dans le domaine de la connaissance de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes forestières et graminéennes dans le but de leur aménagement. Rapport technique d'activités - juillet 1990. (Inventaire de janvier - février 1990).
2	I. Thomas ISRA-DRPF	1991	Rapport d'activités du projet "formations naturelles" (juillet 1990 à février 1991). Renforcement des activités de recherche menées dans les pays africains dans le domaine de la connaissance de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes forestières et graminéennes dans le but de leur aménagement (février 1991).
3	I. Thomas ISRA-DRPF	1991	Projet TSD TS2-0081-F (CEE/CTFT/ISRA). Renforcement des activités de recherche menées dans les pays africains dans le domaine de la connaissance de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes forestières et graminéennes dans le but de leur aménagement. Rapport technique d'activités - septembre 1991 (Inventaires de janvier 1991).
4	C. Barbier CIRAD-Forêt	1992	Contrat TSD TS2-0081 F (CEE/CTFT/ISRA). Renforcement des activités de recherche menées dans les pays africains dans le domaine de la connaissance de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes forestières et graminéennes dans le but de leur aménagement. Rapport de mission au Sénégal (19 au 26 janvier 1992).
5	K. Dieye ISRA/LNERV	1993	Etude de l'influence d'un type d'exploitation forestière sur l'évolution de la flore et de la production primaire des communautés herbacées.
6	Bureau Pédologique du Sénégal	1993	Etude de la forêt de Vélor : reconnaissance pédologique.
7	I. Thomas ISRA/DRPF	1993	Projet TSD TS2-0081-F (CEE/CTFT/ISRA). Renforcement des activités de recherche menées dans les pays africains dans le domaine de la connaissance de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes forestières et graminéennes dans le but de leur aménagement. Rapport technique d'activités et annexes - avril 1993 (Inventaire de février 1992).
8	I. Thomas ISRA/DRPF	1993	Projet TSD TS2-0081 F (CEE/CTFT/ISRA). Renforcement des activités de recherche menées dans les pays africains dans le domaine de la connaissance de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes forestières et graminéennes dans le but de leur aménagement. Rapport technique d'activités et annexes - octobre 1993 (Inventaire de février 1993).



Contract number : TS2-A-093  
 Numéro de contrat :

- |   |   |
|---|---|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Controlled mycorrhization applied to improving the productivity of industrial plantations of eucalypts in the wet tropics. *</i></b>  |
| Titre :   | <i>Mycorrhization contrôlée appliquée à l'amélioration des plantations industrielles d'eucalyptus dans les tropiques humides.</i>   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | J. Garbaye  |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Institut National de la Recherche Agronomique, INRA.  |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Rue de l'Université 145,<br>75007 Paris, France.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +33-1-42 75 90 00   |
| ▼ FAX :   | +33-1-42 75 94 86   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- France : Université de Nancy I, Laboratoire de Biologie des Ligneux, and CIRAD-Forêts, (ex-CTFT).</li> <li>- Portugal : Estação florestal national.</li> <li>- Brasil : Universidade federal de Santa-Catarina and Universidade federal de Viçosa.</li> <li>- Congo : Centre du Congo du Centre technique forestier tropical.</li> </ul> |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | <p>eucalypts; ectomycorrhizas; symbiotic specificity; mycorrhizal inoculation.</p> <p><i>eucalyptus; ectomycorrhizes; spécificité symbiotique; inoculation de mycorrhizes.</i></p>  |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 24p. French.  |

\* see also STD1 Publication, 1989; TSD-144/171 project, p. 336

# Controlled mycorrhization applied to improving the productivity of industrial plantations of eucalypts in the wet tropics

## Objectives

The work done in the previous STD1 programme was successful in applying controlled mycorrhization to pines in the Congo and had shown that interesting growth effect could also been recorded with eucalypts; however, it also suggested that the stability and efficiency of the ectomycorrhizal symbioses obtained by artificial inoculation of eucalypts were highly dependant on the fungal strains used. Unfortunately, very little was known about the biology and specificity patterns of the symbionts of eucalypts.

The aim of this second contract was to approach the problem both from a fundamental viewpoint, building up new knowledge on the mycorrhizal symbioses of eucalypts (types and distribution, specificity, infection processes, effect of some environmental factors) and from a technical viewpoint (inoculation techniques, selection of efficient fungal strains, experimental plantations).

## Material and methods

The mycorrhizal status of eucalypt in plantation (Congo and Brasil) and native stands (Australia and Papua-New Guinea) was assessed by describing mycorrhizal morphotypes and associated fungal sporocarps. Comparisons were also made with ectomycorrhizal native tree species in nearby natural forests in Congo and Brazil. In Australia and Papua-New Guinea, cultures were attempted from all the sporocarps sampled.

The mechanisms of the plant-fungus specificity, as well as the interactions

between ectomycorrhizas and arbuscular endomycorrhizas, were investigated with a simplified and standardized biological model, young eucalypt plantlets grown for a few weeks with the fungus in aseptic Petri dishes. The results of the comparison between different fungal strains and eucalypt species were then examined by transmission electron microscopy (using cytoenzymological markers) and biochemical analyses.

The same experimental model was used for studying the effect of drought stress on the symbioses. The water potential was controlled either in the growth medium with concentrations of polyethylene glycol or in the atmosphere with saturated saline solutions.

The ability of the fungal strains to solubilize rock phosphate and transfer orthophosphate to the root was tested by aseptically culturing the mycelium in a liquid medium containing suspended rock phosphate and measuring the quantities of P released in the medium or accumulated in the hyphae.

Pot experiments, either in the nursery or in the glasshouse, were used for studying the effect of environmental factors on ectomycorrhiza formation and for optimizing inoculation techniques. All the mycelial inocula used in these experiments were prepared by a solid fermentation technique, with a vermiculite-peat substrate.

Seven comparative plantations of planting stocks artificially inoculated in the nursery have been made in Portugal and Brasil. They compare different strains of *Cenococcum geophilum*, *Pisolithus tinctorius* and some

Australian isolates of undetermined hypogeous gasteromycetes with non-inoculated (i.e. mycorrhizal with indigenous fungi) seedlings.

## Results

### ■ Mycorrhizal status of tropical eucalypts in their native area

New knowledge about the fungal associates of tropical eucalypts in their native area is now available; among those associates most likely to help for practical applications : hypogeous gasteromycetes are dominant; *Pisolithus* and *Scleroderma* species are rare in the wettest zones. This work also provided a collection of fungal strains in pure culture which was distributed among the participants to the project, in order to be experimentally tested in various environmental conditions.

### ■ Mycorrhizal status in plantations outside native areas of eucalypts

The situation is somewhat different in the two continents. In Africa, ectomycorrhizas are common and diverse with *Caesalpinaceae* in native forests, but only one type (due to a *Scleroderma*) was found with introduced eucalypts; this suggests that most native fungi are incompatible with eucalypts. In South America, the abundance and diversity of ectomycorrhizal fungi in native forests are even higher due to the presence of *Myrtaceae*, and four mycorrhizal types were found with eucalypts. However, some of them (*Cenococcum geophilum*, *Scleroderma paraguayense*) are common to native *Myrtaceae* and to eucalypts (which belong

to the Myrtaceae) while others are associated only with eucalypts (*Pisolithus tinctorius*, *Laccaria* sp.). This, again, suggests a strong host-specificity of the locally-available potential fungal symbionts.

From a practical point of view, it means that compatibility/aggressiveness is an important factor to be considered when screening fungal strains for their use in controlled mycorrhization programmes. At that point, understanding the mechanisms of specificity was a priority.

### ■ The mechanisms of specificity

Strains of *Pisolithus tinctorius* from the native area of tropical eucalypts (North Queensland) form mycorrhizas more quickly than those associated with pines in North America. In the former case, only bridges of glycoproteic fibrils link the fungus and the cortical cells of the root as from the second day of contact, and acid phosphatase activity is intense in the plasmalemma of the hyphae closest to the root. In contrast, with pine isolates, a defense reaction of the plant (parietal thickening of the root cells) is observed.

Root chitinase activity and some phenolic compounds are early markers of the plant-fungus compatibility. The fungal signal molecules inducing this reaction of the root are presently traced, purified and identified.

We have also shown that the aggressiveness (rapidity of infection) of a given compatible fungal strain varied greatly depending on the eucalypt species; for instance, *Eucalyptus dunii* and *E. viminalis* (both belonging to the *Symphomyrtus* section according to the classification of Pryor and Jonson) display different rates in mycorrhizal colonization in pot experiments.

All these results confirm the hypothesis of a geographic/taxonomic specificity in the ectomycorrhizal associations with eucalypts. This implies that

the fungal strains for controlled mycorrhization should be selected according to their aggressiveness and should have a wide host-range among the tropical eucalypts. Our results also provide biochemical markers of the compatibility, making it possible to screen fungal strains in the laboratory for their aggressiveness.

### ■ Interactions between ectomycorrhizas and arbuscular endomycorrhizas

The mycorrhizal status of commercial (non inoculated) eucalypt planting stocks was monitored from the nursery to 18 months after outplanting in different sites in Brazil. Arbuscular endomycorrhizas (AM) are dominant on the young seedlings but rapidly replaced by ectomycorrhizas (ECM) after outplanting. This justifies the choice of ECM for controlled mycorrhization (ECM are the only symbioses useful to the tree in the long term) but it also suggests a range of questions relative to the inoculation techniques : can EM compete with ECM ? Are AM a necessary step before ECM establishment ? Are they synergistic while cohabitating ?

These interactions have been studied more in detail *in vitro* and in pot experiments. The results show that the two types of symbioses can easily coexist very early in the long roots of eucalypt plantlets : the ectomycorrhizal fungus occupies the outer cortex and the AM fungus the inner cortex. The latter can continue to colonize the root from the inside, but new primary AM infections from propagules in the soil are impossible because of the ectomycorrhizal mantle. Moreover, when the two fungi come into contact, the balance of the mutual growth reduction is in favor of the ECM fungus.

All this explains why AM are progressively replaced by ECM; but not why AM precede ECM in a natural succession. The most probable hypothesis in this respect is that natural ectomycorrhizal inoculum is specific, rare, er-

atic and slow to develop, or even destroyed by soil perturbations (fire, erosion, ploughing) before natural regeneration or planting. In contrast, AM fungi are always ready because of short-cycle herbaceous host-plants. Therefore, the capacity to harbor both types of symbioses would be a temporary adaptive advantage for eucalypts, which however, basically remain ectomycorrhizal trees.

### ■ Ectomycorrhizal symbiosis and drought stress

Among the many components of the differential efficiency of ectomycorrhizal fungi, their capacity to survive and form new mycorrhiza during dry periods is particularly important during the early stage of a plantation, when most roots are still concentrated in the top horizons of the soil. Our results with eucalypts show that different fungal species and strains display wide variations in drought tolerance, which is correlated with their ability to form mycorrhizas at a low water potential. The work is presently proceeding in this direction, but, with the rapid laboratory tests we developed, it is already possible to assess the quality of a strain for its adaptation to drought stress.

### ■ Solubilization of rock phosphate by ectomycorrhizal fungi

Locally-produced rock phosphate (volcanic fluoroapatite) is the main phosphorus fertilizer used in Brazil for eucalypt plantations. The simple laboratory test we used shows that fungal strains differ widely for their ability to solubilize this type of fertilizer. It can now be used for screening efficient fungi.

### ■ Ectomycorrhizal inoculation of planting stocks of eucalypt in nurseries

Experiments were carried out in experimental and commercial nurseries in Brazil, Portugal and Congo. The approach was technical : optimizing cultivation and inoculation techniques by controlling factors such as contain-

ers, substrate, fertilization, pesticides, substrate disinfection, etc. It is now possible to produce planting stocks with 50 % mycorrhizas or more of some introduced fungi as *Pisolithus tinctorius*. However, two difficulties subsist: the infection is slow and often leads to plants which are too big according to the plantation standards in the regions concerned, and the inoculation of eucalypt cuttings is not yet mastered.

### ■ Comparative plantations

The best growth stimulation (30 % increase of total height at 2 years) was recorded with some strains of *P. tinctorius*.

Although the plantations were made with unselected strains before the screening tests were developed, these results are extremely encouraging and fully justify the fundamental research aimed at defining the scientific bases of the controlled mycorrhization of eucalypts. However, it is still too early to analyse all the valuable information these experimental plantations should provide during the next years, most especially concerning the competitive ability of the introduced strains against resident fungi and their persistence.

## Conclusions and perspectives

This project yielded a wide variety of new basic knowledge on the mycorrhizal symbioses of eucalypts, published in 43 scientific articles, communications and reports. It also provided practical tools (laboratory tests) for a rapid screening of fungal isolates for controlled mycorrhization, and led to the creation of experimental plantations which will produce new information during the next years. All the conditions are now favorable to technical experimentation on a larger scale.

## Publications

(Reports and communications in meetings are not mentioned).

Anunciacao C.E., Guimaraes W.V., Araujo E.F., Muchovej R.M.C. and Souza D.R.N., 1989. Production and regeneration of protoplasts of *Pisolithus tinctorius*. *Arquivos de biologia e biotecnologia*, 32, 280.

Anunciacao C.E., Guimaraes W.V., Araujo E.F., Muchovej R.M.C. and Souza D.R.N., 1989. Production and regeneration of protoplasts of *Pisolithus tinctorius*. *Biotechnology Techniques*, 4, 215-220.

Bellei M., Garbaye J., and Gil M., 1992. Mycorrhizal succession in young *Eucalyptus viminalis* plantations in Santa Catarina (South Brazil). *Forest Ecology and Management*, 54, 205-213.

Boudarga K. and Dexheimer J., 1989. Sur la mycorrhization contrôlée de semis d'*Eucalyptus camaldulensis* par *Gigaspora margarita*. *Ann. Sci. For.*, 10, 12-20.

Boudarga K., Lapeyrie F. and Dexheimer J., 1990. A technique for endomycorrhizal-ectomycorrhizal infection of eucalypts in vitro and ultrastructure of the dual mycorrhizae. *New Phytol.*, 124, 73-76.

Lei L., Lapeyrie F., Malajczuk N. and Dexheimer J., 1990. Infectivity of pine and eucalyptus isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. 2. ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytol.*, 116, 115-122.

Malajczuk N., Lapeyrie F. and Garbaye J., 1990. Infectivity of pine and eucalyptus isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. 1. mycorrhiza formation in model systems. *New Phytol.*, 114, 627-631.

Soares I., Borges A.C., Barros N.F., Neves J.C.L. and Bellei M.M., 1989. Teor de fosforo no solo influenciando o desenvolvimento de ectomicorrizas e nutrição e crescimento de mudas de eucalipto. *Rev. Arvore*, 13(2), 140-151.

Soares I., Borges A.C., Barros N.F. and Bellei M.M., 1989. Níveis de fosforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, Campinas, 14, 327-332.

Contract number : **TS2-A-172**  
 Numéro de contrat :

- |   |   |
|---|---|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Fast-growing legume trees, a technology to assist the preservation of tropical forests.</i></b>   |
| Titre :   | <i>Les légumineuses arborées à croissance rapide, une technologie pour aider à la conservation des forêts tropicales.</i>   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | D. Werner   |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Botanisches Institut,<br>Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Karl-von-Frischstrasse<br>3550 Marburg, Deutschland.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +49-6421-28 34 75   |
| ▼ FAX :   | +49-6421-28 20 57   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Costa Rica : Centro de Investigaciones Agronomicas, Universidad de Costa Rica.</li> <li>- Spain : Departamento de Microbiología, Org. E.T.S. de Ing. Agr.</li> <li>- Deutschland : Forschung Institut für Schnellwachsende Baumarten, Hannover.</li> </ul> |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | bradyrhizobium; rhizobium; erythrina; robinia; nitrogen fixation;<br>hydrogen uptake; nitrates; biomass.<br><i>bradyrhizobium; rhizobium; erythrina; robinia; fixation de l'azote;<br/>                     absorption d'hydrogène; nitrate; biomasse.</i>  |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 62p. English.   |

# Fast-growing legume trees, a technology to assist the preservation of tropical forests

## Major objectives of this project were

- the development of optimal combinations of legume trees and symbiotic micro-organisms for a symbiosis of maximal growth yield;
- the biochemical characterisation and biotechnological application;
- field experiments to evaluate practical applications in agroforestry to reduce pressure from exploitation of tropical forests.

## Materials and methods

Due to the great variability, most experiments on trees grown under field conditions are only interpretable if performed with statistically reasonable numbers of plants. On the other hand, data obtained with trees growing in growth chambers under well-defined conditions must be verified with trees grown in a natural environment. However, because of the remarkable size of young tree plants, we cannot grow them longer than two years under defined conditions and then have to plant out.

Considering these aspects, we started cultivation of trees in three different ways :

- under highly defined conditions;
- under less well-defined conditions;
- under undefined ones.

As tree material we chose

- genetically identic plants (cloned material : one year old purchased from a German supplier);
- genetically different, but pre-selected material; seeds obtained from Prof. Hanover, East Lansing, USA;

- different races (seeds collected in the Botanical Garden, Marburg, Germany), and random samples of seeds.

### ■ Growth chamber plants (no seasonal changes)

(clay pots, artificial substrates, supply with light (day/night change), nutrient solution and tap water). The seedlings are grown from seeds of a faster growing line and a slower growing one. They are scheduled mainly for growth experiments.

### ■ Greenhouse plants (minor climatic changes)

(In containers, artificial substrate, nutrient solution, tap water). Seedlings from different origins. Climate and light conditions vary slightly with the outdoor conditions but this does not interfere with most infection and nitrogen fixation experiments.

### ■ Open air plants (seasonal changes)

(In containers with soil, supplied with tap water when dry). Seedlings from different *Robinia pseudoacacia* and *Erythrina poeppigiana* races and monoclonal plants.

Other methods are mentioned in the results.

## Results

### ■ Symbiosis and biomass production of *Robinia* under different nitrate regimes

Studies of relations between growth parameters and nitrogen availability

established that symbiosis may be impaired by both insufficient and excessive supplies of nitrate. This effect varied with the size of the cultivation system. For plants kept in «growth pouches» and «Leonard jars», 0.5 mM nitrate was usually not sufficient. By contrast, plants in clay pots, supplied three times a week with similar nitrate concentrations, responded with a marked decrease of nitrogen fixation capacity. These data suggest practical consequences for the selection and/or treatment of soils scheduled for agroforestry of black locust and for an effective inoculation with rhizobia.

We conclude from these experiments with genetically heterogeneous plants that growth of legumes in soils deficient in nitrogen cannot be improved only by breeding efforts but, perhaps even more effectively, by providing the plants with the conditions they need to establish symbiosis. This means that the largest production of biomass is to be expected when nitrate availability is closely monitored and fertilization is kept at a minimum. Nitrate should be supplied in amounts just sufficient to replace losses. It should be given as slow release fertilizer.

### ■ Screening for an optimal combination of trees and microsymbionts

A *Rhizobium* strain (R1), isolated in our laboratory from black locust root nodules, turned out to induce nodulation far ahead of all other strains tested. Fixation by this strain during the first weeks after infection was much higher than in plants infected otherwise: pot-cultured plants (81 d old, and in-

fectured with strain R1 54 days earlier) showed an average chitin-reducing activity of  $1.3 \pm 2.9 \mu\text{mol.h}^{-1}$  ( $n=9$ ), while the other *Rhizobium* strains tested exhibited an average activity of only  $0.004 \pm 0.007 \mu\text{mol.h}^{-1}$  or did not reduce at all at that age.

### ■ Biochemistry of oxygen protection and hydrogen recycling

Since no research in the area has addressed the *Robinia-Rhizobium* symbiosis, we examined nodules of young  $\text{N}_2$ -fixing *Robinia* trees and found high activity of ascorbate peroxidase, the key enzyme of the peroxide scavenging cycle.

Since genes coding for the key plant host components of the peroxide scavenging cycle could be important in the selection of superior  $\text{N}_2$ -fixing species including *Robinia*, we have initiated research with the objective of defining and clarifying the role of the peroxide scavenging cycle components in the symbiotic  $\text{N}_2$ -fixing process.

Our experiments started with the isolation of actively  $\text{N}_2$ -fixing preparations of nodule bacteroids. The effects of peroxide scavenging components on nitrogenase activity and nitrogenase longevity of bacteroids from *Robinia* and soybean nodule have been investigated.

The major conclusions from the experiments conducted to date are:

- Bacteroids with high nitrogenase activity have been prepared consistently by use of anaerobic conditions in which nodules are macerated in a buffer/0.2 M ascorbate medium and then phenols removed by use of PVP.
- When bacteroids from *Robinia* or soybean are removed from the nodule cytosol supernatant, nitrogenase activity under 0.2 atm,  $\text{O}_2$  persists for periods of no longer than about 30 min.  $\text{O}_2$  at 0.3 atm stimulated the initial nitrogenase activity but de-

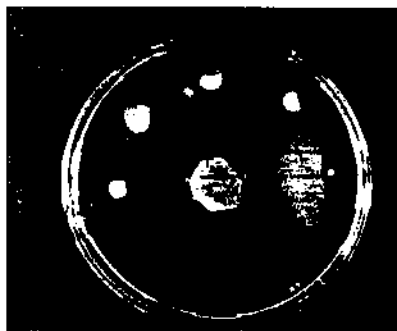


Figure 1 - Swarm agar plate inoculated with five different *Rhizobium* strains.

creased the period in which activity persisted.

- Addition of succinate stimulated nitrogenase activity rates in *Robinia* and soybean bacteroids.
- Addition of ascorbate (i.e. 25 mM) to media used for washing and storage of bacteroids consistently increased the longevity of nitrogenase activity in bacteroids. The addition of ascorbate to assay media also increased the period where activity persisted. In some experiments the duration of bacteroid activity continued for 60 to 90 minutes when ascorbate was added.

We established two different methods to study the hydrogen cycle:

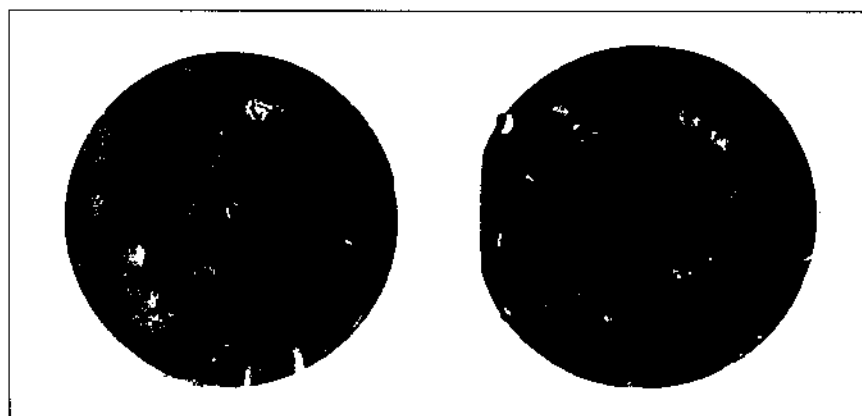
- By means of a hydrogen electrode we measured hydrogen uptake of nodules under nitrogenase inactiva-

tion and hydrogen uptake by *Rhizobium* strains isolated from *Robinia* nodules and grown under conditions that derepress  $\text{H}_2$  oxidation in *Bradyrhizobium japonicum*.

- Using a methylene blue reduction assay we confirmed our results obtained by the method mentioned above and thus established a screening method for *Hup*-positive or negative nodules of *Robinia pseudoacacia*.
- *Hup*-genes in DNA of a strain isolated from *Robinia pseudoacacia* (previously characterized by Röhm and Werner), were digested with *eco*R1, separated electrophoretically and detected by hybridisation with DNA from *E. coli* strain PVHT116 containing the *R. leguminosarum Hup*-genes.

Our conclusions are:

- Nodules infected with all strains tested so far (7 different strains, one of which was a rifampicin resistant mutant) were capable of hydrogen uptake, when nitrogenase was inactivated.
- The uptake rate was low as compared to that of *Glycine max* when based on nodule wet weights, however when based on bacteroid numbers, the rates seemed to be about the same order of magnitude. This result is easy to interpret, since bacteroids are not equally distrib-



left: crushed *Glycine max*/*Bradyrhizobium* 122 DES nodules  
right: crushed *Robinia pseudoacacia*/R1 nodules

Figure 2 - Methylene blue reduction assay for the determination of hydrogen uptake in individual nodules. Hydrogen uptake positive bacteroid strains cause a localized decolorization of filter paper disks (Lambert et al., 1985)

uted in *Robinia* nodules. There are large bacteroid-free areas.

- Free living *Robinia* symbionts could not be derepressed for hydrogen oxidation by conditions that were successful with *Bradyrhizobium*.
- At least two DNA sequences hybridizing with the DNA-probe from strain PHVT116 were detected in DNA of *Rhizobium* R1: a 2.5 kb fragment and a 13 kb fragment.

## ■ Progress on the nodulation process in *Erythrina*

Infection occurs in seedlings via injuries at the point where lateral roots emerge. In lateral roots infection occurs also via root hairs. In the first case globular nodules develop whereas in the second case elongated nodules develop, resulting from the swelling of the cortex. Ultrastructural studies are underway for this last type.

In the globular type infection of the nodule, primordium appear to occur via young vessels. We hope to elucidate soon how infection spreads within the cells of the primordium.

Mature globular nodules show infected cells in the medulla with typical bacteroids, 2 to 8 peribacteroid membrane, with PHB and metachromatic granules.

In the nodule vascular sheath, bacteria have been observed repeatedly in the xylematic vessels. Bacteria have also been observed in isolated vessels in the middle and external cortex.

The vasculature that joins the globular nodule with the main root shows what appear to be fixation threads.

## ■ Nitrogen dynamics in alley cropping with poró (*Erythrina poeppigiana*), madero negro (*Glyricidia sepium*) and common bean (*Phaseolus vulgaris*)

This study was carried out within the alley cropping experiment established

in 1982 at La Montana Experimental Station, CATIE, Turrialba, Costa Rica. The overall purpose of the experiment is to study the alley cropping of poró and madero negro associated with crop rotations of maize and beans (*Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*). Maize is planted in May and harvested in October, beans are planted in mid December and harvested in April. Both crops are planted after pollarding the leguminous trees in the alley cropping treatments. Since the beginning of the experiment pruning biomass has increased over time. The other treatments are applied alongside the deposition of the prunings on the soil surface. The experimental design included, besides the alley croppings, poró and madero negro mulches, *Gmelina arborea* mulch and cow dung. All of these treatments were combined with fertilization with P and K 840 kg/ha  $P_2O_5$ , 80 kg/ha  $K_2O$ . Additional plots were established with only organic fertilization with poró mulches.

Half the large plots, excluding additional plots, received N fertilization (23.3 kg/ha). The production of both crops has been consistently greater with organic additives and in alley cropping as compared to control plots (about 1 t./ha for corn, 600 kg/ha for beans). In previous years edaphic conditions have been studied in relation to production gains, no clear cut changes have occurred, that may explain the higher yields. This study was established to determine other soil parameters that may explain the differences in yields.

Crop response was studied through the harvest index, yield components, nutrient absorption and nitrogen fixation via ureides content at flowering and initiation of pod filling. The native parameter between flowering and pod filling may have been caused by greater N absorption by the bean crop. The low correlation between Nmin and yield ( $R^2 = 0.07$ ) may have been caused by the masking effect of N fixation, which is consistent with the high levels of ureides in the bean

plants. To what extent the early availability of N in the treatments may have «starter nitrogen» or inhibitory effects on fixation of the beans cannot be assessed on the basis of the data. Ureide content measured at flowering was different between treatments, however at beginning of pod filling differences between treatments were less apparent.

## Publications

Werner D., 1990. Forests, Trees, Cells. In: Fast growing trees and nitrogen fixing trees (eds. D. Werner and P. Müller). Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 3-8.

Ramirez C.\*, Sanchez G.\*, Kass D.\*, Viquez E., Sanchez J.\*, Vasquez N. and Ramirez G., 1990. Advances in *Erythrina* research at CATIE. In: Fast growing trees and nitrogen fixing trees (eds. D. Werner and P. Müller). Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 96-105.

Barea J.M.\*\*, Salamanca C.P.\*\* and Herrera M.A.\*\*, 1990. The role of VA-mycorrhiza at improving  $N_2$ -fixation by woody legumes in arid zones. In: Fast growing trees and nitrogen fixing trees (eds. D. Werner and P. Müller). Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 303-311.

Senaratne R.\*\*\*, 1990. Augmenting the production of fuelwood through developing fast-growing trees adaptable to different agro-ecological conditions in Sri Lanka. In: Fast growing trees and nitrogen fixing trees (eds. D. Werner and P. Müller). Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 361.

Röhm M. and Werner D., 1991. Nitrate levels affect the development of the black locust-*Rhizobium* symbiosis. Trees 5, 227-231.

Röhm M. and Werner D., 1992. *Robinia pseudoacacia*-*Rhizobium* symbiosis: Isolation and characterization of a fast-nodulating and efficiently nitrogen fixing *Rhizobium* strain. Nitrogen fixing tree res. reports 10, 193-197.

Röhm M., Streit W., Evans J.\*\*\* and Werner D., 1993. Hydrogen uptake by *Robinia pseudoacacia* nodules. Trees 7 (in press).

Schäfers B. and Werner D., 1993. Development of an effective (fix<sup>+</sup>) symbiosis of *Robinia pseudoacacia* with *Rhizobium* R1. Nitrogen fixing trees research report (in press).

Nygren P.\*\*\*\*\* and Ramirez C.\*, 1992. Growth of seedlings of five half-sib families of *Erythrina poeppigiana* to inoculation with a selected *Bradyrhizobium* strain. In: Powell M. and Singleton P. (eds.), Proceedings of the International Conference on *Erythrina* in the New and Old Worlds, CATIE, Turrialba, Costa Rica, October 19-23, 1992.

Nygren P.\*\*\*\*\* and Ramirez C.\*, 1992. Phenology of  $N_2$ -fixing nodules in pruned clones of *Erythrina poeppigiana*. In: Powell M. and Singleton P. (eds.), Proceedings of the International Conference on *Erythrina* in the New



and Old Worlds. CATIE, Turrialba, Costa Rica, October 19-23, 1992.

Ramirez C.\*. 1993. Agroforestry: a mechanistic approach. In: Buxton D. (ed.), Proceedings of the International Crop Science Congress, Iowa State University. Ames, July 14-22, 1992 (in press).

Hernandez S.\*. 1992. Soil nitrogen in an association of coffee (*Coffea arabica*) and poró

(*Erythrina poeppigiana*) in Turrialba, Costa Rica. Ph. Thesis.

Gross L.\*, Ramirez C.\* and Kass D.\*. 1992. Selection of efficient *Bradyrhizobium* strains for *Erythrina poeppigiana* in soils with high aluminium saturation. In: Proceedings of the International Conference on *Erythrina* in the New and Old Worlds, CATIE, Turrialba, Costa Rica, October 19-23, 1992.

\*Costa Rica

\*\*Spain

\*\*\*Sri Lanka

\*\*\*\*Co-worker of T. Ruiz-Argueso, Madrid/Spain

\*\*\*\*\*Finland

Contract number : **TS2-A-280**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE :	<b><i>Rainforest agroforestry : a comparative study of the productivity of traditional tree crops.</i></b>
Titre :	<i>Agro-foresterie en forêt tropicale humide : une étude comparative sur la productivité de cultures arborées traditionnelles.</i>
▼ PROJECT LEADER : Chef de projet :	Steven M. Newman Joanne Wainwright
▼ HOST INSTITUTION : Institution-hôte :	Fountain Renewable Resources Ltd.
▼ ADDRESS : Adresse :	The Bell Tower, High Street 12, Brackley, Northants, NN13 7DT, U.K.
▼ TELEPHONE :	+44-280-70 57 00
▼ FAX :	+44-280-70 67 00 - Tx : 9312102202
▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS : Institutions associées :	- Cameroon : Institut de la Recherche Agronomique, IRA. - The Netherlands : Dept. Silviculture & Forest Ecology, Wageningen Agricultural University, WAU. - U.K. : Institute of Terrestrial Ecology, ITE, Edinburgh.
▼ KEY WORDS :  Mots clés :	agroforestry; tree crops; humid lowland rainforest; oil palm; mixed cropping; phytometer; propagation; physiological ageing; canopy modelling; light simulation model. <i>agroforesterie; culture arborée; forêt tropicale humide de basse altitude; palmier à huile; cultures en mélange; phytomètre; multiplication; vieillissement physiologique; modélisation du dôme foliaire; modélisation de l'éclairage.</i>
▼ FINAL REPORT : Rapport final :	90p. English (+ 23p. Wageningen team).

# Rainforest agroforestry : a comparative study of the productivity of traditional tree crops

Rainforest agroforestry : a comparative study of the productivity of traditional tree crops with special reference to their effects on associated crops and the forest zone of S.W. Province, Cameroon.

## Objectives of the Research

The general objectives of the project were :

- to investigate means of introducing woody perennials into the agricultural systems of existing and potential buffer zones, and
- to identify ways in which agroforestry systems may be optimized in the event of increased population pressure, by characterizing the microclimate generated by such systems and investigating the effect of microclimate on yield interactions.

The approaches adopted were three-fold :

- to determine the key ecological effects of planting trees in agroforestry on understorey crops;
- to select and improve native fruit/nut tree species; and
- to develop and test the accuracy of light simulation models for use in designing agroforestry systems.

## Materials and methods

An oil palm spacing trial, established in 1968 at IRA Ekona, S.W. Province, Cameroon, was used as the main experimental site. Oil palms were set out in three replicated Nelder fans (Nelder, 1962) at densities ranging from 66 to 295 stems/ha<sup>-1</sup> in 17 rows with 6 palms row<sup>-1</sup>.

### ■ Understorey experiments

A series of understorey experiments were conducted to investigate the effect of oil palm density on the spatial variation in understorey crop growth. Similar experimental designs were used in each case, involving three replicated treatments; palm densities of 214, 140 and 82 stems ha<sup>-1</sup> at four levels of aspect (north, south, east and west), and three levels of tree proximity (1, 3 and 5 m). A cruciform sampling pattern was adopted with the tree at the centre.

Seedlings of amaranth (*Amaranthus cruentus*) and seeds of basil (*Ocimum basilicum*), locally important pot herbs, were used as phytometers, grown in both pots and in the ground beneath oil palm to distinguish between aerial and below-ground interactions in agroforestry. Control plants were grown in pots in an open, unshaded location. After 6 weeks, the plants were harvested whole, and fresh and dry weights were measured separately for roots and shoots.

### ■ Microclimate studies

The spatial variation in canopy transmission of PAR at a range of densities was measured in the oil palm spacing trial. The experimental design involved three replicated treatments; palm densities of 82, 140 and 214 stems/ha<sup>-1</sup> at six levels of distance (1, 2, 3, 4, 5 and 6 m) and four levels of aspect (north, south, east and west). Photo-voltaic sensors (Newman, 1985) were used to measure PAR (% total incident radiation) beneath the tree canopy. Data were expressed as relative transmitted PAR.

PVC access tubes were installed vertically beneath the soil surface to a depth of 1 m at varying palm proximity and a range of densities. A control tube was installed in an adjacent open location. A capacitance probe was used to measure soil moisture at intervals of 2 cm down the length of the tube, on several occasions during the dry season. The results were expressed in counts(s) relative to air humidity.

### ■ Shade experiment

Amaranth was grown in pots at four levels of shade provided by 1 m<sup>2</sup> raised frames, set out in a replicated Latin square arrangement. Control plants were grown in the open. After 6 weeks, fresh and dry weight measurements were taken as previously described. Photo-voltaic sensors were used to measure PAR.

### ■ Light modelling

A simple model was written to predict the light received beneath a single tree, represented by a sphere of given radius and height above ground. Sky conditions of the humid tropics were assumed to be the completely overcast with uniform luminance. The reduction in the amount of light reaching a point on the ground was assumed to depend on the extent to which sky was occluded by the tree, when viewed from that point. A series of simulations were performed and for a range of canopy radii and heights, the radius of the circle on the ground, receiving less than 0.9 full daylight was calculated. A typical oil palm was assumed to have a canopy equivalent to a sphere of radius 4.3 m. The variation in light income with distance from the "trunk",

beneath the model canopy was predicted.

The SIBU model (Nygren, 1990) was used to predict the spatial variation in total absolute light ( $\text{mol m}^{-2}$ ) in a  $13.5 \text{ m} \times 13.5 \text{ m}$  plot beneath a model tree canopy of given form (ellipsoid or hemispherical), depth, diameter and height above ground. A series of simulations were performed to determine the effect at both latitude  $52^\circ$  and  $4^\circ$  north (representing Britain and Cameroon, respectively), of varying sky transmission, season, canopy size and tree form (with constant canopy volume).

### ■ Canopy modelling (WAU)

Data on tree form from the oil palm spacing trial was used with the SILVISTAR model (Koop, 1989) to simulate total incident radiation in the understorey. Model output was compared with actual light data to determine the effectiveness of the model for designing agroforestry systems.

### ■ Tree propagation studies (ITE)

A series of experiments were carried out to investigate the effects of

- rooting media,
- applied IBA concentration, and
- leaf area,

on the rooting of leafy stem cuttings of *Ricinodendron heudelotii*, *Irvingia gabonensis* and *Gnetum africanum*. *R. heudelotii* and *I. gabonensis* are native forest trees, the whole seeds and kernels of which respectively are valued for their culinary use. *G. africanum* is a native vine, the shredded leaves of which are valued as a vegetable.

The following treatments were applied :

- Propagation media : sawdust; fine sand and sawdust; fine sand; medium sand and sawdust; medium sand; and sharp sand;
- Rates of IBA application :  $0 \mu\text{g}$ ,  $8 \mu\text{g}$ ,  $40 \mu\text{g}$  and  $200 \mu\text{g}$  to *R. heudelotii* and an additional level of  $250 \mu\text{g}$  to *I. gabonensis* and *G. africanum*; and

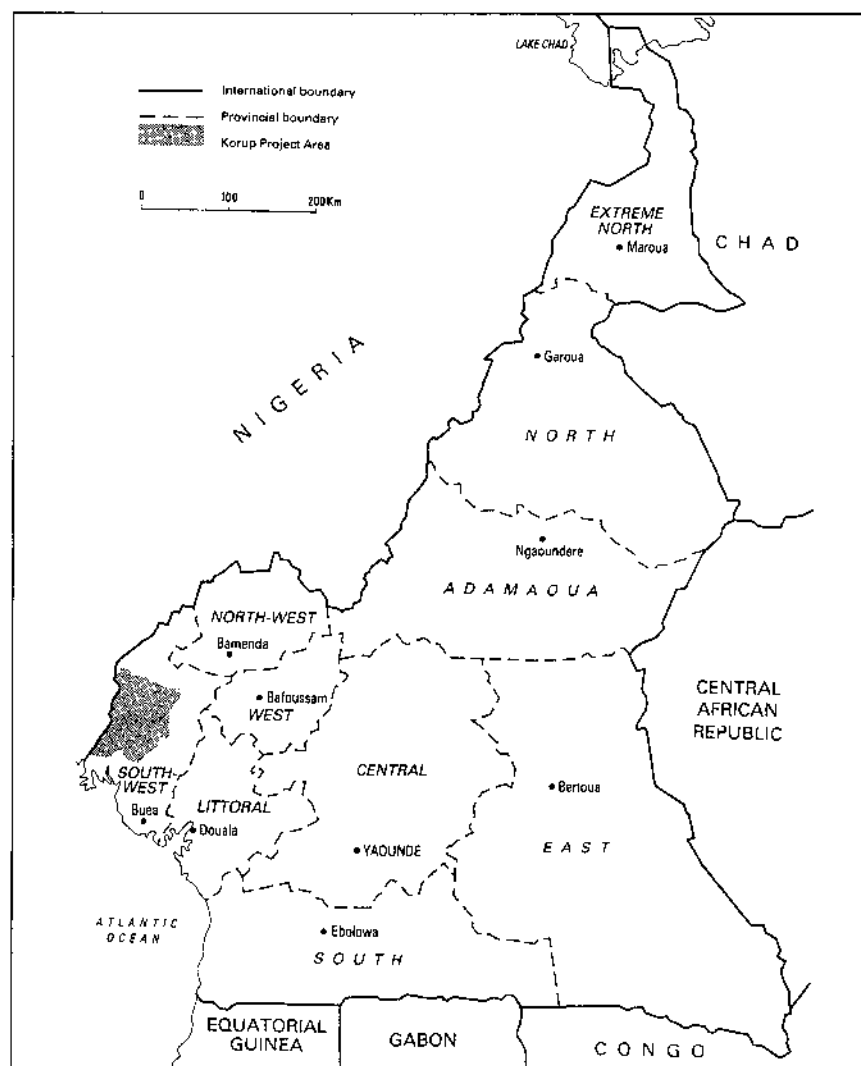


Figure 1 - Map showing the ten Provinces of Cameroon, the location of the Korup National Park and the zone of agricultural development (Korup Project Area).

- Reduction in foliar area to  $0 \text{ cm}^2$ ,  $25 \text{ cm}^2$ ,  $50 \text{ cm}^2$  and  $80 \text{ cm}^2$  with *R. heudelotii* and  $0 \text{ cm}^2$ ,  $12.5 \text{ cm}^2$ ,  $25 \text{ cm}^2$ ,  $50 \text{ cm}^2$  and  $80 \text{ cm}^2$  with *I. gabonensis* and *G. africanum*.

Destructive harvests were carried out at weekly intervals after week 1, and dry weight and carbohydrates were determined. Percentage rooting and the number of roots per rooted cuttings were measured.

A series of experiments were conducted to determine the effect of stump height on rooting cuttings of *R. heudelotii*. Mature trees were pollarded at a range of heights from 0.3 m to 10 m. The rooting potential of cuttings from

the resultant shoots was investigated. The effect of applying varying degrees of shade to the resprouting shoots was investigated in a separate experiment.

An earlier survey of fruit and vegetable characteristics was used to locate superior phenotypes for propagation. Material from these sources was used throughout these experiments where possible.

## Results

Maximum mean annual yield of oil palm ( $12 \text{ t/ha}^{-1}$ ) occurred at  $113 \text{ stems/ha}^{-1}$ . There was a negative relationship between yield and density above  $140 \text{ stems/ha}^{-1}$ .

Intercropping significantly reduced the yield of amaranth compared with the controls. The biomass of pot-grown plants was consistently greater than that of ground-grown equivalents. In the agroforestry plots, there were significant effects of density, aspect and tree proximity on the biomass of pot-grown amaranth in Experiment I. In Experiment II, there was no effect of aspect or proximity on pot-grown plants, but the effect of proximity on ground-grown plants was significant, being mediated through an effect on shoot biomass. Similar results were found with the germination of sweet basil.

There was a significant effect of density on mean % canopy transmission of PAR in oil palm, but no effect of either aspect or tree proximity. Within the agroforestry plots, there was no effect of density, aspect or tree proximity on soil moisture. The effect of depth on soil moisture was highly significant. There was no appreciable difference between the control and agroforestry soil moisture profiles with depth.

In the shade experiment, there was a significant effect of shade on the biomass of amaranth, compared with the controls. At 20 % shade, amaranth biomass was greater than the control, but at lower light levels, the effect of shade was negative.

With a uniform luminous sky source, the radiation isopleths generated by the simple, single tree model were concentric circles, with the densest shade directly underneath the tree. The importance of "tree height" was found to be considerable. The proportion of an oil palm, under a fully overcast sky, was 0.89 at 0 m, increasing to 0.98 at 20 m.

The results of the SIBU model showed there to be a positive correlation between sky transmission and total absolute light. There was seasonal variation in absolute light and the pattern of shade, particularly in the temperature zone, dependent on the

relative position of the sun. Shade patterns varied in accordance with sky transmission such that in "clear weather" shade was deep, extending far from the tree, particularly to the east and west, whilst in "dull weather" a shade pattern was not apparent. At both latitudes, there was correlation between canopy diameter and absolute light. Small, spherical and tall, slender canopies cast light, widely-dispersed shade whilst larger, spherical or widely-spreading canopies cast deep shade centred over the tree.

The SILVI-STAR model did not accurately simulate the shape of oil palm. There was no correlation between simulated and actual canopy transmission of PAR.

Sawdust was the best medium for vegetative propagation of *R. heudelotii*, *I. gabonensis* and *G. africanum*, resulting in over 80 % of rooted cuttings. Sawdust had the highest mean daily temperature of all the media investigated, and a low air : water ratio. Rooting percentage tended to decrease as cutting node position increased. The application of IBA markedly improved rooting in each of the species. Cuttings of *R. heudelotii* rooted best with an application of 8 µg of IBA (80 % rooting), whereas those of *I. gabonensis* and *G. africanum* responded best with applications of 200 µg and 250 µg (66 % and 70 % rooting, respectively). There was correlation between rooting percentage and cutting

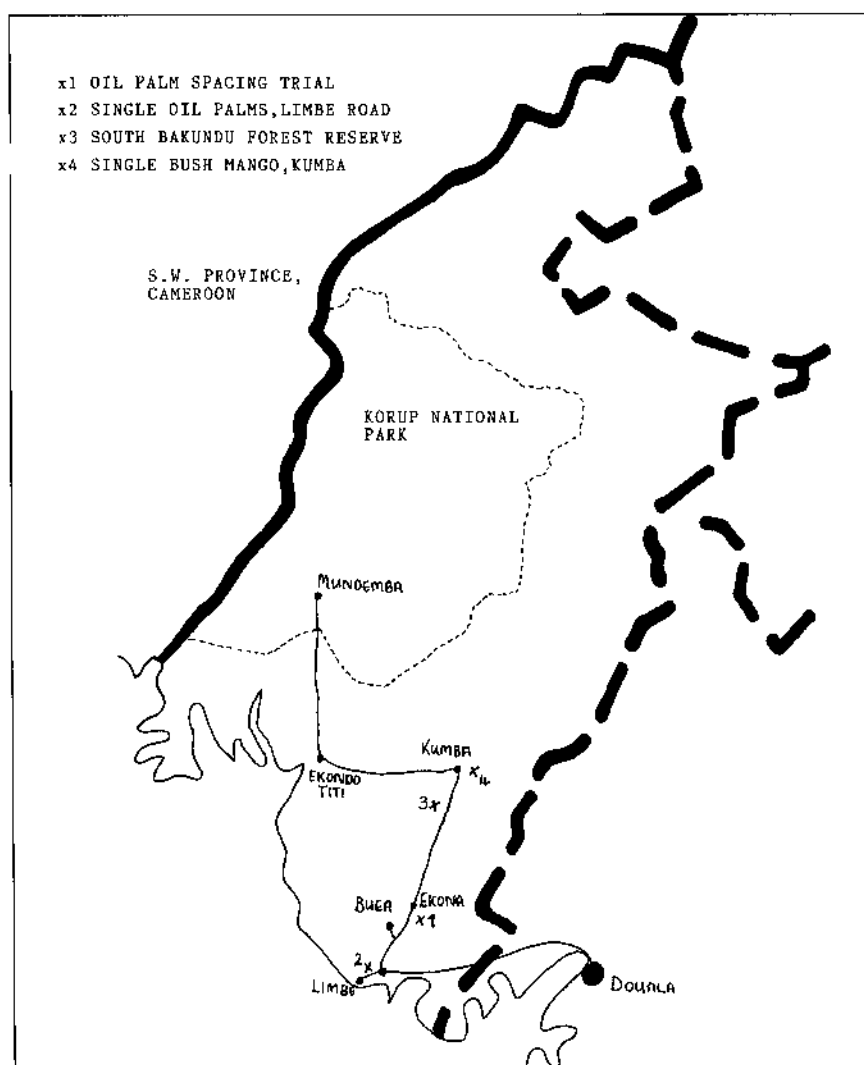


Figure 2 - Location of experimental sites in S.W. Province, Cameroon.

leaf area for all the species, such that the best rooting was achieved with a leaf area of  $80 \text{ cm}^2$ . Cuttings could not be rooted without leaves. Shading of pollarded stems and shoots increased rooting in subsequent cuttings taken. Rooting tended to decrease with increased height of pollarding.

## Conclusions

- Tree spacing was the most important factor in determining light in the understorey of widely-spaced orchard-style agroforestry systems;
- amaranth could be grown at levels of 50 % total incident radiation without significant yield loss;
- it was predicted that an oil palm spacing of 16 m on the square would achieve 50 % light in the understorey, and that at this density ( $39 \text{ stems/ha}^{-1}$ ), palm yield would be  $5.46 \text{ t/ha}^{-1}$  (47 % of that achieved at the optimum density of  $140 \text{ stems/ha}^{-1}$ );
- the yield of amaranth that could be achieved in an agroforestry system ( $22.85 \text{ t fresh shoot ha}^{-1}$ ) would more than compensate for the loss in palm oil yield and give an L.E.R. of 2.44 compared with oil palm monoculture at the same density;
- the results highlight the potential for agroforestry, even with oil palm, the growth form of which does not lend itself to manipulation of spatial arrangement;
- full economic analyses should be carried out to assess the economic viability of the system, particularly if high value tree crops are grown, which could distort the efficacy of agroforestry unless equally high value understorey crops are grown;
- modelling studies have shown the importance of tree form in designing agroforestry systems; and
- appropriate choice of both tree and understorey species is important in terms of value, use, shade tolerance, and ease of propagation, cultivation and management.

## References

- Koop H., 1989. Forest dynamics : SILVISTAR, a comprehensive monitoring system. Springer-Verlag., Berlin, 229pp.
- Nelder J.A., 1962. New kinds of systematic designs for spacing experiments. Biometrics, 18, 283-307.
- Newman S.M., 1985. Low cost sensor integrators for measuring the transmissivity of complex canopies to photosynthetically active radiation. Agricultural and Forest Meteorology, 35, 243-254.
- Nygren P., 1990. Modelo de patrones de sombra de surcos de *Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook en sistemas de cultivo en callejones. Tesis Mag. Sc., Catie, Turrialba, Costa Rica.

# AMELIORATION DES PRODUCTIONS AGRICOLES

## IMPROVEMENT OF AGRICULTURAL PRODUCTS

PRODUCTION  
ANIMALE

ANIMAL  
PRODUCTION

Santé animale

Animal health

Contract number : TS2-A-031  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Animal trypanosomiasis : field and laboratory studies of drug-resistant African trypanosomes. \****

Titre : *Trypanosomiase animale : recherche au champ et au laboratoire sur les trypanosomes africains résistants à la chimiothérapie.*

▼ PROJECT LEADER : Prof. Peter H. Holmes  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : University of Glasgow Veterinary School.  
 Institution-hôte :

▼ ADDRESS : Bearsden Road,  
 Adresse : Glasgow, G61 1QH, U.K.

▼ TELEPHONE : +44-41-330 57 94

▼ FAX : +44-41-330 57 97

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :

- Kenya : International Laboratories for Research on Animal Disease, (ILRAD).
- Kenya : Kenya Trypanosomiasis Research Institute, (KETRI).
- Somalia : National Tsetse and Trypanosomiasis Control Project, (NTTCP).
- Zambia : Department of Veterinary and Tsetse Control Services, (VTCS).

▼ KEY WORDS : trypanosomiasis; trypanocides; drug-resistance; drug uptake; elisa; drug detection.  
 Mots clés : *trypanosomiase; trypanocide; résistance à la chimiothérapie; prise de médicament; elisa; détection de médicament.*

▼ FINAL REPORT : 87p. English.  
 Rapport final :



# Animal trypanosomiasis : field and laboratory studies of drug-resistant African trypanosomes

## Objectives

- To develop a technique for the simple and rapid detection of drug-resistant trypanosomes.
- To examine the biological characteristics of drug-resistant and drug-sensitive strains of trypanosomes *in vivo* and *in vitro*.
- To conduct an international workshop to examine the Socio-economic and Organisational Determinants of the Efficiency of Animal Health and Production Services in Sub-Saharan Africa.

## Plan

The three objectives were addressed separately and the results and outputs of each activity are reported separately. The first objective was addressed by the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection and measurement of trypanocidal drug isometamidium chloride (Samorin) in cattle. The second objective was addressed by examining the characteristics of drug-resistant trypanosomes *in vivo* and mechanisms of drug transport in resistant trypanosomes *in vitro*. The third objective was addressed by an international workshop which was held in Glasgow in January, 1993.

- The detection and measurement of the trypanocidal drug isometamidium chloride (Samorin) in cattle

In spite of decades of control programmes, bovine trypanosomiasis remains one of the greatest constraints

to agricultural production in sub-Saharan Africa.

The few available chemoprophylactic and chemotherapeutic agents, of which isometamidium chloride (Samorin<sup>R</sup>, RMB Animal Health Ltd. U.K.) is one of the most widely used, remain the major means of control in most endemic countries. However there are an increasing number of reports of suspected drug-resistant trypanosomes and with little prospect of new drugs becoming available, control schemes which optimize the usage of existing drugs are required.

A sensitive assay for quantifying isometamidium (ISMM) in bovine serum could provide a valuable tool for measuring the duration of protective drug levels under a variety of field conditions and make a major contribution to rational drug usage. In conjunction with tests for the presence of trypanosome infection, such an assay could rapidly provide indirect evidence for drug resistance in the field, thereby enabling rationalisation of chemoprophylactic and chemotherapeutic regimes.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for ISMM was developed (Whitelaw *et al*, 1991, Paper 1) during the initial part of this project. The assay requires only 5  $\mu$ l of test serum, was sensitive to the level of 0.5  $\mu$ g/ml and was highly specific. Cross reactivity did not occur with the two other widely used trypanocidal drugs diminazene aceturate and homidium bromide. However, with increasing experience of the use of this ELISA, a number of constraints became apparent. To overcome these a new ISMM ELISA method has been developed and evalu-

ated using a statistically based approach which is intended as the basis of a quality assurance programme for routine use with the assay (Eisler *et al*, 1993 paper 2). The new ELISA includes use of :

- pre-dilution of sera prior to addition to the wells of the ELISA plate;
- lower dilution of test sample;
- the most appropriate microtitre plates;
- the biotin-streptavidin system for the detection of specific antibody;
- peroxidase and tetramethylbenzidine for colour development;
- four-parameter logistic curve-fitting for assay calibration.

With final support from ODA (U.K.) and in collaboration with ILRAD this ELISA has been shown to be robust and accurate. Two important studies have recently been conducted in African cattle.

- Characteristics of drug-resistant trypanosomes *in vivo* and mechanisms of drug transport in resistant Trypanosomes *in vivo*
- Studies of drug-resistant Trypanosomes *in vivo*
- Interference between drug-resistant stocks of *Trypanosoma congolense* in goats

A study was undertaken in goats to investigate the ability of two unrelated stocks of *Trypanosoma congolense*, one of which is highly sensitive to isometamidium chloride and one which is drug-resistant, to become established in the presence of an existing infection with the other stock. The goats, which were initially in-

infected with the sensitive strain and were then challenged with the resistant strain, were cured by treatment at 0.1 mg/kg isometamidium, indicating that the resistant stock did not establish an infection. Goats initially infected with the resistant stock, which were then challenged with the sensitive stock, experienced temporary remission of infection followed by relapse after treatment at 0.1 mg/kg isometamidium. In contrast, the goat infected only with the resistant stock remained parasitaemic following treatment at 0.1 mg/kg. This suggests that superinfection with the sensitive stock resulted in the establishment of infection, which suppressed the resistant stock to below the limit of detection of the method used. These observations suggest that isometamidium-resistant stocks may be less viable than sensitive strains and could explain the relative scarcity of isometamidium resistance in the field. These results were published in 1989 in *Research in Veterinary Science* (Paper 3).

- The rapid development of drug-resistance by *Trypanosoma evansi* in immunosuppressed mice

The effect of immunosuppression on the development of drug resistance by trypanosomes was investigated in mice infected with *Trypanosoma evansi*. As a result of frequent passage in immunosuppressed mice given sub-curative drug treatments, clones of *T. evansi* rapidly developed high levels of resistance to mel Cy, diminazene aceturate and isometamidium chloride. Similar protocols in normal immunocompetent mice infected with the same parent clones did not lead to the development of drug-resistance. The resistant populations developed in immunosuppressed mice maintained their high levels of resistance when tested in normal mice. The mel Cy resistant clone was tested for cross-resistance to other trypanocides and was found to be also highly resistant to diminazene and pentamidine. The results indicate that impairment of the host immune system may lead to the rapid development of drug-resistance

by *T. evansi* under experimental conditions in mice and may possibly play a role in the development of drug resistance by trypanosomes in the field. These results were published in *Acta Tropica* in 1992 (Paper 4).

- Studies of drug-resistant trypanosomes *in vitro*: alterations in drug transport in resistant *Trypanosoma congolense*

In addition to developing suitable tests for drug resistance, it is also important to investigate the mechanisms of drug resistance in trypanosomes. Such work may not only provide fundamental knowledge of the mechanisms of resistance, but may also lead to new tests for drug resistance as well as novel methods for overcoming this resistance in the field. It is only recently that the mechanisms of drug resistance have been investigated in trypanosomes of veterinary importance. Our work centred on *T. congolense* and was concerned with the comparison of drug transport by sensitive and resistant parasites. In numerous protozoan species such as *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma brucei brucei* and *T.b. rhodesiense* and in a number of cancer cell-lines other workers have found a correlation between the level of chemotherapeutic compound accumulated and the reduction in sensitivity to that compound. Therefore our early studies on isometamidium chloride resistance in *T. congolense* focused on drug accumulation by sensitive and resistant trypanosomes.

- Reduced accumulation of isometamidium by drug-resistant *Trypanosoma congolense*

The accumulation of the trypanocide isometamidium chloride (Samorin<sup>R</sup>, RMB Animal Health Ltd., U.K.) by a range of clones of *Trypanosoma congolense* with varying sensitivity to the drug, was measured by methods based on the fluorescence of isometamidium. Fluorescence microscopy and flow cytometry showed a reduction in drug accumulation by

resistant clones. Fluorescence spectrophotometry demonstrated an inverse correlation between the intensity of cell-associated fluorescence and the level of resistance of the clones expressed *in vivo*. The addition of the metabolic inhibitor SHAM/glycerol to the incubation medium resulted in a reduction of this apparent difference in drug accumulation between the clones; those clones which were sensitive to isometamidium showed a reduction in fluorescence while a percentage increase in fluorescence was observed as clones became more resistant to the trypanocide. These observations may be of value for the *in vitro* detection of resistant *T. congolense* populations and may also be used to estimate the mean level of resistance in a given sample. The results also imply that decreased accumulation of isometamidium by drug-resistant clones of the parasite may be responsible for the reduction in sensitivity. These results were published in *Parasitology* in 1992 (paper 5).

- Transport of isometamidium (Samorin) by drug-resistant and drug-sensitive *Trypanosoma congolense*

The uptake kinetics of a <sup>14</sup>C-labelled trypanocidal compound isometamidium chloride (Samorin<sup>R</sup>, RMB Animal Health Ltd., U.K.) were measured in drug-resistant and drug-sensitive *Trypanosoma congolense*. It was established that drug uptake was significantly more rapid and quantitatively greater in drug-sensitive parasites. There was clear evidence that drug uptake in both the resistant and sensitive trypanosomes was by a specific, receptor-mediated process. This specific drug transport was energy-dependent, being sensitive to metabolic inhibition with SHAM/ glycerol. Significant differences in drug transport were observed which could be correlated with resistance to isometamidium. The optimal pH for drug accumulation was lowered in the resistant trypanosomes; this finding, along with an observed change in specificity for the related compound homidium bromide, suggested that the

specific receptor for isometamidium is altered in the resistant trypanosomes, possibly resulting in a reduction in drug uptake. In addition to these alterations in drug uptake, efflux of isometamidium also appears to occur in the resistant trypanosomes. Both a reduction in incubation temperature and metabolic inhibition increased the level of trypanosome-associated isometamidium in the resistant parasites. This was in contrast to observations using drug-sensitive parasites. Furthermore, the addition of calcium flux-modulating agents to the incubation medium also resulted in an increase in accumulation by the resistant parasites. These results were published in *Parasitology* in 1992 (Paper 6).

- Kinetic modelling of isometamidium chloride (Samorin) uptake by *Trypanosoma congolense*

Clones of *Trypanosoma congolense* which express resistance to the widely used trypanocide isometamidium chloride accumulate less of the drug than clones which are sensitive to drug treatment. A mathematical model has been developed which was able to predict theoretical lines representing the uptake kinetics in trypanosomes which were sensitive to isometamidium as well as for resistant trypanosomes in which reduced accumulation was a result of either reduced uptake or enhanced efflux of the drug. Data from drug uptake experiments were then fitted to these theoretical lines. While the value for drug efflux could not be separated from the dissociation constant of the trypanosomes for isometamidium, it was demonstrated that reduced accumulation is not a result of reduced uptake of isometamidium by drug-resistant trypanosomes. These results were published in *Parasitology* in 1992 (Paper 7).

- Drug resistance in trypanosomes of veterinary importance - a review

In 1990 a review was presented on drug resistance in trypanosomes of veterinary importance (Paper 8).

- International workshop on 'socio-economic and organisational determinants of the efficiency of animal health and production services in sub-Saharan Africa'

In January 1993 an international workshop was held in Glasgow to examine the socio-economic and organisational determinants of the efficiency of animal health and production services in sub-Saharan Africa. A series of recommendations was made to improve the efficiency of public sector services and encourage private sector participation. The report of this meeting has been accepted for publication in *Veterinary Research Communications* (Paper 9).

## Conclusions

A sensitive and robust enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed for the detection of the trypanocidal prophylactic drug, isometamidium chloride, in the serum of treated cattle. The assay has been vigorously validated in cattle under controlled experimental conditions and in pilot field studies. The assay will provide a valuable tool for monitoring control programmes and in combination with tests for the presence of trypanosome infection could provide a rapid indirect test for drug-resistant trypanosomes in the field.

The transport of isometamidium chloride (Samorin) in *Trypanosoma congolense* which were either sensitive or resistant to this widely used trypanocide was studied *in vitro*. Significantly lower amounts of drug were accumulated over time by resistant than by sensitive trypanosomes. While no direct evidence could be obtained, indirect observations implied the involvement of an increased efflux of drug from the resistant trypanosomes. In both the resistant and sensitive parasites, drug transport was found to be mediated by an energy-dependent, specific process, presumably receptor-

mediated. However, the specificity of the putative receptors was altered in the drug-resistant parasites. It is proposed that an alteration or replacement of a specific receptor in isometamidium chloride-resistant *T. congolense* results in an increased efflux of the drug and that this increased efflux at least partially mediates the reduction in sensitivity to the compound.

Finally, an international workshop was held to examine the socio-economic and organisational determinants of the efficiency of animal health and production services in sub-Saharan Africa. A series of recommendations was made to improve the efficiency of public sector services and encourage private sector participation.

## Publications

Paper 1. Whitelaw D.D., Gault E.A., Holmes P.H., Sutherland I.A., Rowell F.J., Phillips A. and Urquhart G.M., 1991. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and measurement of the trypanocidal drug isometamidium chloride in cattle. *Research in Veterinary Science*, 50, 185-189.

Paper 2. Eisler M.C., Gault E.A., Smith H.V., Peregrine A.S. and Holmes P.H., 1993. Evaluation and improvement of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of isometamidium in bovine serum. *Therapeutic Drug Monitoring*, 15, 236-242.

Paper 3. Sones K.R., Holmes P.H. and Urquhart G.M., 1989. Interference between drug-resistant and drug-sensitive stocks of *Trypanosoma congolense* in goats. *Research in Veterinary Science*, 47, 75-77.

Paper 4. Osman A.S., Jennings F.W. and Holmes P.H., 1992. The rapid development of drug-resistance by *Trypanosoma evansi* in immunosuppressed mice. *Acta Tropica*, 50, 249-257.

Paper 5. Sutherland I.A., Peregrine A.S., Lonsdale-Eccles J.D. and Holmes P.H., 1991. Reduced accumulation of isometamidium by drug-resistant *Trypanosoma*. *Parasitology*, 103, 245-251.

Paper 6. Sutherland I.A., Mounsey A. and Holmes P.H., 1992. Transport of isometamidium (Samorin) by drug-resistant and drug-sensitive *Trypanosoma congolense*. *Parasitology*, 104, 461-467.

Paper 7. Sutherland I.A., Mounsey A., Eisler M. and Holmes P.H., 1992. Kinetic modelling of isometamidium chloride (Samorin) uptake by *Trypanosoma congolense*. *Parasitology*, 105, 91-95.

Paper 8. Sutherland J.A. and Holmes P.H., VI-Ith, 1990. Resistance of parasites to antiparasitic drugs. International Congress of Parasitology, 25-31.

Paper 9. Proceedings of a Workshop Sponsored by the Commission of the European Communities DGXII, compiles by Putt S.N.H., Holmes P.H. and Viegas F.J.T. Socio-

Economic and Organisational Determinants of the Efficiency of Animal Health and Production Services in Sub-Saharan Africa. Veterinary Research Communications, in press.

Numéro de contrat : TS2-A-076  
Contract number :

▼ TITRE : ***La trypanotolérance du bétail bovin, ovin et caprin en Afrique. Recherche sur son déterminisme génétique et sur l'identification et la sélection d'animaux trypanotolérants. \****

Title : *Trypanotolerance in cattle, sheep and goats in Africa. Research on its genetic origin and on the identification and selection of trypanotolerant animals.*

▼ CHEF DE PROJET : A. Verhulst  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,  
Host institution : Service de Production Animale Tropicale.

▼ ADRESSE : Nationalestraat 155,  
Address : 2000 Antwerpen, Belgique.

▼ TELEPHONE : +32-3-247 63 91

▼ FAX : +32-3-216 14 31 - Tx : 31648 Tropic (B)

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :

- Bénin : Université Nationale du Bénin, FSA, Fac. Sc. Agro., Cotonou.
- Cameroun : Centre Univ. de Dschang, CUDS, Dép. Zoot., Dschang.
- Burkina Faso : Centre de Recherches sur les Trypanosomiasés Animales, CRTA, Bobo-Dioulasso.
- Zaïre : Université de Lubumbashi, Fac. de Méd. Vétér., Lubumbashi.
- U.K. : Institute of Animal Physiology and Genetic Research, ERS, Immuno-Genetic Group, Edinburgh.
- France : Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux, IEMVT, Zootechnie, Maison-Alfort.
- Deutschland : Freie Univer. Berlin, Inst. Parasit. u. Tropenveter., Berlin.

▼ MOTS CLES : ruminant; trypanotolérance; paramètre; amélioration génétique.  
Key words : ruminants; trypanotolerance; parameters; breeding.

▼ RAPPORT FINAL : 131p. Français (+ annexes).  
Final report :

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-118, p. 385

# La trypanotolérance du bétail bovin, ovin et caprin en Afrique. Recherche sur son déterminisme génétique et sur l'identification et la sélection d'animaux trypanotolérants

## Objectifs de la recherche

Au cours du programme STD1, des investigations préliminaires avaient été effectuées sur des souris consanguines. Avait été mis au point un modèle de laboratoire de transmission cyclique à l'aide de deux lignées congéniques de souris, CBA/Ca (relativement plus résistante) et C3H/He (sensible). Les conditions optimales avaient été définies pour le développement métacyclique de *Trypanosoma brucei brucei* EATRO 1125 chez *Glossina morsitans morsitans*. Avoient été caractérisés et comparés pendant toute la période de l'infection dans les deux lignées de souris, les paramètres cliniques, parasitologiques, biochimiques, histologiques et hématologiques. Malgré des différences notables entre la réaction des deux lignées, seulement trois critères fiables purent être retenus pour différencier les deux lignes de souris : parasitémie, IgM et temps de survie. Plus tard, utilisant une infection à l'aide d'un seul variant antigénique (AnTat 1.1), il avait été montré que les anticorps trypanolytiques AnTat 1.1-spécifiques apparaissent plus tôt et en plus grande quantité chez la souris relativement plus résistante.

Les objectifs du programme STD2 étaient :

- l'adaptation du protocole expérimental aux bovins et petits ruminants sur le terrain en Afrique;
- l'évaluation sur bovins et petits ruminants des paramètres sélection-

nés sur modèle de laboratoire et l'exploration d'autres paramètres essentiellement de nature immunologique;

- la recherche de méthodes alternatives d'immunisation à l'aide de divers antigènes avirulents en remplacement des trypanosomes vivants;
- la poursuite de l'enquête parasitologique et sérologique sur l'incidence des trypanosomioses chez les races trypanotolérantes et non-trypanotolérantes en Afrique; relation avec la productivité.

## Matériel et méthodes

L'adaptation du test de trypanotolérance aux animaux domestiques a été réalisé à travers une série d'expérimentations successives sur chèvres Toggenbourg x chèvres naines de Campine (n=12) et de race Saanen (n=36) en Belgique, sur moutons de race Djallonké (n=12) au Cameroun, sur moutons de race Voskop (n=12) et Suffolk (n=17) en Belgique, sur bovins de race Lagunaire (n=14), Borgou (n=14) et Zébu Bororo blanc (n=10) au Bénin.

Au cours de ces expériences successives, une série de paramètres possibles de la trypanotolérance ont été évalués, tels évolution pondérale, temps de survie, anticorps trypanolytiques AnTat 1.1-spécifiques, anticorps agglutinants hétérologues, immunoconglutinines, parasitémie sur buffy-coat, complément activé par voie alterne et par voie classique,

facteurs C3 total et C3 fonctionnel, antigènes circulants de *Trypanosoma brucei* par Elisa, anticorps hémagglutinants après immunisation par des globules rouges hétérologues et réaction intradermique à la phytohémagglutinine.

Ont été utilisées également différentes méthodes d'immunisation alternative à l'aide d'antigènes avirulents, tels: différents clones du répertoire AnTAR 1 de *Trypanosoma brucei brucei* irradiés au Caesium, les glycoprotéines de surface variables (VSG) de *Trypanosoma brucei gambiense* fixées sur hématies stabilisées, l'extrait total de *Trypanosoma gambiense* LiTat 1.6 fixé sur latex, et l'extrait total de *Trypanosoma gambiense* LiTat 1.6 lyophilisé et non fixé sur substrat.

L'enquête sur l'incidence trypanosomienne en Afrique en relation avec la trypanotolérance a été effectuée sur les différentes races bovines du Bénin (Lagunaire, Borgou, Somba, Zébu) dans les différentes provinces du pays en utilisant l'examen parasitologique direct, le test de trypanolyse et l'immunofluorescence indirecte.

La productivité de la race Borgou a été réalisée dans le cadre du projet FAO/PNUD de "Développement du bétail dans la province du Borgou" en dégagant tous les paramètres de production nécessaires à l'établissement de l'index de productivité.

## Résultats

L'adaptation de "l'épreuve de trypanotolérance AnTat 1.1" aux animaux de la ferme en Afrique et en Europe (bovins, moutons, chèvres) a été réalisée avec succès. Les modalités d'utilisation de AnTat 1.1 ont été définies exactement pour les différentes espèces. Une procédure d'infection normalisée à l'aide d'un seul variant antigénique, AnTat 1.1 sans réactivité croisée avec des trypanosomes naturels existant sur le terrain en Afrique, permet la répétition du test partout et à tout moment sans qu'il ne soit nécessaire d'élever les animaux dans des étables à l'abri des mouches tsé-tsé ou de les garder dans une zone où le risque d'infection par les trypanosomes est très faible (7,8,13).

Quatre races (ou types) de chèvres ont été évaluées et classifiées sur la base du taux de mortalité (M) et du temps de survie (S), dans l'ordre du niveau de trypanotolérance :

- Djallonké de l'extrême Sud du Bénin (M=33%, S=31 j);
- Croisées Togenbourg x chèvre naine de Campine en Belgique (M=83%, S=78 j);
- Djallonké de la Savane, de la province du Centre du Cameroun (M=100%, S=44 j);
- Saanen en Belgique (M=100%, S=44 j.), symptômes excessivement sévères.

Un profil de trypanotolérance préliminaire a été établi pour les bovins de race Borgou, Lagunaire et zébus Bororo blanc au Bénin (19), et pour la race Pie Noire Holstein en Belgique. Sur la base des paramètres cliniques et des différents paramètres de laboratoire, les races Borgou et Lagunaire se montrent hautement trypanotolérantes, éliminant spontanément l'infection initiée à l'aide d'AnTat 1.1, la race Pie Noire Holstein montre une trypanotolérance nulle avec infection sur-aiguë, nécessitant une intervention médicamenteuse rapide, le zébu Bororo blanc montre un niveau de trypanotolérance très faible avec une infection

à allure chronique et parasitémiées intermittentes conduisant à l'inanition progressive et à d'autres maladies intercurrentes.

La baisse de l'hématocrite moyen d'un groupe d'animaux soumis au test est évident mais ne constitue pas un critère suffisamment sensible et fiable pour la classification des individus, ni pour prédire précocement la mort de l'animal. La parasitémie (la durée du premier pic AnTat 1.1-spécifique, la durée de la parasitémie, la parasitémie cumulée) est un paramètre lié directement à la faculté d'élimination des parasites de l'animal. La virulence de AnTat 1.1 pour les bovins et les petits ruminants paraît bien adaptée à la réalisation d'une bonne discrimination entre les races et au sein des races. Pour la détection de parasitémiées très faibles, la détection de l'antigène par ELISA s'est montrée d'un certain intérêt. Dans la pratique courante cependant, la parasitémie réalisée sur buffy-coat paraît suffisante.

La courbe des anticorps trypanolytiques AnTat 1.1-spécifiques est tout à fait caractéristique chez les ruminants sensibles et trypanotolérants, mais est d'une interprétation délicate et constitue un critère peu fiable.

Une nouvelle méthode a été développée pour la titration rapide du complément activé par voie classique (CPW) et voie alterne (APW). Ces paramètres ont été inclus dans l'éventail des critères de trypanotolérance retenus et apparaissent sur le "trypanogramme", une représentation graphique du profil de trypanotolérance de chaque animal testé. Des animaux hautement susceptibles (chèvres de race Saanen, bovins de race Pie Noire Holstein) présentent une diminution sévère du complément (APW) et l'épuisement presque complet du complément (CPW), préfigurant la mort certaine de l'animal à moins d'un traitement immédiat. Chez des animaux trypanotolérants, l'APW et le CPW diminuent pendant la phase parasitémique initiale mais retournent aux valeurs initiales quelques jours après l'élimination de trypanosomes et

montent même à des niveaux très supérieurs aux valeurs initiales chez des animaux hautement trypanotolérants. Chez les animaux à faible niveau de trypanotolérance (zébu Bororo blanc), l'APW et le CPW baissent également brutalement au cours des premiers pics parasitémiques et se maintiennent ensuite à un niveau très bas avec quelques oscillations au gré des parasitémiées intermittentes, mais avec une tendance générale à la baisse au cours des semaines et des mois d'épuisement progressif et/ou de maladies intercurrentes.

D'autres observations intéressantes ont été réalisées dans le domaine immunologique. Ainsi, on a mis en évidence une augmentation spectaculaire de la concentration des immunoglobulines chez les animaux non trypanotolérants à partir des jours 10 à 15 après l'infection expérimentale. Le rôle de ces immunoglobulines en relation avec la sensibilité des animaux sera étudié en phase post-projet. On a observé également que le facteur C3 total, aussi bien que le facteur C3 fonctionnel se maintiennent au-dessus des valeurs initiales chez les animaux trypanotolérants; chez les animaux trypanosensibles, il y a de toute évidence un problème dans l'amplification de la cascade complémentaire. Des recherches sont en cours, en phase post-projet, pour détecter le maillon faible de l'activation du complément. Sur des moutons de race Voskop et Suffolk, il a encore été démontré l'efficacité des épreuves d'évaluation de la capacité de réponse humorale à l'aide d'immunisations par des globules rouges de poule d'une part et d'ovalbumine d'autre part. Chez ces mêmes animaux, il a également été possible de tester la capacité de réponse immunitaire cellulaire en utilisant une cuti-réaction à l'aide de phytohémagglutinine. Les possibilités offertes par ces méthodes d'exploration de l'immunité humorale et cellulaire seront explorées davantage en phase projet également.

Les différentes méthodes d'immunisation alternatives à l'aide de divers

antigènes trypanosomiens avirulents se sont montrées fonctionnelles tant pour ce qui concerne l'immunisation que pour la titration des anticorps à l'aide de tests d'agglutination sur carte. Le transport et la concentration des antigènes est facilité. La titration par agglutination sur carte se révèle être très pratique sur le terrain; cependant, la préparation des antigènes fixés sur hématies stabilisées ou sur latex est coûteuse. L'extrait total de LiTat 1.6 lyophilisé et non fixé sur substrat doit être utilisé à des doses assez élevées et avec rappel. Ainsi, cette méthode d'immunisation est également coûteuse. Les titres d'anticorps développés ne sont pas très élevés, ce qui ne permet pas toujours une bonne discrimination entre les sujets testés. L'utilisation d'un antigène avirulent ne permet de retenir comme paramètre de trypanotolérance ni la parasitémie, ni l'antigénémie, ni le complément. Pour ces différentes raisons, l'utilisation de AnTat 1.1 virulent reste la méthode de choix.

Les résultats de l'enquête sur l'incidence trypanosomienne en relation avec la trypanotolérance (différentes races d'origines trypanotolérantes et zébus non trypanotolérants au Bénin) ont été achevés et publiés. Des trypanosomes furent détectés par frottis chez 19,3% des animaux; des anticorps contre les trypanosomes furent dépistés dans 19,3% des échantillons par immunofluorescence indirecte, 50,6% par CATT et 3,4% par le test de trypanolyse. *Trypanosoma vivax* et *Trypanosoma congolense* étaient les principales espèces rencontrées au Bénin; *Trypanosoma brucei* y est peu représentée. Dans leur aire de dispersion naturelle, les zébus avaient des taux d'infection plus bas que les races trypanotolérantes. Le taux d'infection de différentes races trypanotolérantes n'est pas significativement différent.

Les études de productivité de la race Borgou au Bénin ont montré que la race est bien adaptée à son milieu. Ses performances, avec un index de productivité de 27,4 kg, sont similaires à celles observées chez une race trypano-

notolérante dans un tel système traditionnel.

## Conclusions

Le "test de trypanotolérance AnTat 1.1" a pu être adapté avec succès aux bovins, ovins et caprins en Europe et en Afrique. Il permet une classification objective des animaux selon leur niveau de trypanotolérance. Les animaux trypanotolérants, subtolérants et sensibles peuvent être identifiés, au plus tard entre le jour 15 à 20 après le début du test, sur la base de l'évolution du titre du complément activé par voies classique et alterne, ainsi que de la parasitémie sur buffy-coat. Les autres paramètres explorés apportent peu d'information supplémentaire ou sont peu fiables; il s'agit en particulier de l'hématocrite, des anticorps trypanolytiques AnTat 1.1-spécifiques, des anticorps agglutinants hétérologues, des immunoglobulines, des immunoprecipitines, des éléments cytologiques sanguins et des antigènes trypanosomiens détectés par Ag-ELISA.

Des méthodes alternes d'immunisation à l'aide d'antigènes trypanosomiens avirulents couplées à la titration des anticorps par agglutination sur carte ont été développées. Elles n'ont toutefois pas été retenues pour un "test de trypanotolérance", qui serait trop coûteux et peu sensible.

Une enquête parasitologique et sérologique sur l'incidence des différents trypanosomes a montré l'importance relative des différentes espèces de trypanosomes, chez des bovins de races trypanotolérantes et trypanosensibles. Ce volet de recherche a mis en exergue l'impact économique des trypanosomiasés et l'intérêt de l'élevage du bétail trypanotolérant.

Le projet a également contribué à l'étude de la productivité du bétail "Borgou". Le niveau moyen de trypanotolérance de cette race est similaire à celui de la race Lagunaire, mais avec une variabilité génétique nettement plus grande. Avec un index de productivité de 27,4 kg, la race Borgou réalise

des performances au moins égales à celles observées sur d'autres races trypanotolérantes dans des conditions similaires.

Vingt deux publications ont été réalisées, entièrement ou partiellement dans le cadre du projet. Quatre thèses de M.Sc. ont été préparées et présentées avec succès. Une thèse de Ph.D. est encore en préparation. Elle porte essentiellement sur la détection, en phase post-projet, du maillon faible dans la cascade d'activation du complément chez les animaux non-trypanotolérants.

## Publications

Doko A., Guedegbe B., Baelmans R., Demey F., N'diaye A., Pandey V.S. and Verhulst A. Trypanosomiasis in different breeds of cattle from Benin. *Vet. Parasitol.*, 1991, 40, 1-7.

Pandey V.S., Verhulst A. and Demey F. Effect of low temperature storage on the haemolytic complement of cattle and sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1993, 37, 337-341.

Guedegbe B., Verhulst A., Van Meirvenne N., Pandey V.S. & Doko A. Indications sérologiques de l'existence d'un réservoir sauvage de *Trypanosoma brucei* gambiense dans la réserve de la Biosphère de la Pendjari en République du Bénin. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1992, 72, 113-120.

Van Haeren C., Baderha B., Buscher Ph. & Verhulst A. Total haemolytic complement activity and immunoprecipitin levels in sera of goats infected with *Trypanosoma brucei* brucei. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1992, 72, Supplément I, p. 99.

Verhulst A. Réseau d'étude IMT/CCE sur la trypanotolérance. *Bull. Liaison bét. trypanotol.*, 1991, 3, 3.

Verhulst A., Doko A. and Pandey V.S. Réseau d'étude IMT/CCE sur la trypanotolérance. *Bull. Liaison Bét. trypanotol.*, 1991, 4, p. 4.

Verhulst A. and Pandey V.S. Problèmes techniques de l'estimation de la trypanotolérance des races de bovins et de petits ruminants. Rapport sur la consultation d'experts sur les aspects génétiques de la trypanotolérance. FAO, Rome 1991, Ref. M/US651 F/1/4.92/400, p. 7-8.

Verhulst A. and Pandey V.S. Technical Problems in the Estimation of Trypanotolerance within Cattle and Small Ruminant Breeds. In: Genetic aspects of trypanotolerance. FAO, An. Prod. and Hlth paper N°94, Rome 1992, 20-43.

Baderha B., Van Meirvenne N. and Verhulst A. Evolution de la parasitémie chez la souris femelle Swiss OF1 infectée par un clone polymorphe de *Trypanosoma brucei* brucei: effet limitant de l'administration simultanée du Ca et du Mg. In Proceedings of "Symposium des



Protozoologistes de Langue Française", UCL, Wavre, Brussels, 1990.

Doko A., Hornick J.L., Baderha B., Linden A., Demey F., Kageruka P., Van Meirvenne N. and Verhulst A. Forme nerveuse de la trypanosomiase expérimentale à *Trypanosoma brucei* brucei chez la chèvre de race Saanen. In Proceedings of "Symposium des Protozoologistes de Langue Française". UCL, Wavre, Brussels, 1990.

Guedegbe B., Verhulst A., Merlot L., Alard F. and Hallet D. Immobilisation d'ongulés sauvages à l'aide d'un mélange Carfentanyl-Xylazine dans le parc national de la Pendjari (République du Bénin). Cahiers d'Ethologie, 1991, 11 (3): 200-210.

Verhulst A., Van Meirvenne N., Buscher Ph. and Pandey V.S. Wild animals as reservoirs of animal and human trypanosomiasis. In Proceedings of EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology & Diagnostic Methods, 2-6 Nov.1992. Creta, Greece.

Verhulst A., Pandey V.S., Demey F. and Van Meirvenne N. Trypanotolerance of cattle and small ruminants in Africa: Research on mecha-

nism and selection criteria. In Proceedings of EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology & Diagnostic Methods, 2-6 Nov.,1992. Creta, Greece.

Pandey V.S., Doko A., Magnus E. and Verhulst A. Parasitological and serological prevalence of trypanosomiasis in various breeds of cattle from Benin. In Proceedings of EEC Contractant Workshops on Resistance or Tolerance of Animals to Disease and Veterinary Epidemiology & Diagnostic Methods, 2-6 Nov.1992. Creta, Greece.

Demey F., Pandey V.s., Baelmans R., Agbede G. and Verhulst A. The effect of storage at low temperature on the haemolytic complement activity of chicken serum. Vet.Res.Comm., 1993, 17, 37-40.

Verhulst A., Demey F., Pandey V.S., Baelmans R. and Hardouin J. Studies on disease resistance and immune responsiveness of livestock and poultry in the tropics. In Proceedings of Newcastle disease vaccination of village poultry in Africa and Asia. IMT seminar, Antwerp, 1991,37-38.

Dehoux J.P. and Verhulst A. 1993. La race bovine Borgou, une race trypanotolérante méconnue. Bulletin d'information sur les ressources génétiques animales, FAO-UNEP, 1994, 13, 43-50.

Makumyaviri A.M. Résistance relative et histopathologie chez la souris consanguine infectée avec *Trypanosoma brucei brucei*. Revue Méd.vét., 1993, 144, 191-196.

Doko S.A. Etude sur la trypanosomiase et la trypanotolérance bovines au Bénin. IMTA-Thèse de M.Sc., 14, Antwerpen 1991.

Guedegbe B.D. Contribution à la gestion et à l'aménagement des réserves de faune en République du Bénin. IMTA-Thèse de M.Sc., 11, Antwerpen, 1990.

Dehoux J.P. Productivité de la race bovine Borgou en milieu traditionnel au nord-est du Bénin. IMTA-Thèse de M.Sc., 19, Antwerpen, 1993.

Bizindaviyi L. Etude sur la réponse immune de deux races de moutons (Suffolk et Voskop) et leur résistance naturelle à l'infection expérimentale par *Haemonchus contortus*. IMTA-Thèse de M.Sc., 19, Antwerpen, 1994.

Contract number : TS2-A-103  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Vaccines against tropical theileriosis : studies on attenuation and loss of infectivity for ticks of attenuated Theileria annulata macroschizont-infected cell lines. \****

Titre : *Vaccin contre la theilériose tropicale : recherche sur la diminution et la perte d'infectivité chez les tiques à partir de cultures cellulaires infectées par microschantons atténués de Theileria annulata.*

▼ PROJECT LEADER:  
 Chef de projet : Patricia M. Preston  
 (C.G.D. Brown; L. A. Jackson; B. Shiels; D.K. Singh; I.A. Sutherland; A. Tait)

▼ HOST INSTITUTION :  
 Institution-hôte : University of Edimburgh, Institute for Cell,  
 Animal and Population Biology (Ashworth Laboratories),  
 Division of Biological Sciences (previously Department of Zoology).

▼ ADDRESS :  
 Adresse : Kings Buildings, West Mains Road,  
 Edimbourg, EH9 3JT, Scotland, U.K.

▼ TELEPHONE : +44-31-650 1000

▼ FAX : +44-31-667 3210

▼ INSTITUTIONS  
 ASSOCIEES :  
 Associated Institutions : - India : The National Dairy Development Board, Anand.  
 - Scotland : The Wellcome Unit of Molecular Parasitology,  
 University of Glasgow.

▼ KEY WORDS :  
 Mots clés : bovine tropical theileriosis; theileria annulata; cell line vaccines;  
 attenuation processes; altered gene expression; clonal selection of  
 parasite sub-populations; virulence marker.  
*theilériose bovine tropicale; theileria annulata; vaccin provenant  
 de cultures cellulaires; processus d'atténuation; expression génétique  
 modifiée; sélection clonale de sous-populations de parasites; marqueur  
 de virulence.*

▼ FINAL REPORT :  
 Rapport final : 63p. English.

\* see also STD1 Publication, 1989; TSD-200 project, p. 521

# Vaccines against tropical theileriosis: studies on attenuation and loss of infectivity for ticks of attenuated *Theileria annulata* macroschizont-infected cell lines

## Introduction

---

The tick-born protozoan parasite *Theileria annulata* is the cause of bovine tropical theileriosis, a debilitating or lethal disease resulting in widespread production losses from North Africa via India to China. Although attenuated macroschizont-infected cell line vaccines immunise effectively against field challenge, their attenuation requires prolonged *in vitro* culture. This program investigated the processes of attenuation, with the ultimate aim of finding ways of improving and, in particular, accelerating vaccine production.

## Objectives

---

The experimental objectives were : to investigate the processes underlying attenuation, i.e. to see if loss of virulence was due to the procedures used for the *in vitro* derivation of cell lines *per se* or to the preferential growth *in vitro* of either a particular sub-population of parasites or a particular host cell type; to find a marker(s) for virulent or avirulent parasites for selecting the different types of parasites from non-attenuated cell lines; to see if sexual recombination during tick passage might lead to a reversion of virulence.

## Materials and methods

---

The first stage involved : identifying a virulent infected cell line and producing serial 'attenuated' passages of the

line by prolonged cell culture; creating clones from the virulent cell line; producing monoclonal antibodies (mAb) to distinguish virulent and avirulent cell lines. The second stage examined the attenuated, virulent and cloned cell lines by : isoenzyme analysis; analysis of restriction fragment-linked polymorphism (RFLP) by hybridisation with two polymorphic cDNA probes and southern blotting; antigenic analysis with the mAbs produced earlier and immunofluorescent microscopy or flow cytometry; phenotypic analysis with a panel of 35 mAbs recognising bovine leucocyte antigens and flow cytometry; analysis of reactivity in mixed leucocyte reactions and responses to interleukin-2. Finally an attempt was made to assess the infectivity for ticks and reversion to virulence of attenuated cell lines.

## Results

---

### ■ Identification of a virulent *in vivo* derived cell line

Infection of cattle with a panel of 8 *in vivo* and *in vitro* derived *T. annulata* (Hisar) cell lines showed that only one line, an *in vivo* derived line (Ta His S45), was virulent. This indicated that attenuation of lines was not simply a feature of bovine leucocytes infected with sporozoites *in vitro* but more likely associated with the process of prolonged *in vitro* culture. The first hypothesis, that attenuation was associated with procedures used to derive cell lines *in vitro*, was therefore discarded. Two significant observa-

tions were made concerning parasite behaviour in cattle : virulence was associated with appearance of piroplasms prior to macroschizonts; attenuation with a delayed piroplasm parasitaemia. The most consistent clinical sign of attenuation was a reduction in pyrexia, especially the first peak, taken to be a response to the inoculation of foreign host cells.

### ■ Preparation of monoclonal antibodies and clones

Two mAbs out of 167 made by immunising mice, with either a virulent or an attenuated cell line, recognised both macroschizonts and the surface of the infected cells. One (mAb EU1) reacted with all cell lines and their later passages; the other (mAb EU106) reacted only with early passages of the virulent Hisar cell line. Clones derived from the virulent Ta His S45 *in vivo* derived cell line represented the three glucose phosphate isomerase (GPI) isotypes which make up the Hisar stock. They were therefore chosen to study the possibility that attenuation was due to the preferential growth in culture of a particular sub-population of parasites and/or host cells.

### ■ Clonal selection of GPI isotypes accompanied attenuation

GPI isoenzyme analysis showed that prolonged *in vitro* culture of the Ta His S45 *in vivo* derived cell line led to the preferential growth in culture of one parasite sub-population, isotype I, and the concomitant loss of isotypes II and III.

- RFLP analysis confirmed attenuation accompanied by clonal selection of parasite sub-populations

Confirmation that selection of particular parasite genotypes occurred very rapidly in culture was provided by finding novel hybridisation patterns in the parent cell line after 50-100 passages *in vitro* with two polymorphic cDNA probes and the fact that each cloned cell line possessed only one of the bands found in the parent line. While there was no evidence that the change in RFLP pattern with passage was directly associated with the reduction in virulence seen on inoculation of passages into cattle, the alterations observed by passage 50, when the culture was essentially clonal in nature, coincided with a markedly reduced pathogenicity. However, it appeared unlikely that selection alone was responsible for attenuation because the cell line continues to lose its virulence for cattle.

- Altered gene expression accompanied clonal selection and attenuation during *in vitro* culture

The pattern of loss of staining of macroschizonts in serial passages of the Ta His S45 *in vivo* derived cell line and clones with mAb EU106 provided evidence of altered gene expression during *in vitro* culture. Thus, reactivity was lost from macroschizonts in a gradually increasing proportion of the parent cell line indicating that selection of parasites displaying altered gene expression had occurred. Antigenic analyses confirmed that mAb EU106 reacted with a molecule found only in the virulent Ta His S45 derived cell line or the very early passages of other *in vivo* derived cell lines. Of the latter, all those tested so far have proved to be virulent for cattle. MAb EU1 recognised all cell lines on which it was tested.

- Lack of relationship between host cell phenotype, clonal identity and attenuation/virulence

The phenotypic markers of the *in vivo* derived cell lines tested were consistent with the original cell lines comprising clones of cells of myeloid origin. *In vitro*, sporozoites were very selective, preferring to establish in cells bearing macrophage/monocyte markers rather than in those bearing BoCD4 or BoCD8. Virulent, avirulent and cloned cell lines all changed their phenotypic markers rapidly on culture. The early passages of clones expressed one of three basic patterns of markers but their GPI isotypes were not linked to a particular cell phenotype. Coexpression of markers for myeloid lineages plus expression of B-cell and T-cell markers, including gamma/delta T-cell markers, occurred. This unusual expression of cell surface molecules raised questions as to its possible detrimental effect on the intra-cellular interactions of the host and its role in the pathogenesis of tropical theileriosis. Finding that cells bear C3bi receptors, used by many microorganisms to enter host cells, suggested a route of transfer for macroschizonts from donor to recipient's cells. Although alterations in phenotypic markers made it difficult to define the phenotype of the clone which survived passage of the virulent Ta His S45 *in vivo* derived cell line, the overall results pointed to the later passages of the cell lines having arisen by preferential growth of a cloned sub-population of parasites inhabiting a cell with a phenotype better able to survive prolonged culture than some other phenotypes.

- Loss of reactivity in mixed leucocyte reactions (MLR) and variable responses to IL-2

Differences occurred in the proliferative response of clones to IL-2 and in their ability to stimulate uninfected lymphocytes to proliferate in MLR. A reduction in ability of the late passages of the attenuated cell line to stimulate

uninfected lymphocytes to proliferate in MLR also occurred. These results suggested that infected cells may also be responsible for the proliferation of uninfected lymphocytes recorded during tropical theileriosis.

- Studies on infectivity for ticks and reversion to virulence of attenuated cell lines in cattle

The inability of ticks to pick up parasites from the calves infected with p156 of the Ta Ode cell line precluded any conclusions about this possibility being made.

## Conclusions

This programme provided the following data of relevance to vaccine development :

- Both altered gene expression and selection of parasite sub-populations appeared to be involved in the loss of pathogenicity of *T. annulata* during continuous culture.
- *In vitro* culture was accompanied by the selective growth of certain types of host cell only; but these did not appear to be linked to a specific parasite type.
- The subsequent loss in stimulatory capacity in the MLR with time in culture plus the reduced early peak of pyrexia, taken to be an allograft reaction to foreign cell lines, suggested a possible reason for the diminished virulence of the Ta His S45 *in vivo* derived cell line in cattle.
- MAbs EU1 and EU106 are the first mAbs to be isolated which recognise both parasite antigens and molecules, presumed to be of parasite origin, on the surface of macroschizont-infected cells. The biological function of these antigens is of considerable interest bearing in mind the role of the macroschizont-infected cell in the pathogenesis of tropical theileriosis and as a target for protective immune mechanisms.
- The pattern of reactivity of mAb EU1 suggested it recognised a conserved epitope, which should be investigated for a potential role in

the induction of protective immunity.

- The pattern of reactivity of mAb EU106, in recognising only cells known to be virulent, suggested it might serve as a marker for discriminating between virulent and avirulent sub-populations of *T. annulata*. If this proves to be so, then mAb EU106 could be used to accelerate the development of cell line vaccines by selection of attenuated populations from recently derived, virulent lines and confirmation of

the absence of virulent parasites. Adoption of such a method would avoid the necessity for prolonged *in vitro* passaging of cell lines, every time a new cell line vaccine is needed.

### *Review meeting and publications*

---

The second international meeting on the orientation and coordination of research on tropical theileriosis was held at the National Dairy De-

velopment Board (N.D.D.B.), Anand, India as part of this programme. Its outcome was recorded as 'Orientation and coordination of research on tropical theileriosis.' Proceedings of the second EEC workshop. March 18-22, 1991. Eds D.K.Singh & B.C. Varshney. Animal Diseases Research Laboratory, N.D.D.B., Anand, 388 001 (India).

A video film, entitled 'Bovine tropical theileriosis : a decade of support by D.G.XII', was made to illustrate the disease and the work carried out on its control by the EC theileriosis network with support from the STD programmes of D.G. XII.

AMELIORATION  
DES PRODUCTIONS AGRICOLES

IMPROVEMENT OF AGRICULTURAL  
PRODUCTS

PRODUCTION  
ANIMALE



ANIMAL  
PRODUCTION

Amélioration des productions animales

Improvement of animal production

Contract number : TS2-A-074  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Improving the utilization of maize stover  
 and other crop residues as ruminant feeds in Egypt.***

Titre : *Amélioration de l'utilisation de tiges de maïs et autres  
 résidus de récolte comme aliment pour ruminants en Egypte.*

▼ PROJECT LEADER : Klaus Becker  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Universität Hohenheim,  
 Institution-hôte : Institut für Tierproduktion in den Tropen und Subtropen.

▼ ADDRESS :  
 Adresse : 70593 Stuttgart, Deutschland.

▼ TELEPHONE : +49-711-459 0

▼ FAX : +49-711-459 27 85

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :  
 - U.K. : Institute of Grassland and Animal production, Hurley.  
 - Egypt : Animal Production Research Institute, Cairo.

▼ KEY WORDS : feeds; crop residues; nutritive value; feed intake; digestibility.  
 Mots clés : *aliment pour animaux; résidu de récolte; valeur nutritive; prise d'aliment; digestibilité.*

▼ FINAL REPORT : 79p. English.  
 Rapport final :

# Improving the utilization of maize stover and other crop residues as ruminant feeds in Egypt

## Objectives of the research

---

Crop residues play an important role in the sustainability of agriculture in developing countries. There is a shortage of arable land restricting the cultivation of plants other than cereals. Animal production thus depends heavily - and in some seasons of the year entirely - on the efficient use of crop residues as animal feed.

Many attempts have been undertaken to upgrade the often poor quality of crop residues by chemical and/or physical treatments. Since these have generally proved to be uneconomical, more attention has been given to the possible exploitation of inherent differences between varieties in the nutritive value of crop residues.

This alternative was evaluated within the EEC-STD project. Research institutions from Great-Britain (IGER, Hurley), Egypt (APRI, Cairo) and Germany (University of Hohenheim) collaborated in the effort. The International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA) played an important part in providing most of the advanced crop varieties even though ICARDA was not a contractor in the project.

Within the research, particular emphasis was given to the following questions :

- Does genetic variation in the nutritive value of crop residues exist and how does this variation influence the corresponding grain yield;
- What are the intrinsic factors determining the quality of crop residues;

- Which analyses are most relevant to assess the quality of crop residues and how can these be modified to deal with large entries of samples most accurately and efficiently.

## ■ Work completed by cooperative partners

### ■ Egypt

Stovers from agronomically promising maize, wheat and rice varieties were selected and tested in growth trials. An analytical infrastructure for the evaluation of digestion kinetics and the partitioning of fermentation products between short chain fatty acids and microbial biomass was established at APRI in Cairo. The effect of the various crop residues on animal metabolism could thus be monitored and the relative importance of digestive parameters could be assessed *in vivo* and *in vitro*.

### ■ Great Britain

The chemical micro-structure of crop residues was examined. Procedures were developed to isolate phenolic acids from stovers. The isomerizations and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls were determined and related to straw quality.

### ■ Germany

Factors influencing voluntary feed intake were analysed. Techniques for the prediction of intake were developed and validated with 54 different cereal straws. The role of the fermentative partitioning of degraded stovers between short chain fatty acids and microbial biomass was examined using isotopic methods. The concept of a partitioning factor (PF) was developed and its relevance tested *in vivo*.

## Results

---

### ■ Genetical variations, grain yields and their relationship

Genetically determined variation in the nutritive value of cereal straws was discovered. The heritability of the examined quality parameters was high ( $h^2 > 0.7$ ). The genetical determination was consistent over three years and four locations in Syria and in Germany. However, in contrast to the results obtained by other scientists, a significant negative relationship was found between grain yield and straw quality under severe stress situations.

It was possible by the innovative use of Near Infra Red Spectroscopy (NIRS) to specify quality parameters of straw more precisely. The initial fermentation of straws proved to be decisive for voluntary feed intake. About 75% of the variation in voluntary feed intake of 54 cereal straws could be explained by *in vitro* gas production at 8 hours of incubation. In comparison, *in vivo* digestibility (at all incubation times beyond 24 hours) accounted for only about 60% of the variation. NIRS was successfully calibrated with the *in vitro* gas volumes at early hours, thus making it possible to examine approximately 3 000 stovers for quality parameters.

One hundred barley genotypes were examined. The statistical evaluation revealed highly negative correlations between gas volume at early hours of incubation and grain yield ( $r > -0.70$ ). The negative correlations became substantially weaker when gas volumes at later incubation times were related to grain yields. At 48 hours, the incubation time most frequently used for *in*



*vitro* and *in sacco* measurements, the correlation was  $r = -0.40$ .

NIRS was also directly calibrated with the voluntary feed intakes of 54 cereal straws. NIRS blind predictions for 17 feed intakes were very accurate ( $R^2 = 0.88$ ). The correlations between prospective feed intakes (as predicted by NIRS) and grain yield were also significantly negative ( $r = -0.78$ ) for 100 genotypes of barley.

However, the relationships between stover quality and grain yield were insignificant when the 100 genotypes were grown in Germany (Hohenheim).

The conclusion was reached that there is considerable scope for selecting varieties with superior feeding value. The advantages of genetically superior straws can, however, only be exploited without detriment to grain yield under growing conditions free from water stress.

#### ■ Problems connected with voluntary feed intake

It was not possible to confirm the widely accepted view that kinetic descriptions of fermentation predict intake more accurately than simple endpoint measurements. Within the project the voluntary feed intake of 54 cereal stovers was analysed. 75% of the variation in DMI (Dry Matter Intake) was explained by the rate and extent of *in vitro* gas production as described by the model  $y = a + b(1 - e^{-ct})$ . The same accuracy of prediction was however achieved by simple correla-

tions with gas volumes at 4, 6 or 8 hours of incubation.

More of the variation in DMI ( $R^2 = 0.82$ ) was accounted for when fermentation characteristics of the cell wall were examined (model  $y = a + b(1 - e^{-ct})$ ). Again, there was no statistical advantage in the use of the model as NDF (Neutral Detergent Fibre) incubations for 30 hours (and onwards) sufficed and accounted for more than 81% of the variation in DMI.

These findings corroborate the key role which fibre plays in the voluntary feed intake of cereal straws and more insight into the potential of cereal straws can be gained by looking into the properties of the fibre fraction.

#### ■ Partitioning of fermentation products between SCFA and microbial cells: the partitioning factor (PF)

So far, little attention has been paid to the two major products to which straws are fermented i.e. SCFAs (Short Chain Fatty Acids) and microbial cells. The 54 stovers analysed within the EEC project for voluntary feed intake produced between 20 and 40 g of cells per 100 g true fermented substrate. These results were obtained by a simple modification of the Hohenheim *in vitro* gas production test. Rumen apparent and true digestibility can be determined in one incubation and the microbial yield can be calculated as the difference between both. This analytical approach was confirmed by isotopic studies using  $^{15}\text{N}$ .

The interpretation of these results led to the conclusion that a degree of independency exists between the production of SCFA and microbial cells. We developed the concept of a partitioning factor to indicate the purpose for which the fermented matter has been used. This factor proves to be highly significant in the prediction of DMI. The inclusion of PF to gas volumes at 4, 6 and 8 hours of incubation improved the correlation from  $R^2 = 0.75$  to  $R^2 = 0.83$ .

Stovers which incorporated more of the fermented matter into microbial cells had higher feed intakes.

### Publications

Meyer M., Einfeld C.H.P., Ceccarelli S., Blümmel M., Gland A. and Geiger H.H., 1993. Assessment of straw quality characteristics of barley grown in rainfed marginal environment in North Syria. 18<sup>th</sup> Eucarpia Foddercrop Section Meeting 25 - 28.08.1993. Coen Nordford, Borwegen. Accepted.

Gland A., Einfeld C.H.D., Meyer M., Blümmel M., Ceccarelli S. and Geiger H.H., 1993. Strohqualität von Gersten in den Trockengebieten Nord Syriens. 37. Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenwissenschaften. 30.09 - 02.10.1993, Giessen. Accepted.

Blümmel M., Steingass H., Becker K. and Koppenhagen M., 1993. Produktion von SCFA,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  und Mikroben bei der *in vitro* Fermentation im Hohenheimer Futterwerttest. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 1: 9.

Blümmel M., Orskov E.R., Becker K., Soller H., 1990. Anwendung des Hohenheimer Gassertests zur Schätzung kinetischer Parameter der Pansenfermentation. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 65: 56-57.

Turner B.L., Mueller-Harvey I. and Mc Allan A., 1993. Light induced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. Phytochemistry, Vol. 33: 791-796.

Numéro de contrat : **TS2-A-157**  
Contract number :

▼ TITRE : ***Productivité des espèces fourragères en climat tropical et possibilités de valorisation par les animaux.***

Title : *Productivity of forage species in tropical areas and possible use by livestock.*

▼ CHEF DE PROJET : Gilles Lemaire  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Institut National de la Recherche Agronomique, INRA.  
Host institution :

▼ ADRESSE : Station d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères,  
Address : 86600 Lusignan, France.

▼ TELEPHONE : +33-49-55 60 00

▼ FAX : +33-49-55 60 68

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :  
- Espagne : Université de Madrid, ETSIA.  
- Maroc : Université IAV Hassan II, Rabat.  
- Pays-Bas : Université de Wageningen.  
- Sénégal : ISRA - LNRV, Dakar.  
- Vénézuëla : FONAIAP, Coro.

▼ MOTS CLES : fourrage; graminée; légumineuse; azote; climat; productivité  
potentielle; morphogénèse.  
Key words : *forage; grasses; legumes; nitrogen; climate; potential productivity; morphogenesis.*

▼ RAPPORT FINAL : 30p. Français.  
Final report :

# Productivité des espèces fourragères en climat tropical et possibilités de valorisation par les animaux

## Objectif des recherches

L'objectif des recherches entreprises dans le cadre de ce programme était de vérifier la pertinence des modèles de productivité des peuplements fourragers mis au point en climat tempéré dans des situations variées de conditions écologiques. Ces modèles, une fois leur degré de généralisation testé, doivent pouvoir être utilisés comme outil de diagnostic agronomique pour estimer les potentialités des productions fourragères dans une zone donnée et déterminer le ou les facteurs limitants essentiels.

La production estimée par ces modèles ne correspond en fait qu'à la production primaire. Il est donc indispensable d'estimer la part de cette production qui est véritablement utilisable par les animaux afin d'estimer la productivité des systèmes d'élevage.

En réalité, ce projet visait deux objectifs complémentaires :

- un objectif scientifique concernant la modélisation de la production des peuplements prairiaux en milieu tropical;
- un objectif d'application de la recherche au développement agricole dans les pays tropicaux, grâce à la formation par la recherche de cadres locaux à l'utilisation des outils de diagnostic agronomique que constituent les modèles de production végétale.

Si le premier objectif a pu être globalement atteint grâce aux nombreuses données originales qui ont été collectées dans le cadre de ce programme, le deuxième objectif n'a pu réellement être atteint du fait de la très faible participation de chercheurs et de

techniciens dans les pays partenaires du projet, exception faite du Maroc.

## Principaux résultats obtenus

Le programme de recherche comprenait trois parties complémentaires :

### ■ Modélisation de la croissance et des prélèvements d'azote

Ces modèles initialement développés en milieu tempéré ont été vérifiés dans une large gamme climatique : France, Espagne, Maroc, Sénégal et Guadeloupe, sur deux types de peuplements, *Luzerne* et *Sorgho*, dans le cadre d'un réseau expérimental. Les résultats ont permis de montrer que les paramètres

des modèles étaient peu variables entre sites. Ainsi la généralisation de ces modèles à une large gamme de situations pouvait être réalisée. L'extension de ces modèles à différentes espèces fourragères tropicales a pu être entreprise en Guadeloupe et en Guyane. Là encore on a pu obtenir une très bonne stabilité des paramètres à l'intérieur d'un même groupe métabolique (C3 ou C4). Par contre, en ce qui concerne les légumineuses en milieu tropical, on a pu montrer une déviation systématique de la nutrition azotée par rapport au modèle mis au point en milieu tempéré. Des investigations plus analytiques seront nécessaires pour en préciser les causes; il semblerait cependant qu'une différence d'utilisation

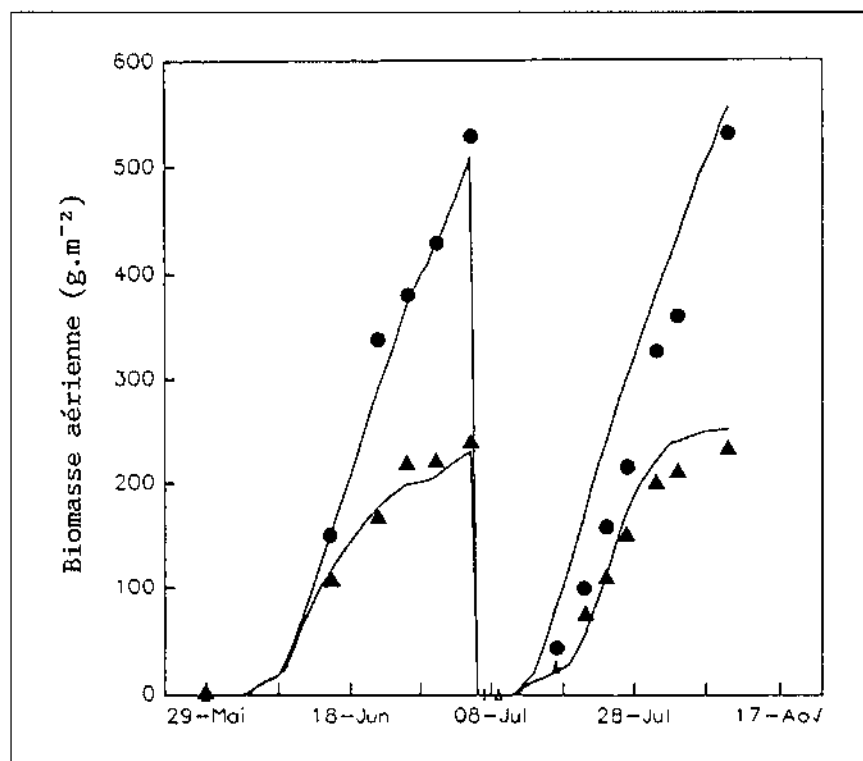


Figure 1 - Simulation de la croissance de la Luzerne en conditions irriguées (●) ou en conditions de sécheresse (▲), — modèle.

des réserves azotées après la coupe puisse être à l'origine des écarts.

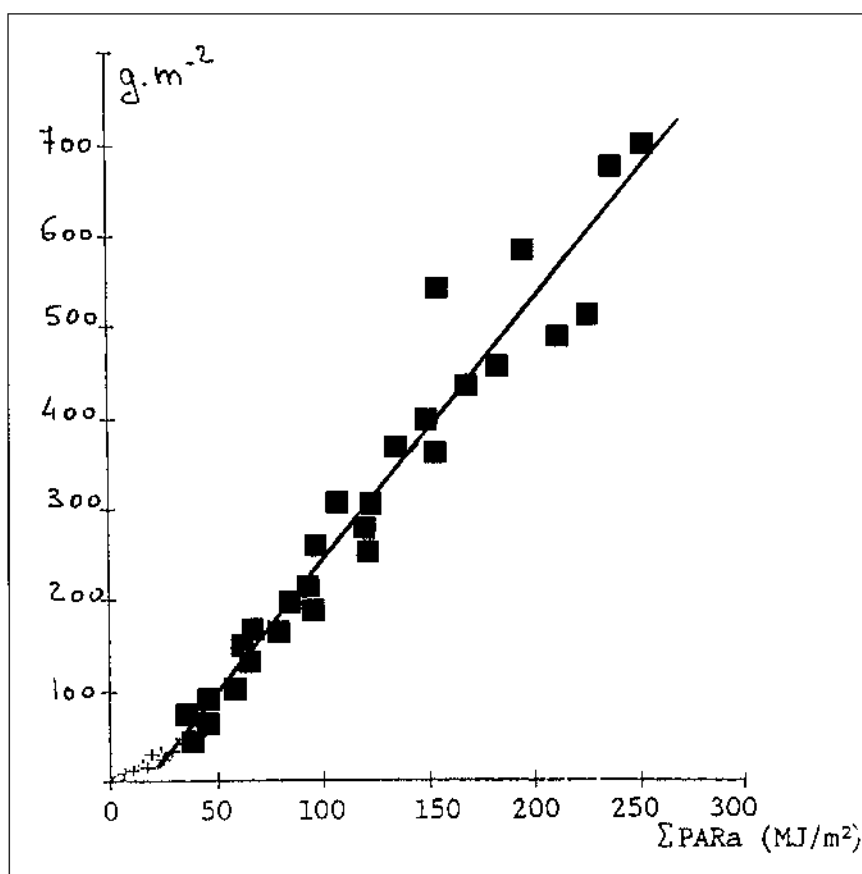
L'ensemble des données qui ont pu être accumulées dans ce travail expérimental a permis de confirmer globalement la généralité des deux modèles de base utilisés, pour des conditions de milieu très contrastées et pour une large gamme d'espèces. Les données du réseau expérimental n'ont pas toujours été obtenues dans des conditions de croissance non limitantes, mais l'utilisation conjointe des deux modèles a permis en règle générale de diagnostiquer avec relativement de certitude les niveaux réels de nutrition azotée des cultures. Pour les graminées de type C4, il est possible de proposer une efficacité de conversion du rayonnement en biomasse aérienne comprise entre 2,5 et 3,0 g/MJ dans une large gamme de conditions. La cinétique de dilution de l'azote semble obéir à une loi unique indépendante du milieu. Il s'avère donc possible, pour l'ensemble des espèces étudiées, d'utiliser directement ces modèles pour prédire leur croissance potentielle, à l'exception des légumineuses pour lesquelles le fonctionnement de la nutrition azotée en milieu tropical reste peu reproductible.

#### ■ Estimation de la productivité primaire et de la productivité récoltable de peuplements de graminées tropicales

La prise en compte de la morphogénèse des différentes espèces et plus particulièrement de la dynamique d'apparition et de senescence des tissus foliaires au sein d'un peuplement de graminées a constitué une contribution scientifique tout à fait originale de ce programme à la connaissance de l'écologie des peuplements fourragers tropicaux. En effet, nous avons pu montrer sur différents types de peuplements que la durée de vie des feuilles était une caractéristique spécifique fondamentale à connaître car elle détermine de manière fondamentale le mode d'utilisation optimum de ces peuplements au pâturage : les espèces à durée de vie

Lieu	Variétés	Efficience (g.MJ <sup>-1</sup> )	
Lusignan 1985	Oasis	Cycle 1	2.43
		Cycle 2	2.56
		Cycle 3	2.62
Lusignan 1990	Oasis	Cycle 1	2.48
Grignon 1989	Oasis	Cycle 1	2.67
		Cycle 2	2.35
Guadeloupe 1989	Piper	Cycle 1	2.84
		Cycle 2	2.84
	Oasis	Cycle 1	3.20
		Cycle 2	3.06
Guadeloupe 1990	Piper	Cycle 1	2.83

Figure 2 - Valeurs de l'efficacité de conversion du rayonnement intercepté en biomasse aérienne pour différentes variétés de Sorgho cultivées en milieu tropical ou en milieu tempéré.



$$a = 2.85 \text{ g/MJ}$$

Figure 3 - Relation entre la matière sèche aérienne et la quantité de rayonnement intercepté pour le Sorgho cv. Oasis en Guadeloupe.

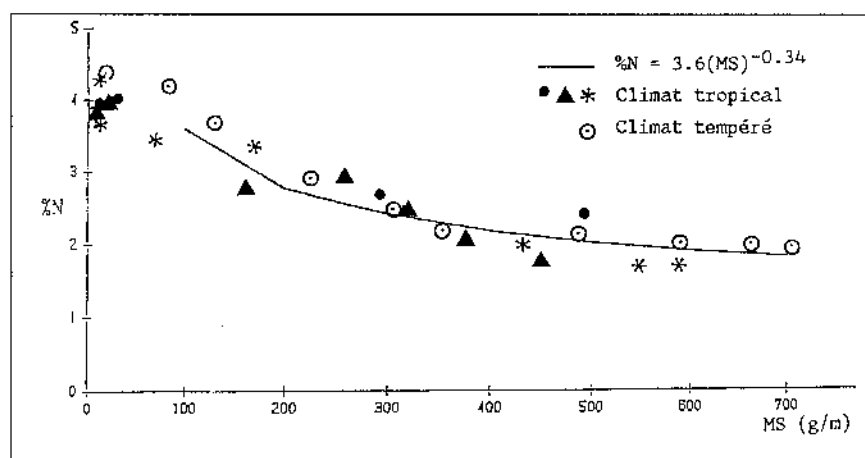
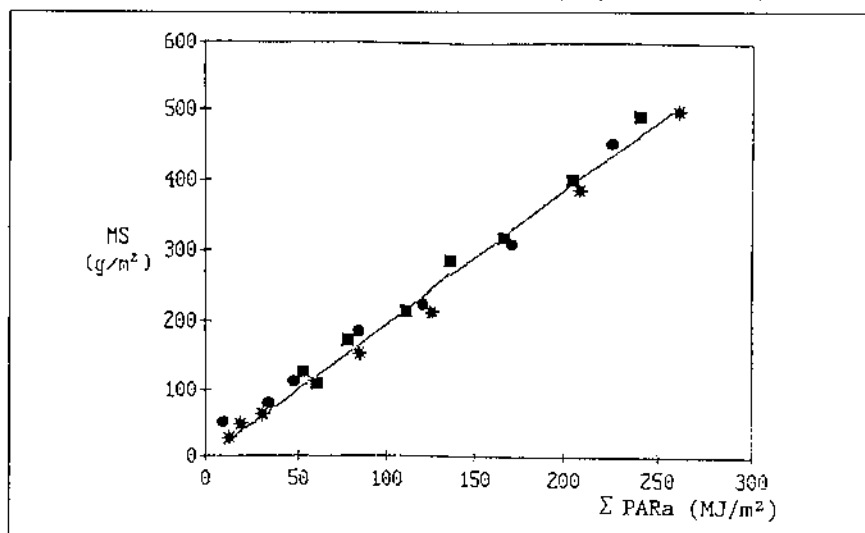
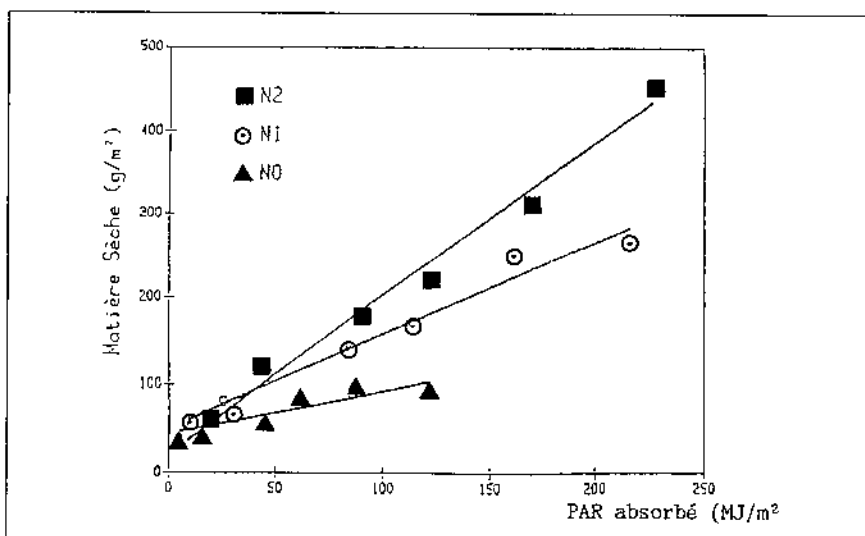


Figure 4 - Courbe de dilution de l'azote d'un peuplement de Sorgho.



Dichanthium (●) - Pangola (■) - Brachiaria (\*)

Figure 5 - Efficacité de conversion comparée pour trois espèces en conditions non limitantes.



N0 (▲) - N1 (○) - N2 (■)

Figure 6 - Effet de l'azote sur l'efficacité de conversion d'un couvert de *Dichanthium aristatum*.

courte des feuilles (espèces stolonifères) devant être pâturées de manière beaucoup plus fréquentes que les espèces à durée de vie longue des feuilles (espèces cespitueuses). L'évolution de la qualité du fourrage (rapport feuilles/tiges) est également directement influencée par la durée de vie des feuilles. Des études sur l'effet de la nutrition azotée sur la morphogénèse des graminées tropicales ont pu montrer que des apports d'azotes non suivis d'une augmentation de la fréquence de pâturage pouvaient conduire à des gaspillages importants de fourrage et à une détérioration de la qualité du fourrage offert aux animaux.

Les connaissances relativement nouvelles et originales que nous avons élaborées durant ce programme devraient permettre d'adapter le mode de pâturage des différentes espèces de graminées fourragères tropicales en fonction de leur morphogénèse afin d'obtenir une valorisation du fourrage produit.

#### ■ Dynamique des populations de légumineuses dans les peuplements pâturés

Des expérimentations menées par l'Université de Wageningen au Costa Rica ont pu montrer qu'il existait une très forte interaction entre les espèces de légumineuses introduites, les espèces de graminées associées et le chargement. La meilleure persistance est obtenue avec l'*Arachis pintoï* associée avec *Brachiaria humidicola*. Les autres espèces de légumineuses apparaissent très sensibles au pâturage et disparaissent très rapidement.

En Guadeloupe, la contribution des légumineuses dans une prairie naturelle a été analysée. Il a été ainsi démontré que l'association naturelle *Dichanthium-Desmodium* apparaissait relativement bien adaptée aux systèmes de production traditionnels des îles Caraïbes.

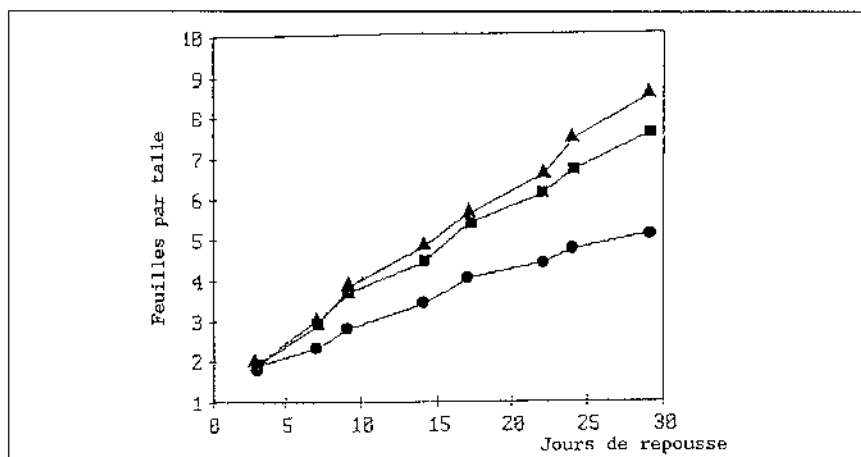
## Conclusions

Les objectifs scientifiques du projet initial ont été en grande partie atteints. En effet, les modèles de croissance et de nutrition azotée qui avaient été mis au point en climat tempéré se sont montrés fiables, du moins dans leur principe, en milieu tropical. Les écarts obtenus par rapport à ces modèles ont pu, dans la grande majorité des cas, être attribués à des conditions limitantes de nutrition azotée. A cet égard, les deux modèles de croissance et de nutrition azotée sont indissociables et doivent donc être mis en oeuvre de façon simultanée.

Le modèle de nutrition azotée semble être le plus robuste et le plus directement généralisable. Il semble bien qu'une courbe de dilution unique de l'azote puisse être proposée pour l'ensemble des espèces de type C4, comme cela avait été démontré pour les espèces C3. Cette relation reste remarquablement invariante en milieu tropical comme en milieu tempéré; elle peut donc servir de référence du niveau réel de nutrition azoté d'un peuplement. Il s'agit là, à notre avis, d'un résultat tout à fait remarquable permettant de proposer un véritable outil de diagnostic et d'aide à la décision pour la conduite des peuplements fourragers.

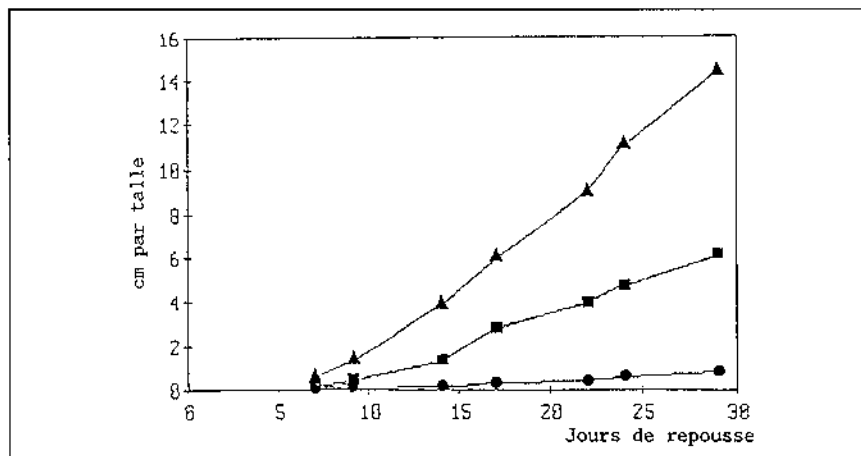
Le modèle de croissance est apparu plus sensible aux conditions du milieu. On doit cependant noter que les conditions expérimentales n'ont pas toujours permis de maintenir des situations non limitantes de nutrition azotée. Lorsque celles-ci ont été maintenues de façon certaine, il a été possible de vérifier la quasi constance de l'efficacité de conversion.

Les résultats obtenus ont également permis de montrer, pour une productivité primaire identique ou très voisine, la différence importante entre espèces en terme de productivité valorisable par les animaux. Nous avons pu démontrer le rôle prépondérant de la durée de vie des feuilles des différentes



N0 (●) - N1 (■) - N2 (▲)

Figure 7 - Effet de l'azote sur le rythme d'émission de feuilles d'une graminée tropicale (*Dichanthium aristatum*).



N0 (●) - N1 (■) - N2 (▲)

Figure 8 - Effet de l'azote sur l'élongation caulinaire d'une graminée tropicale (*Dichanthium aristatum*).

espèces dans la détermination de cette production valorisable. Ainsi, la connaissance de cette caractéristique morphogénétique propre à chaque espèce et aisément mesurable doit permettre de mieux adapter les rythmes de pâturage pour minimiser les pertes de sénescence, éviter la dégradation de la qualité et donc optimiser la production animale. A cet égard, on peut regretter que l'expérimentation très ambitieuse qui a été mise en place au Vénézuéla, et qui visait à chiffrer ces phénomènes en situation réelle de pâturage, n'ait pu se mettre en place qu'avec un certain retard et ne nous ait pas encore fourni les résultats escomptés.

Malgré les difficultés de mise en place et de suivi des expérimentations, nous pouvons donc raisonnablement penser que le programme réalisé a permis d'aboutir à des conclusions scientifiques satisfaisantes. Cependant on doit constater que ces conclusions reposent en très grande partie sur des résultats obtenus en stations de recherche, et qu'un faible nombre de cadres locaux ont été directement impliqués dans leur obtention et leur valorisation. Nous devons avouer qu'il s'agit là d'un échec relatif par rapport à l'un des objectifs de ce projet qui était d'effectuer un transfert de technologie vers les organismes de recherche et de développement locaux. Ceci n'a pu être réellement réalisé que lorsque

l'expérimentation a pu être mise en place et gérée directement par des structures locales d'enseignement et de recherche. Ce fut le cas exemplaire du Maroc, où l'Institut Hassan II, du fait de sa propre capacité de recherche a pu participer activement à l'ensemble du projet et s'en servir comme outil de formation de ses ingénieurs. Par contre, au Sénégal, l'implication directe des cadres locaux n'a pas été possible et l'expérimentation réalisée sur place n'a été en réalité qu'une « prestation de service » assurée par une stagiaire d'origine française.

Nous tenons à insister sur cet aspect de notre travail que nous jugeons globalement peu satisfaisant. Il est évident que cela dépend essentiellement des structures locales et des capacités d'encadrement scientifique que l'on peut trouver sur place. Nous pensons que les mêmes conclusions scientifiques de base auraient pu être obtenues avec un réseau restreint. L'ouverture plus large nous avait paru une nécessité. Elle a entraîné une perte de charge importante, mais également une lourdeur très importante dans la gestion financière et administrative du projet, au détriment d'une véritable animation scientifique qu'il nous a été difficile de réaliser du fait de la trop grande hétérogénéité des participants.

## Publications

### ■ Publications dans des revues scientifiques à comité de lecture :

Béreau M., Ingrand S., Martin P. et Lemaire G., 1992. Caractérisation des principales variables d'état de couverts de *Digitaria swazilandensis* Stent. et *Brachiaria humidicola* Schweickdt pâturés en continu par des zébus en Guyane française, *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 45, 357-366.

Cruz P. et Rivero Moreno J.L., 1993. Crecimiento potencial comparado de una gramínea natural (*Dichanthium aristatum*) y una gramínea cultivada (*Digitaria decumbens*) sometida a variaciones de fotoperíodo, *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* (sous presse).

Greenwood D.J., Lemaire G., Gosse G., Cruz P., Draycott A. et Neeteson J.J., 1990. Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass, *Annals of Botany*, 66, 425-436.

Khaity M. et Lemaire G., 1992. Dynamics of shoot and root growth of lucerne after seeding and after cutting, *Eur. J. Agron.*, 1, 241-247.

Leblanc C., Lemaire G. et Mandret G., 1994. Relation entre la croissance en matière sèche et la quantité de rayonnement intercepté par une culture de sorgho fourrager au Sénégal (soumis à Fourrages).

Lemaire G., Orillon B., Gosse G., Chartier M. et Allirand J.M., 1991. Nitrogen distribution with lucerne canopy during regrowth : relation with light distribution, *Annals of Botany*, 68, 483-488.

Lemaire G., Khaity M., Orillon B., Allirand J.M., Chartier M. et Gosse G., 1992. Dynamics of accumulation and partitioning of N in leaves, stems and roots of lucerne (*Medicago sativa* L.) in a dense canopy, *Annals of Botany*, 70, 429-435.

Manteaux J.P., Cruz P., Naves M. et Fournet J., 1991. Gestion d'une prairie tropicale enrichie en légumineuses. Aspects agronomiques et zootechniques, *Fourrages*, 126, 137-148.

### ■ Publications dans des congrès :

Cruz P., Alexandre G. et Baudot H., 1989. Cinétique de croissance foliaire et stolonifère d'un peuplement de *Digitaria decumbens* au cours de la repousse. XVI Congrès International des Herbages, Nice, 499-500.

Cruz P. et Schemoul E., 1991. Effet de l'azote sur l'expression du potentiel de croissance d'une prairie naturelle à base de *Dichanthium aristatum* en Guadeloupe (Antilles françaises). VIe Congrès International des Terres de Parours, Montpellier, 360-363.

Manteaux J.P., Cruz P., Naves M. et Fournet J., 1991. Etude d'une légumineuse spontanée (*Desmodium intanum*) dans une savane à *Dichanthium* sp. Contribution à la biomasse et utilisation par les animaux. IVe Congrès Inter-

national des Terres de Parours, Montpellier, 645-647.

Naves M., Cruz P., Malafosse A. et Manteaux J.P., 1993. Growth kinetics of *Digitaria decumbens* following cattle grazing at two stocking rate levels. XVIIth International Grassland Congress, New-Zealand, Australia (sous presse).

### ■ Rapports de stages :

Baya B., 1989. Croissance et productivité de la luzerne en relation avec son mode d'exploitation. Mémoire de 3e cycle d'Agronomie, IAV Hassan II, Rabat.

Benali O., 1991. Croissance et productivité du Sorgho fourrager dans des conditions contrastées de nutrition azotée. Mémoire de 3e cycle Agronomie, IAV Hassan II, Rabat.

Ben Maimoun A., 1991. Productivité de deux luzernières en relation avec le régime hydrique. Analyse et modélisation. Mémoire 3e cycle Agronomie, IAV Hassan II, Rabat.

Cooman A. et de Roock E., 1990. Analyse de la croissance du sorgho fourrager et de la luzerne en conditions contrastées de nutrition azotée et d'alimentation hydrique. Mémoire d'Ingénieur Agronome en Génie Rural, Université de Leuven, Belgique. IAV Hassan II, Rabat, Maroc.

Huguet J.M., 1989. Contribution à l'étude de la croissance d'une graminée fourragère tropicale stolonifère perenne : le pangola (*Digitaria decumbens* Stent). DAA ENSA, Montpellier, 56pp.

Leblanc C., 1990. Productivité du sorgho fourrager en zone sahélienne à climat subcanarien. Institut Supérieur Technique d'Outre-Mer, Le Havre, 68pp.

Manteaux J.P., 1990. Amélioration d'une savane à *Dichanthium* par l'introduction du Siratro. Conséquences agronomiques et zootechniques. DAA ENSA/A, Nancy, 62pp.

Schemoul E., 1988. Productivité primaire et morphogénèse d'un peuplement de « petit foin » (*Dichanthium* sp.) en Guadeloupe. DAA ENSA, Montpellier, 56pp.

Tournebize R., 1988. Contribution à l'étude de la croissance de *Brachiaria decumbens* Stapf en Guyane française. Maîtrise de Sciences et Techniques, Université de Corse Pascal Paoli, 21pp.

Contract number : **TS2-A-233**  
 Numéro de contrat :

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Adaptation of camels to harsh grazing conditions.</i></b>  |
| Titre :   | <i>Adaptation des chameaux à des conditions pastorales sévères.</i>  |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | J.L. Tisserand<br>(Prof. W. Von Engelhardt, University of Hanover;<br>Prof. Cianci, University of Pisa)  |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Centre International des Hautes Etudes Agronomiques<br>Méditerranéennes, CIHEAM.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Rue Newton 11,<br>75116 Paris, France.   |
| ▼ TELEPHONE :   | +33-1-47 23 45 55  |
| ▼ FAX :   | +33-1-47 20 10 47  |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Deutschland : Physiologisches Institut des Tierärztlichen Hochschule Hannover, Prof. Von Engelhardt.</li> <li>- Italy : Università di Pisa, Prof. Cianci.</li> <li>- Tunisia : CIHEAM, Prof. Kayouli.</li> <li>- Morocco : CIHEAM, IAV Hassan II, Prof. Narjisse.</li> <li>- France : CIHEAM, INRA Theix, Prof. Jouany.</li> <li>- France : ENSA Montpellier, Prof. Cordesse.</li> <li>- Tunisia : CIHEAM, ISA Mateur, Prof. Kamoun.</li> </ul> |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | camels; feeding; behaviour; digestion; nutritional needs; milk; meat.<br><i>chameau; alimentation; comportement; digestion; besoins nutritionnels; lait; viande.</i>   |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 47p. English (+ second volume of appendices).  |



# Adaptation of camels to harsh grazing conditions

This project aims at a better knowledge of the digestion and feeding of camelids in order to maintain or even develop these animal species which are vital for some arid and warm regions. Five points were studied in particular :

- Feeding behaviour;
- Nutritional value of feeds;
- Functions of the forestomach;
- Nutritional needs;
- Value of dromedary products.

## ■ Feeding behaviour

The composition of the vegetation, the plants chosen by dromedaries and the nutritional value of the chosen diet were observed in relation to the seasons on four different types of pasture lands found in the mediterranean zone.

Studies were conducted on llamas in the South of France and comparisons were made with small ruminants.

Regular observations at 14-day intervals of experimental animals were made in Morocco, Sudan and France. Each individual animal was observed twice daily for 10 minutes during the various seasonal conditions. Feeding, eating, resting, rumination activity and the plants selected from pasture were recorded. Preferred fodder plants were sampled for chemical analysis and further tests.

The nylon-bag method and in vitro fermentation tests were used in the present program to estimate the microbial digestion of plants selected from pasture. Both methods give an estimate of digestibility.

The main conclusions of these studies are that dromedaries are grazers but do not compete with cattle and sheep on a pasture, which is not the case of llamas.

Dromedaries eat more than 2 kilos of DM/100 kg of live weight but cell walls and nitrogen content varies greatly. As a consequence, the pasture cannot always cover the maintenance of energy needs of the animals and is almost always deficient as far as nitrogen is concerned, even though dromedaries show a tendency to select plants rich in nitrogen and poor in crude fibre.

## ■ Nutritional value of feeds

Data were collected on energy digestibility and metabolizable energy; N.E. values were obtained by using theoretical K coefficients (kl = milk production; km = maintenance; kg = growth) suggested by INRA (1988) for ruminants.

The value of ingested plants is linked to their contents in cell wall carbohydrates but digestibility is better than in the case of ruminants. Regular water consumption increases the nutritional value of the diet.

## ■ Functions of the forestomach

The functions of the compartments and the transit with VFA-markers were measured. The forestomach pockets have a high pH thanks to the buffer power of the bicarbonate contained in the saliva but also in the secretions of the glands of the first gastric compartment.

The dromedary can adapt the volume of its forestomach and modify the transit of solid particles, according to its diet.

It is difficult to interpret the higher VFA content because of the changes in the volumes of the compartments and in the absorption speeds but

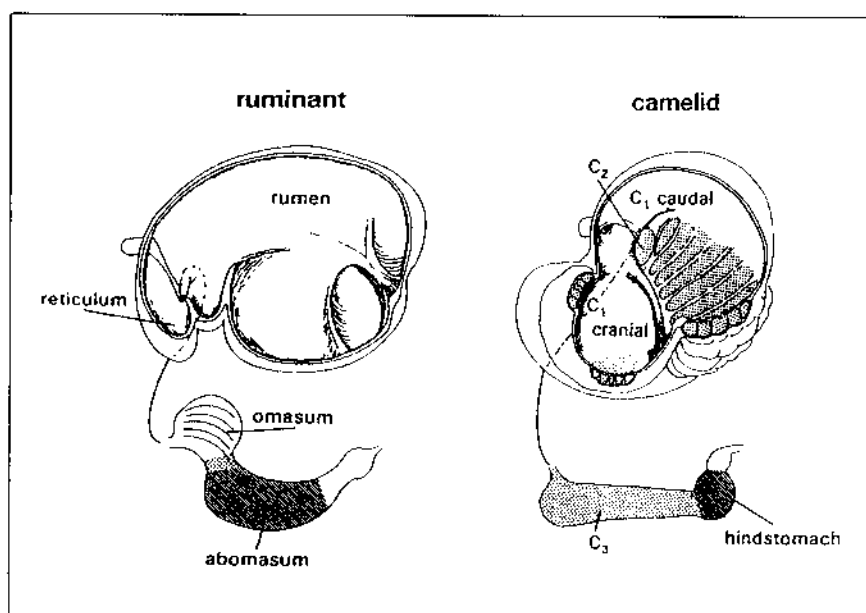


Figure 1 - Distinct differences of forestomach anatomy between camelids and ruminants demonstrate the independent developments of forestomach functions in the evolutionary process.

camelids use fodder with high crude fibre content better than ruminants.

### ■ Nutritional needs

The study of the nutritional needs of dromedaries is long and delicate. Efforts have been made, using females in gestation, in lactation and not in calf. A global method is used, the effects of a base diet with additions being observed.

In order to meet the needs some complement, in nitrogen in particular, must be added to grazing especially during lactation. The effects of control diets on blood composition have also been studied.

### ■ Values of dromedary products

In their native environment dromedaries participate in feeding underfed people. The chemical composition of their milk and meat is determined by classical methods to measure carbohydrates, lipids and proteins. Their milk can be transformed into cheese and even butter. The characteristics and nutritional qualities of the main muscles of the dromedary's carcass have been described.

## Conclusion

All the results which have already been obtained make up a starting point to improve the way dromedaries are fed. The different studies which have been conducted enable us to understand better the very particular biological mechanisms thanks to which camelids can survive in extreme conditions. Comparative studies between species open the way to adapting other species to difficult living conditions. The north-south collaboration constitutes a network of nine teams which represent about twenty research workers who can now continue the work which has been started in good conditions.

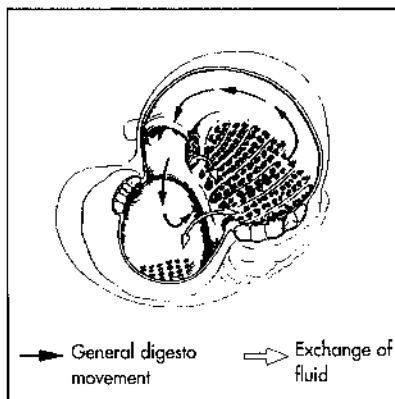


Figure 2 - Movements of digesta within the forestomach of camels.

## Publications

Abbas A.M., 1992. Utilization of plants selected by camels in Butana area of the Sudan. M.V.S.Sc. University of Khartoum.

Engelhardt W.v., Rutagwenda T., Lechner-Doll M., Shulika W., and Kaske M., 1989. Comparative aspects of ruminants and camels grazing on a thornbush savannah pasture. In: Feeding strategies for improving productivity of ruminant livestock in developing countries. IAEA, Vienna, 63-69.

Engelhardt W.v., Abbas A.M., Mousa H.M. and Lechner-Doll M., 1992. Comparative digestive physiology of the forestomach in camelids. Proc. 1st int. Camel Conf., Dubai, 263-270.

Höller H., Breves G., Lechner-Doll M. and Shulze E., 1989. Concentrations of volatile fatty acids and acetate production rates in the forestomach of grazing camels, Comp. Biochem. Physiol., 93B, 413-416.

Höller H., Breves G. and Lechner-Doll M., 1989. Mineral profiles and mineral turnover in the forestomachs of camels in Kenya grazing under various seasonal conditions, Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 42, 81-87.

Kaske M., Osman T., Lechner-Doll M., Larson M. and Engelhardt W.v., 1989. Circadian changes of forestomach motility and of rumination in camels, Asian Austral. J. Anim. Sci., 2, 301-302.

Lechner-Doll M. and Engelhardt W.v., 1989. Particle size and passage from the forestomach in camels compared to cattle and sheep fed a similar diet. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 61, 120-128.

Lechner-Doll M., Rutagwenda T., Schwartz H.J., Schultka W. and Engelhardt W.v., 1990. Seasonal changes of ingesta mean retention time and forestomach volume in indigenous grazing camels, cattle, sheep and goats on a

thornbush savannah pasture, J. agric. sci. (Camb.), 115, 409-420.

Lechner-Doll M., Becker J. and Engelhardt W.v., 1991. Short-chain fatty-acids in the forestomach of indigenous camels, cattle, sheep and goats in the caecum of donkeys grazing in a thornbush savannah pasture. International Symposium on Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health, IAEA, Vienna, 253-258.

Lechner-Doll M. and Engelhardt W.v., 1991. Complementary feeding behaviour of different ruminants, of camels and of donkeys- opportunities to improve the utilization of semi-arid pastures, In: Galletti, G.C. Production and utilization of lignocelluloses, Elsevier Applied Science, London a. New York, 327-337.

Lechner-Doll M., Kaske M. and Engelhardt W.v., 1991. Factors affecting the mean retention time of particulates in the forestomach of ruminants and camelids. In: Tsuda T., Saaski Y., Kawashima R., Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants, Academic Press, San Diego California, 455-482.

Lechner-Doll M. and Engelhardt W.v., 1993. Comparative aspects of digesta passage in equines. Pferdeheilkunde, Proc. 1st Europ. Conf. Nutr. Horses, 36-38.

Lechner-Doll M., Schwartz H.-J. and Engelhardt W.v., 1993. Application of the "Nylon bag" technique for the estimation of caecal digestion. Pferdeheilkunde, Proc. 1st Europ. Conf. Nutr. Horses, 162-164.

Lechner-Doll M., Abbas A.M., Mousa H.M., Luciano L., Reale E. and Engelhardt W.v., 1993. Particularities in forestomach anatomy, physiology and biochemistry of camelids compared to ruminants, Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 46, in press.

Rutagwenda T., Lechner-Doll M., Kaske M., Engelhardt W.v., Schultka W. and Schwartz H.J., 1989. Adaptation strategies of camels on a thornbush savannah pasture: comparison with other domestic animals, Options Méditerranéennes, Série Séminaires, 2, 69-73.

Rutagwenda T., Lechner-Doll M., Schwartz H.J., Schultka W. and Engelhardt W.v., 1990. Dietary preference and degradability of forage on a semi-arid thornbush savannah by indigenous ruminants, camels and donkeys, Anim. Feed. Sci. Technol., 31, 179-192.

Rutagwenda T., Lechner-Doll M., Drochner W., Lindhauer M.G., Beringer H. and Engelhardt W.v., 1990. The soluble fraction of a number of Kenyan range plants grazed by indigenous ruminants, camels and donkeys, J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 64, 94-102.

Willmen T., Sieme H., Merkt H., Lechner-Doll M., Hoppen H.-O. and Saad F., 1992. Manipulation of reproductive functions in the male camel - variations of hormone concentration and semen quality after hormonal intervention, Proc. 1st Int. Camel Conf., Dubai, 409.

Numéro de contrat :  
Contract number :

**TS2-A-250**

▼ TITRE :

***Utilisation des pailles dans l'alimentation des ruminants dans la zone méditerranéenne. \****

*Title :*

*Straw utilization for ruminant feeding in the Mediterranean area.*

▼ CHEF DE PROJET :  
*Project leader :*

A. Chermiti

▼ INSTITUTION-HOTE :  
*Host institution :*

Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, CIHEAM.

▼ ADRESSE :  
*Address :*

Rue Newton 11,  
75116 Paris, France.

▼ TELEPHONE :

+33-1-47 23 45 43

▼ FAX :

+33-1-47 20 10 47

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
*Associated Institutions :*

- Algérie : Département des Productions Animales, INA El Harrach.
- Espagne : Servicio de Investigacion Agraria, DGA Zaragoza.
- France : INRA, Laboratoire des Aliments, Theix et Laboratoire associé à la chaire de Zootechnie, ENSAM.
- Italie : Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze Zootechniche.
- Italie : Università di Firenze, Dipartimento di Scienze Zootechniche.
- Maroc : Département des Sciences Animales, Institut Agro-Vétérinaire Hassan II, Rabat.
- Portugal : Estação Zootechnica Nacional, Santarem.

▼ MOTS CLES :  
*Key words :*

paille; traitement; valeur nutritive; supplémentation; alimentation des ruminants.  
*straw; treatment; nutritive value; supplementation; ruminant feeding.*

▼ RAPPORT FINAL :  
*Final report :*

57p. Français.

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-285, p. 733

# Utilisation des pailles dans l'alimentation des ruminants dans la zone méditerranéenne

## Objectifs

La production céréalière laisse un résidu, la paille, qui n'est pas toujours bien valorisée pour l'alimentation animale.

Cela est d'autant plus important que dans les pays en développement les terres cultivables doivent être de plus en plus réservées à l'alimentation d'une population humaine en forte croissance. Toutefois les pailles constituent un aliment de faible valeur pour les animaux, c'est pourquoi ce contrat se propose d'améliorer l'utilisation des pailles par des traitements chimiques et par une complémentation appropriée. Après avoir précisé la variabilité des pailles cultivées dans les zones méditerranéennes, nous avons cherché à optimiser l'efficacité des traitements et de la complémentation de la paille, et précisé sa valeur nutritive et une introduction dans les rations du bétail.

## Matériel et méthodes

Les méthodes d'analyses courantes de la composition chimique des pailles sont effectuées à l'aide des méthodes de l'AOAC (1975-1980) et de Goering et Van Soest (1970). Pour éviter les pertes sur les pailles traitées, la matière sèche est déterminée entre 40 et 70 °C. L'ammoniac est dosé par la méthode de Conway et la teneur en urée résiduelle par la méthode de Boeringer et Mannheim ou celle de l'AOAC (1984).

La digestibilité *in vivo* est évaluée sur 4 à 6 moutons avec une récolte individuelle totale des fèces pendant 6 à 10 jours consécutifs, après 2 à 3

semaines d'accoutumance. Ces mesures sont complétées par les techniques *in vitro* de Tilley et Terry (1963) ou de Rexen (1979) ou la digestibilité *in sacco* avec application du modèle mathématique d'Orskov et MacDonald (1979).

Outre des mesures de l'ingestion, les performances des animaux ont porté sur les variations mensuelles des poids des adultes (ovins, caprins, bovins), les poids à la naissance et les croissances 10-30 jours des produits (agneaux, chevreaux).

## Résultats

### ■ Etude de la variabilité des pailles de céréales

#### ■ Caractéristiques chimiques

Les études réalisées à l'INRAT (Tunisie) et l'IAV Hassan II (Maroc) évaluent l'effet de l'espèce, de la variété et de la région. Les principaux résultats obtenus se résument comme suit :

- les différences entre les espèces peuvent être importantes alors que la composition chimique de différentes variétés appartenant à la même espèce ne varie pas beaucoup;
- la composition chimique des pailles de blé tendre et dur est pratiquement identique;
- l'effet de la région est le plus souvent très significatif et serait probablement lié aux types de sols, aux variations des températures et de pluviométrie;
- les pailles d'orge présentent des teneurs en paroi relativement moins importantes que les pailles de blé. Cependant, certaines variétés se

caractérisent parfois par des teneurs en paroi plus élevée;

- la teneur en paroi des pailles varie de 65 à 85 % de la MS, l'idée selon laquelle les faibles teneurs en paroi sont liées aux rendements en grains n'est pas confirmée.

### ■ Dégradabilité des pailles

L'effet significatif de l'espèce et de la région est confirmée par l'étude de la dégradabilité, qui montre que les pailles de triticale sont les plus dégradées, suivies des pailles de blé et d'orge. Quant à l'effet des conditions climatiques, il apparaît que les pailles provenant des régions moins pluvieuses présentent une dégradabilité ruminale plus élevée.

La fraction immédiatement soluble varie de 0 à 21,6 % et celle potentiellement digestible de 44,5 à 86,1 %. La vitesse de cette dernière varie de 1,6 % à 0,56 %/h. La dégradabilité des pailles de blé était le plus souvent supérieure à celle de l'orge, contrairement à ce qui est généralement rapporté par la littérature. En outre, les différences entre les variétés sont parfois plus importantes que celles observées entre les espèces.

Les effets du traitement sur la dégradabilité ruminale des pailles sont très variables.

Par ailleurs, il a été aussi constaté que la fraction immédiatement soluble «a» diminue après le traitement à l'ammoniac ou à l'urée et que la fraction potentiellement digestible a considérablement augmenté. Les différentes réponses aux traitements étaient en partie liées à la forme physique des échantillons étudiés (degré de mouture).



Figure 1 - Meule de paille non traitée contenant plus de 5000 balles.  
Ce mode de conservation est pratiqué dans les pays de l'Afrique du Nord  
(Algérie, Maroc, Tunisie).

En effet, le broyage fin augmente la fraction immédiatement soluble «a» et réduit généralement la fraction dégradable «b», en comparaison aux pailles hachées.

Il est possible à partir de la teneur en NDF de prévoir la digestibilité des pailles. Les coefficients de corrélation entre la solubilité enzymatique ou la digestibilité *in sacco* et la teneur en NDF varient de 0,60 à 0,65.

#### ■ Optimisation du traitement des pailles

Les études sont réalisées à l'échelle du laboratoire utilisant des petites quantités de pailles, et au niveau de stations sur de grandes meules. Les paramètres étudiés concernent les conditions d'uréolyse, les effets combinés de la dose d'urée, d'urée, d'humidité et de température, l'évaluation de l'efficacité du traitement et les modalités pratiques d'incorporation de la solution d'urée à grande échelle.



Figure 2 - Meule de paille traitée à l'ammoniac anhydre  
conservée sous plastique.

Les principales conclusions de ces travaux sont les suivantes :

- l'addition d'une source uréolytique exogène n'est nécessaire que si l'humidité du milieu est inférieure à 25-30 %. La présence d'urée a un effet favorable sur la fixation de l'azote et améliore l'efficacité du traitement (dégradation de la paroi);
- les effets de la température sur l'efficacité du traitement sont aussi importants. Dans les conditions sud-méditerranéennes, les températures élevées favorisent l'uréolyse et dans ces conditions l'addition d'une source d'urée n'est pas nécessaire, alors que sous des conditions de température moyennes, une durée de traitement plus longue (8 semaines) serait une garantie d'amélioration de l'efficacité;
- dans les conditions sud-méditerranéennes, les pailles produites sont trop sèches (plus de 90 % de MS) et les résultats montrent qu'un faible apport d'eau, par arrosage lors de la construction de la meule en couches successives, avant l'injection de l'ammoniac, améliore l'efficacité du traitement (fixation de l'azote et digestibilité de la matière organique). Dans ces régions, l'apport d'eau dans le cas du traitement à l'urée, doit être le minimum possible en assurant une meilleure amélioration. Des quantités de 25 à 30 % de poids de la paille donnent des résultats satisfaisants;
- quelques modalités pratiques relatives à l'incorporation de la solution d'urée ont été testées dans le but de simplifier davantage les conditions de traitement : l'urée peut être incorporée à la paille au moment de la mise en balles, l'arrosage de la paille conditionnée en balles de 12 à 15 kg peut s'effectuer une couche sur deux lors de la construction de la meule.

#### ■ Valeur nutritive des pailles

La valeur nutritive des pailles traitées ou non est mesurée directement *in vivo* sur animaux ou en utilisant les techniques *in vitro* décrites précédemment.



Figure 3 - Etude de la dégradabilité des fourrages selon la technique des sachets de nylon incubés dans le rumen.

En prenant en considération les variations entre laboratoires et celles liées aux types d'animaux utilisés ainsi qu'aux complémentations éventuelles, il est possible d'avancer les conclusions suivantes :

- le traitement à l'urée augmente la digestibilité de la matière organique de la paille au même niveau que le traitement à l'ammoniac;
- la valeur nutritive de la paille traitée, exprimée en termes de digestibilité, peut être maintenue durant une période assez longue (environ 8 mois), mais après 12 mois de conservation une tendance à la baisse est observée;
- les améliorations apportées par le traitement peuvent ne pas être importantes et sont parfois équivalentes à celles apportées par la complémentation de la paille non traitée. Si cet aspect mérite davantage de précisions, il est important aussi de signaler que la digestibilité *in vivo* de la paille non traitée a été calculée par différence à partir de la digestibilité de la ration totale (paille + concentré), et ceci peut entraîner des sous ou surestimations de la digestibilité de la paille seule. De tels aspects restent matière à discussion et des questions d'ordre méthodologique sont à approfondir;
- les faibles améliorations parfois apportées par le traitement seraient

principalement liées aux conditions de réussite du traitement. L'humidité, les conditions d'uréolyse et la qualité initiale de la paille sont les principaux facteurs à prendre en considération. D'une manière générale, l'amélioration de la valeur nutritive est d'autant plus importante que la digestibilité de la paille est plus faible.

### ■ Complémentation des pailles

Compte tenu de leur teneur élevée en paille et leur carence en azote, la complémentation des pailles non traitées, tant en énergie qu'en azote ainsi qu'en minéraux et en vitamines, est indispensable. Les études réalisées concernent les effets de la complémentation et du traitement de la paille sur la digestibilité, sur l'ingestion et sur les performances. Les résultats montrent que dans des conditions d'une complémentation inférieure à 30 % de la ration, la digestibilité *in vivo* de la matière organique de la paille non traitée varie de 34,8 à 55,1 % alors que celle de la paille traitée varie de 47,2 à 64,6 %. Dans les mêmes conditions, l'ingestion de la paille traitée est plus importante. Ceci pourrait se traduire par une diminution des quantités de concentrés avec les pailles traitées.

### ■ Utilisation de la paille par les ruminants

Les études réalisées uniquement dans les conditions de l'Afrique du Nord (INRATESA Mateur, INA El Harrach, IAV Rabat) concernent les pailles traitées ou non en comparaison, pour certaines, au foin de vesce-avoine. Les essais portent sur l'alimentation des ovins en croissance (INRAT) et des reproducteurs (INRAT, IAV Hassan II), des taurillons à l'engraissement (ESA Mateur) et des génisses d'élevage (INRAT) ainsi que sur celle de la chèvre locale (INRAT).

Les principales conclusions sont les suivantes :

- les essais, particulièrement de longue durée (1 à 4 ans), confirment l'absence de toxicité des pailles traitées, et que leur utilisation comme seul fourrage grossier n'a pas d'effet sur les paramètres de reproduction;
- l'utilisation des pailles traitées a plus d'intérêt lorsqu'elles sont distribuées à volonté avec le minimum possible d'aliments concentrés. Le choix de la complémentation détermine l'efficacité d'utilisation de la paille traitée;
- les performances obtenues avec des animaux en croissance (agneaux, taurillons, génisses d'élevage) alimentés avec de la paille traitée sont identiques à celles obtenues avec du foin de vesce-avoine. Ces résultats montrent clairement que la paille traitée peut se substituer au foin traditionnellement produit dans les trois pays du Maghreb.

En comparaison au système traditionnel de conduite des ovins et des caprins, les performances des agneaux ou des chevreaux obtenues avec la paille traitée à l'ammoniac ou à l'urée restent inférieures à celles enregistrées sur parcours en année pluvieuse, alors qu'en année sèche l'utilisation des pailles traitées permet des résultats meilleurs.

## Conclusion

Malgré l'importance des résultats obtenus, il nous semble important d'en signaler les limites.

Les comparaisons inter-laboratoires sont parfois difficiles compte tenu des nombreux facteurs de variations qui interviennent. Les plus importants sont les conditions expérimentales et les objectifs de chaque travail. La méthodologie utilisée peut être comparable, avec une adaptation au sein de chaque laboratoire en fonction des conditions expérimentales.

Néanmoins, les conclusions qui peuvent se dégager de ce travail se résument comme suit :

- les caractéristiques chimiques des pailles de céréales varient en fonction de l'espèce, de la variété, des conditions climatiques régionales, mais c'est la dégradabilité ruminale qui est la plus variable;
- les améliorations apportées par le traitement à l'ammoniac ou à l'urée sont assez importantes dans des conditions de réussite du traitement : augmentation de la teneur en azote (80 à 120 g de MAT/kg de MS), de la digestibilité et de l'ingestion volontaire. Toutefois, les variations importantes sont observées et liées principalement à l'humidité et à la température, en plus des conditions expérimentales;
- l'utilisation de l'azote apporté par le traitement peut être importante (35 à 45 %) comparée à celle de la paille non traitée;
- l'addition à la paille traitée de complément à «paroi digestible» augmente l'activité cellulolytique alors que la complémentation avec un concentré riche en amidon limite cette activité si le taux d'incorporation dépasse 20 % de la ration.



Figure 4 - Brebis et agneaux de la race "Barbarine" alimentés avec de la paille traitée à l'ammoniac comme seul fourrage grossier (Station Expérimentale de Bourbiaa, INRAT, Tunisie).

L'apport d'une source azotée est indispensable avec les pailles non traitées. Elle peut être de nature non protéique (urée) ou sous forme de tourteaux (soja). D'une manière générale, il est possible de dire que lorsque le niveau de la complémentation ne dépasse pas 30 à 35 % de la ration et dans des conditions de distribution de la paille à volonté, le traitement est plus efficace que la complémentation de la même paille non traitée;

- l'utilisation de la paille non traitée pendant de longues durées peut être développée dans les pays de la rive sud de la Méditerranée. Toutefois, l'ensemble de ces résultats demandent à être confirmés et il faut surtout faire un effort pour harmoniser les méthodes entre laboratoires.

## Publications

Chermi A., Nefzaoui A., Teller E. et Vanbelle M. 1991. Optimisation du traitement des pailles de céréales à l'ammoniac et à l'urée. 1-Evalua-

tion de l'efficacité du traitement à partir des pertes de produits volatils. *Revue de l'Agriculture (Landbouwtijdschrift)*, vol. 44, num. 5: 973-982.

Chermi A., Nefzaoui A., Teller E. et Vanbelle M. 1991. Optimisation du traitement des pailles de céréales à l'ammoniac et à l'urée. 1-Effets du hachage et de l'humidification préalables au traitement sur la valeur nutritive. *Revue de l'Agriculture (Landbouwtijdschrift)*, vol. 44, num. 6: 1189-1198.

Kraïem K., Abdouli H. et Goodrich R.D. 1991. Comparison of the effects of urea and ammonia treatments of wheat straw on intake, digestibility and performance of sheep. *Live-stock production Science*, 29: 311-321.

Kraïem K., Abdouli H. et Moujahed N. 1991. Pailles traitées à l'ammoniac et à l'urée. Effets des traitements à l'ammoniac et à l'urée, de la complémentation et de la durée de stockage sur la valeur alimentaire des pailles. *Revue de l'INAT*, vol. 6, num. 1.

Abdouli H. et Kraïem K. 1992. Traitement des pailles à l'urée. Tentative de traitement sans apports d'eau et ou sans couverture de la meule. *Revue de l'INAT*, vol. 6, num. 2: 71-86.

Chermi A., Nefzaoui A., Teller E. et Vanbelle M. 1991. Variations de l'ingestion volontaire des lignocelluloses chez les ruminants (cas des pailles de céréales). *Options Méditerranéennes, Série Séminaires*, num. 16: 61-65.

Contract number : **TS2-A-263**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE :	<b><i>Minilivestock as food and feed in semi-urban farming systems.</i></b>
Titre :	<i>Le mini-élevage comme aliment pour humains et animaux dans les systèmes de culture semi-urbains.</i>
▼ PROJECT LEADER : Chef de projet :	Professor Dr. Ir. J. Hardouin
▼ HOST INSTITUTION : Institution-hôte :	Tropical Animal Production Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen.
▼ ADDRESS : Adresse :	Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen, Belgium.
▼ TELEPHONE :	+32-3-247 66 66
▼ FAX :	+32-3-216 14 31 - Tx : 31648 Tropic (B)
▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS : Institutions associées :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- F.R. Germany : Univ. of Göttingen, Inst. für Tierzucht u. Haustiergenetik.</li> <li>- Italy : Univ. degli Studi, Fac. di Agr., Staz. Sper. di Zoot., Milano.</li> <li>- Benin : Ministère du Développement Rural, Dir. Rech. Agro., Cotonou.</li> <li>- Cameroon : Min. Rech. Scient., Inst. de Rech. Zoot., Yaoundé.</li> <li>- Côte d'Ivoire : Min. de la Prod. Anim., Lab. Centr. de Nutr. Anim., Abidjan.</li> <li>- The Philippines : Don Mariano Marcos Memorial State University, Department of Animal Science, Bacnotan - La Union.</li> <li>- Togo : Université du Bénin, Ecole Supérieure d'Agronomie, Lomé.</li> <li>- Zaïre : Université de Kinshasa, Fac. des Sc., Département de Biologie.</li> </ul>
▼ KEY WORDS :  Mots clés :	<p>minilivestock; farming systems; small producers; semi-urban areas;                      food; feeds; revenues; giant african snails; earthworms; guinea pigs;                      giant rats; poultry.</p> <p><i>mini-élevage; système d'exploitation agricole; petit producteur; espace                      semi-urbain; alimentation; aliment pour animaux; revenus; escargot                      géant africain; ver de terre; cobaye; rat géant; volaille.</i></p>
▼ FINAL REPORT : Rapport final :	41p. English (+ appendices).



# Minilivestock as food and feed in semi-urban farming systems

## Objective

---

Field professional experience gained by the coordinator during the past ten years or so convinced him of the need to develop animal production techniques to breed animals belonging to the minilivestock category, i.e. little known but in high demand by local human populations. The present supply of this bush-meat is totally based on collection in the wild, leading already in many places to reduction and even destruction of local stocks.

The animals under consideration are: giant African snails, earthworms/manure-worms, cane cutters and giant rats. The Guinea pigs have been added though not indigenous to Africa but bred and eaten there.

The final goal was the set-up of systems for sustainable production based on local resources, available to landless and/or poor people for increased quantities of food, feed or revenues. Therefore, applied research was required, based on existing or still-to-assess biological parameters; transfer of research results to villages was also foreseen.

The animal species selected were well known by the human populations. Descriptions of better though simple practices were expected for increased productions. No attempts were planned to encourage people to eat specific meat when they were not used to it. Attention was drawn, however, to supplementary uses like feeding roaming pigs and poultry with locally produced animal protein sources such as giant snails or earthworms. A supplementary potential output for minilivestock appeared during the project life in terms of breeding for

revenue, with insect and butterfly farming.

The EEC added two extra-activities with some supplementary funds: a socio-economic survey on village poultry production and a seminar.

The EEC also accepted extension of project duration till end 1993, instead of end 1992 as initially planned. No supplementary funds were allocated.

## Material and methods

---

### ■ Material

None of the scientific topics required heavy material or expensive equipment. On the contrary, classical tools were used in the laboratories. Field or station experiments were based on usual equipment or light infrastructure, so as to facilitate the transfer of technology later.

An existing cellar was transformed in Belgium to simulate tropical (temperature, humidity, light) conditions for the investigations on giant African snails. A laboratory was furnished with some equipment provided by the German partner to study the snails under simulated tropical conditions.

Cages were bought by the Italian partner to undertake the experiments on Guinea pigs.

Pens, boxes, small poultry-houses and some fodder fields were established in participants countries.

Foundation animals required for the research were either bought or selected from stocks already present at the respective premises of the partners.

### ■ Methods

The project has been organised on a model of pairs of partners whenever possible. In any case, each partner was made fully responsible for his own work and his own accountancy, with semestrial research and financial reports. It was known by all partners that the coordinator was at their disposal for any advice or action, if required. Partners of a same pair were recommended to keep in close and direct contact, the coordinator being kept informed of the main facts.

A general meeting of all the project participants took place on the occasion of the Seminar organised on Invertebrates (minilivestock) Farming in The Philippines in November 1992.

Details for each scientific topic may be found in the relevant semestrial progress and/or final reports of the specific partners in the Final Scientific Report prepared by the coordination.

## Results

---

### ■ Generalities

The project gave the opportunity of concerted research involving institutions from nine countries which had no previous contacts. Five subjects (giant African snails, Guinea pigs, earthworms, cane cutters and giant rats) were selected within the framework of minilivestock and the first three were shared between partners from the North and the South. Best results were obtained when several research institutions were involved in the same topic. A survey on the socio-economic situation of village poultry production in semi-urban areas was organized in Togo and in the Philippines. Full details and data are available in the other reports.

Some scientists from developing countries were invited to the Seminar organized by the project on "Invertebrates (minilivestock) farming". The same seminar recommended "that the term minilivestock be adopted in place of microlivestock".

■ **Giant African snails: *Achatina* spp. and *Archachatina* spp.**

Based on the joint results produced by Belgium, Germany, Benin and Côte d'Ivoire on the giant African snails, it is now possible to recommend breeding and raising techniques applicable under village conditions for self-consumption or for sale. In the meantime, new scientific knowledge has been gained on growth potentialities, eggs and egg laying characteristics, incubation and hatchability, feeding preferences, chemical composition of the snail and its dressing rate, ...

A very important possibility has been evidenced by considering snail rearing as an agricultural activity and introducing on the same field a rotation snail/vegetable. This proved to be highly positive on poor ferrallitic soils, due to an increase in organic matter and a supply of minerals, which at the same time entailed a reduction in the need for chemical fertilizers. The trial has been carried on after the termination of the project to gain results covering more years and to calculate the net economic balance.

■ **Guinea pigs: *Cavia porcellus***

The two countries involved (Italy and Cameroon) had no previous experience in research on Guinea pigs, but produced many results on the influence of in-breeding usually occurring in field conditions. Many tests and analyses were conducted on fodder resources, digestibility, intake, ...

The excellent collaboration between the two institutions enabled them to confirm the considerable interest of Guinea pig raising for meat production in Africa. Technical recommendations made by scientists have to be followed for successful operation: simple

breeding management, light infrastructure, adequate forage and required surface, ...

■ **Earthworms: *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia fetida*, ...**

Breeding earthworms/manure worms as protein source for monogastrics or fish is now feasible in field conditions and with good performances. No anti-growth factor has been evidenced in the local African worm, unlike the ubiquitous red worm in Europe. Simple infrastructures and techniques have been tested and are recommended for routine production. Belgium, Benin and The Philippines were involved.

■ **Cane-cutters: *Thryonomys swinderianus***

The project did not reach its objective and the partner (Benin) decided to terminate the research ahead of time.

■ **Giant rats: *Cricetomys gambianus***

In Zaïre, basic knowledge has been gained on the reproduction of this rodent, and the life span in captivity is now fixed at 9 years. Screenings have shown the presence of several intestinal parasites, some of them presenting a potential risk for consumers. A known «two segment cestode» has been found for the first time in the giant rat. An identification technique has been successfully tested.

■ **Poultry**

The surveys indicated that the demand for eggs and meat exists and that vaccination campaigns could be very effective with a highly interesting cost/benefit ratio.

## Conclusions

■ **Giant African snails: *Achatina* spp. & *Archachatina* spp.**

Thanks to the many results obtained, it is now possible to embark in snail production on a safe basis. High

hatching rates are very important so that the eggs can be collected daily, as each week's delay reduces the rate by approximately 30 %. Any manipulation of snails is dangerous as the risk of shell fracture arises, and the repair process takes place at the expense of shell growth. Overcrowding in pens can also be detrimental.

Although *A. fulica* can reach approximately 100g liveweight before 4 months of age, it is not advisable to recommend its breeding in West Africa, as it is associated with potential risk for human population, and is a very dangerous agricultural pest in many countries and continents.

■ **Guinea pigs: *Cavia porcellus***

The relevant productivity of the guinea sow (yearly live weight production equal to about 8-10 times the weight of the sow), the precocity of her offspring (from birth to weaning the weight of the piglet increases 2.5 times), the high edible carcass yield (68-76 % at 15 weeks of age) and the possibility for this herbivore to utilise organic matter and fibre of the fodder significantly better than the rabbit, confirm that the guinea pig is a very typical minilivestock species, rather rustic, suited to convert fodder into animal protein in countries where its meat is highly appreciated.

On the ground of the results obtained it could be suggested to:

- adopt a reproduction management technique based on keeping in separate pens the breeding sows with their litters and their weaned growing offspring. Litters should be weaned when 2 weeks old. In that occasion an adult male, unrelated to the sows should be introduced in the pen of the breeding sows thus enabling the traditionally practised inbreeding;
- test in field conditions the experimental results which show that approximately 152 m<sup>2</sup> of *Tripsacum laxum*, *P. maximum* or *P. purpureum* with cuttings at 8 weeks, are required to meet the needs of 20 ani-

mals, doubling the surface to allow rotation.

However, no progress will be made if traditional Guinea pig breeding is not recognized as a possible component of rural development and consequently supported by national authorities.

#### ■ Earthworms: *Eudrilus eugeniae*

According to the observations made, *Eudrilus eugeniae* seems the most adapted species to be used as a novel protein source.

The research results on the biology and behaviour of the earthworm made it possible to design a worm production unit. This intensive production system (high worm biomass yield/surface unit) gave good production results in field conditions.

Fresh earthworms have been successfully used in several feed trials. It has been shown that *Eudrilus eugeniae* does not contain an anti-growth factor and that fresh worms can very efficiently compensate for the absence of fishmeal and/or soya cake in feed for chicken, ducklings and fish.

#### ■ Giant rats: *Cricetomys gambianus*

Notwithstanding the long lasting troubles in Zaïre, scientific knowledge on *Cricetomys* has increased. It can be expected that it will be possible in some years to produce this type of bush-meat from controlled production systems.

#### ■ Village poultry production

Improvement is possible at low cost, with vaccination campaigns against Newcastle disease as the top priority.

No unsolvable marketing problems have been identified as potential restraints.

#### ■ Other species

Other invertebrates were mentioned to the project participants as being also of interest as food, feed or revenues,

for instance, termites and maggots, and also butterflies.

Requests and suggestions came also for complementary vertebrates with similar use but about which basic knowledge for any controlled production is still lacking: *Atherurus spp.*, *Tenrec spp.*, frogs,...

#### ■ BEDIM Bulletin

A very positive though unexpected output of the project is the regular issue of the new periodical BEDIM Bulletin, produced by the coordinator of the project with the support of the F.A.O. and the C.T.A. Requests are increasing in number, confirming the need for information in the field. Unfortunately, no longterm financial support exists.

#### ■ Video-Reportage

The EEC-DGVIII «Development» has shown interest in the production of video-tape, made by professionals with the assistance of some scientists. The aim of the document is to provide authorities (governments, universities, financing and executing agencies, ...) with evidence that minilivestock is a fact, a component like others in rural development, a matter of still unexpressed though latent demand from the local people, and a way to initiate sustainable production with endemic species, at the same time reducing the hunting and gathering pressure on the wild. Official policies and academic courses will have to be modified and young generations should be trained accordingly, hence the need to convince or support professors, teachers, extensionists,...

### Publications

#### ■ Minilivestock in general

Cicogna M., 1993. First international seminar on farming of invertebrates and other minilivestock. *Tropicicultura*, 1992, 10,4, 155-159.

Hardouin J., 1992. Place du mini-élevage dans le développement rural tropical (Minilivestock in tropical rural development). *Cahiers Agri-cultures*, 1, 196-199.

Hardouin J., 1994. Mini-livestock: from gathering to controlled production. Special issue on minilivestock (Introductory paper requested). *Biodiversity* (in press).

Hardouin J. and Stiévenart C. Semestrial Bulletin of Information on Minilivestock produced by BEDIM (Bureau for Exchange and Distribution of Information on Minilivestock), since 1992.

#### ■ Giant African snails

Assogba F. and Ehouinsou M., 1993. Assolement maraîchage/héliciculture au Sud Bénin. *Tropicicultura*, 11, 3, 91-94.

Hardouin J., Codjia J.T.C. and Heymans J.C., 1993. Guide pratique d'élevage d'escargots géants africains (French + Fon), 30 drawings, F.A.O./Bénin + F.S.A./U.N.B., 72pp.

Stiévenart C., 1992a. Marking individual snails, in particular giant African snails. *Snail Farming Research*, Cuneo, Italy, 4, 40-42.

Stiévenart C., 1993a. Synthèse d'observations sur le marquage coquillier chez les escargots géants africains. *Livestock Research for Rural Development*, 5, 1, 27-31.

Stiévenart C., 1993b. Observations sur la bordure coquillière et la reproduction chez les escargots géants africains *Archachatina marginata natalensis* (Philippi). *Livestock Research for Rural Development*, 5, 1, 1-6.

#### ■ Guinea pigs: *Cavia porcellus*

Castrovilli C., Rigoni M. and Cicogna M., 1993. Prestazioni riproduttive e rilievi ponderali in una colonia sperimentale di cavia (*Cavia porcellus*, L.). *Proc. X Congr. Naz. A.S.P.A.*, Bologna, 709-714.

Cicogna M., Castrovilli C., Rigoni M. and Crepaldi P. Effect on guinea pig raising performances of different mating rhythms and breeding systems (in preparation).

Fransolet M.C., Horlait Ph. and Hardouin J., 1994. Elevage expérimental du cobaye *Cavia porcellus* en région équatoriale au Gabon. *Rev. El. Méd. Vét. Trop.*, 1994, tome XLVII, 1 (in press).

Fotso J.M., Ngou Ngoupayou J.D. and Kouonmenioc J. Caractéristiques et performances des cobayes sous conditions d'élevage améliorées au Cameroun (soumis; *Cahiers Agricultures*).

Ngou Ngoupayou J.D., Fotso J.M. and Kouonmenioc J. Le cobaye *Cavia porcellus* L. comme animal de boucherie au Cameroun. *Tropicicultura* (accepted).

Rigoni M., Castrovilli C. and Cicogna M., 1993. Confronto fra cavia e conigli nell'utilizzazione digestiva dei principi alimentari e dell'energia. *Proc. X Congr. Naz. A.S.P.A.*, Bologna, 27-30.

#### ■ Earthworms

Vorsters A., 1993a. Biology and production of manure worms. *Proceedings of the Seminar «Invertebrates (minilivestock) farming», EEC-*

DGXIII/CTA/IFS/DMMMSU/ITM, Philippines. 53-56.

Vorstors B., 1993b. Use of manure worms as feed. Proceedings of the Seminar «Invertebrates (minilivestock) farming», EEC-DGXII/CTA/IFS/DMMMSU/ITM, Philippines, 164-168.

Vorstors A., 1993c. Breeding substrate for manure worms (E+F). BEDIM Bulletin, 2, 1, 13-14.

Vorstors A., Adjovi A. and Demey F., 1992. Production of earthworms as a source of protein for chicken feed. The use of *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida* in tropical conditions. Newsletter African Network for Rural Poultry Development, March, vol. 2, n° 1.

Vorstors A., Aminou T. and Demey F., 1994. Récolte des termites pour l'aviculture à Songhai (Bénin). Cahiers Agricultures (accepted).

Vorstors A. and Demey F., 1994. Utilization of crude earthworms in feeding of local chickens. Anim. Feed Sci. and Technol. (submitted).

Vorstors A., Demey F. and Hardouin J., 1994a. Influence of worm density on the growth of *Eudrilus eugeniae*. Livest. Res. Rural Devel., Cali (accepted).

#### ■ Giant rat: *Cricetomys gambianus*

Malekani M., 1990. Studies on hepatic capillariasis and on the genus *Meggitina* (Cestoda) of *Cricetomys* spp. - some of the edible rodents of Zaïre. M. Sc. thesis, ITM, Antwerp, Belgium.

#### ■ Other species:

Barcello M.P. and Bareel J.R., 1991. The potential of snail (*Pila leopoldvillensis*) meal as protein supplement in broiler diets. Tropicultura, 1991, 9, 1, 11-13.

Clark P., 1993. Organization and economics of insect farming. Proceedings of the Seminar «Invertebrates (minilivestock) farming», EEC-DGXII/CTA/IFS/DMMMSU/ITM, Philippines, 20-32.

Farina L., Demey F. and Hardouin J., 1991. Production de termites pour l'aviculture villageoise au Togo (Termite production for traditional poultry breeding in Togo). Tropicultura, 9, 4, 181-187.

Hardouin J., 1991. Un élevage de grenouilles taureaux aux Philippines (Breeding of bullfrogs *Rana catesbeiana* in the Philippines). Tropicultura, 9, 1, 34-36.

Hardouin J., 1992. The Tenrecs, small insectivora of the Mascareignes (E+F). BEDIM Bulletin, 1, 2, 19-20.

Mercer C., 1993. Butterfly ranching (E+F). BEDIM Bulletin, 2, 1, 15-16.

Mercer C., 1993. Insects as food in Papua New Guinea. Proceedings of the Seminar «Invertebrates (minilivestock) farming», EEC-DGXII/CTA/IFS/DMMMSU/ITM, Philippines, 157-162.

Verbanis M., Cordiez Y., Hardouin J. and Gasagno A., 1993. Observations préliminaires pour un élevage de grenouilles au Burundi (Preliminary observations on frog use in Burundi). Tropicultura, 11, 1, 25-28.

Vorstors A., 1994. Alimentation de canetons avec des vers de terre au Bénin (in preparation).

#### ■ Reports: see Final Report for full details

Poultry survey in Togo

Poultry survey in the Philippines

Semestrial progress reports of each participating institution

Final scientific reports

AMELIORATION  
DES PRODUCTIONS AGRICOLES  
IMPROVEMENT OF AGRICULTURAL  
PRODUCTS

PRODUCTION  
ANIMALE

---

ANIMAL  
PRODUCTION

Pêche  
Fisheries

Contract number : TS2-A-099  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Prawn farming in developing countries : development of an appropriate technology for Macrobrachium rosenbergii (de Man) production and post-harvest handling. \****

Titre : *Culture de crevettes dans les pays en développement : mise au point d'une technique adaptée à la production de Macrobrachium rosenbergii (de Man) et au traitement après récolte.*

▼ PROJECT LEADER : Professor Ang Kok-Jee  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : University Pertanian Malaysia,  
 Institution-hôte : Faculty of Fisheries and Marine Science.

▼ ADDRESS : 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan,  
 Adresse : Malaysia.

▼ TELEPHONE : +60-3-948 61 01

▼ FAX : +60-3-948 25 07

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS : - U.K. : University of Stirling, Institute of Agriculture,  
 Institutions associées : Stirling FK9 4LA, Scotland.

▼ KEY WORDS : macrobrachium rosenbergii; freshwater prawn production; fresh water culture; water quality; nutrition; post-harvest handling.  
 Mots clés : *macrobrachium rosenbergii; production de crevettes d'eau douce; aquaculture d'eau douce; qualité de l'eau; nutrition; traitement après récolte.*

▼ FINAL REPORT : 125p. English (+ second volume of appendices).  
 Rapport final :

# Prawn farming in developing countries: development of an appropriate technology for *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) production and post-harvest handling

The aim and objective of the research as outlined in annex 1 of the contract document have been satisfactorily accomplished. The highlights given below arose from research done during this period.

## Objectives

The primary objective of this research was to support the development of freshwater prawn culture in S.E.Asia. In order to achieve this objective the following studies were conducted : utilisation of local feed ingredients for feed formulation, stock manipulation and water quality criteria for optimisation of production at nursery and grow-out phases. Post-harvest handling and disease aspects were also investigated.

## Material and methods

All experiments on the nutritional requirements, culture systems, post-harvest handling, and diseases were carried out at the facilities of University Pertanian Malaysia (UPM) and a private rural prawn farm.

## Results

### ■ Nutrition

The study on the nutrition of the broodstock of *M. rosenbergii* indicated that the protein requirement for the broodstock is 30% protein.

Studies at UPM on the larval rearing of *M. rosenbergii* have indicated the

viability of complete replacement of *Artemia* with *Moina* as live feed from stage VI-VII without any reduction in post-larval yield. Thus this opens new avenues for the culture of this species in Third World countries where the cost of live feed such as *Artemia* is high and occasionally is unavailable.

### ■ Water quality

The sensitivity of ammonia, nitrite and alkalinity to post-larvae 10 to 20 (in days) were studied using static bioassay method. The 96h LC50 for the above-mentioned parameters are 47-68 mg/l ammonia-N, and 43-75 mg NO<sub>2</sub>-N/l for ammonia and nitrite respectively while the static bioassay 96h LC50 alkalinity tests showed that there was no mortality of PL, but the prawns underwent more frequent moultings when the alkalinity was greater than 80 mg/l CaCO<sub>3</sub>.

The recommended safety levels of cadmium, copper and zinc for *M. rosenbergii* hatchery water were 0.1 mg Cd/l, 0.057mg Cu/l and 2.97 mg Zn/l respectively.

This study has indicated that phenol concentration should not exceed 0.23 ppm in the aquatic system to ensure the survival and growth of *M. rosenbergii* postlarvae.

A new bioassay technique for *M. rosenbergii* eggs incubation using a flow-through system has been developed resulting in 95 to 100% hatching.

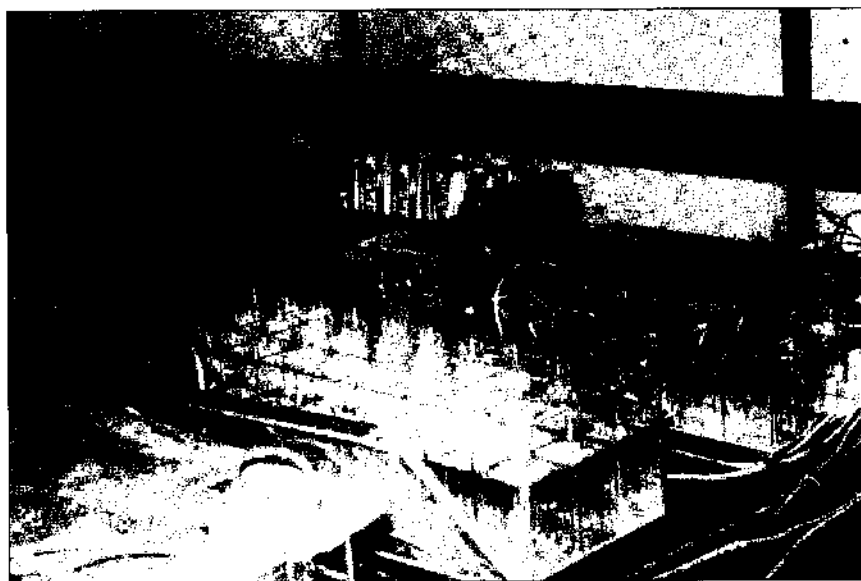


Figure 1 - Flow-through system.

## ■ Culture system

The study on the nursery management of *M. rosenbergii* has conclusively shown that post-larvae can be cultured in cages with artificial habitats and placed at the pond bottom with stocking rate of 600/m<sup>2</sup> for a period of one month before they are transferred to grow-out ponds.

The preliminary study on the cage culture of *M. rosenbergii* indicates that the best growth and survival was registered at 10/m<sup>2</sup> stocking density. However this stocking rate is rather low for cage culture systems as compared to pond systems.

Pond culture trials in UPM ponds show that a stocking rate of between 20 to 40 PL/m<sup>2</sup> with a production of 0.2376 to 0.3056 kg/m in 160 to 180 days are recommended. At a stocking rate above this number, the final size of the prawn is too small for market.

## ■ Live transportation of *M. rosenbergii*

The preliminary study on the live transportation of *M. rosenbergii* indicate that this prawn can be successfully transported for a period not exceeding 12 hours in woodshaving. However, for long distance transportation the use of water is still the best.

## ■ Diseases of *Macrobrachium*

Two studies on the diseases of the larvae of *M. rosenbergii* were on bacterial necrosis and heterotrophic aerobic bacterial flora in the hatchery water. Seven bacteria species were isolated from the culture water of the normal prawn larvae consisting of four dominant species: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes faecalis*, *Plesiomonas shigelloides* and *Vibrio* spp.

Eight species were isolated from normal prawn larvae. The dominant species were *A. hydrophila*, *A. faecalis*, *P. shigelloides*, *Vibrio* spp. and *V. alginolyticus*. Seven species were isolated from culture water that contained infected prawn. Dominant spe-

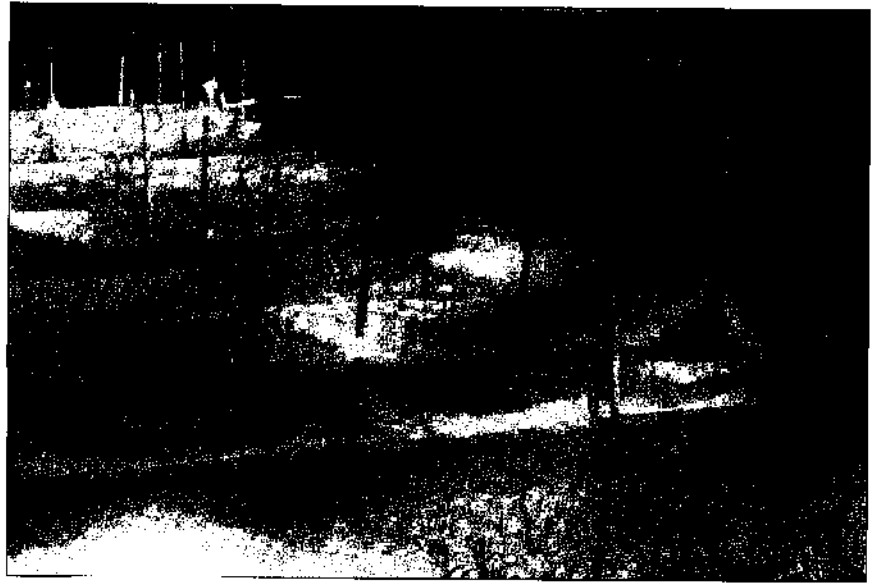


Figure 2 - Culture system.

cies were *A. hydrophila*, *A. faecalis*, *Vibrio* spp. and *V. alginolyticus*.

## Conclusion and additional comments

Research has been very productive resulting in many publications and technical reports presented at scientific conferences/seminars. Our collaborative research with the Institute of Aquaculture, Stirling, Scotland proved to be very beneficial and effective to both UPM and Stirling.

Exchange of ideas, acquisition of literature and discussion were done through visits and correspondence. Our Granting Agency, the CEC has been very supportive a fact which, to a large extent, has contributed to the success of this project. The project has also benefited UPM in its manpower training at the technical and farmer levels. Several of the temporary staff supported by this project have joined the private sector and a few have gone into *Macrobrachium* farming on their own. Through this project UPM has



Figure 3 - HRH Emperor Akihito of Japan discussed the composition of the larval feed during his visit to UPM Hatchery on 2nd October 1991.



transferred technology to Third World countries. One of the graduate students who did research on the *Macrobrachium* is now back in Bangladesh to introduce *Macrobrachium* farming in that country.

## Publications and oral presentations

Alam M.J., Cheah S.H. and Ang K.J., 1991. Possible use of *Moina* spp. as a live feed substitute in larval rearing of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture and Fisheries Management*, 22, 551-535.

Alam M.J., Ang K.J., Cheah S.H., Ambak M.A. and Saad C.R. In press. Effects of *Moina micrura* (Kurz) from two different culture sources as a replacement of *Artemia* spp. in production of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) post larvae. *Aquaculture and Fish Management*.

Alam M.J., Ang K.J. and Cheah S.H. In press. Use of *Moina micrura* (Kurz) as an *Artemia* substitute in the production of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) post-larvae. *Aquaculture*.

Alam M.J., Ang K.J. and Cheah S.H. In press. Weaning of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) larvae from *Artemia* to *Moina micrura* (Kurz). *Aquaculture*.

Alam M.J., Ang K.J., Cheah S.H., Ambak M.A. and Saad C.R., 1992. Phased replacement of *Artemia* with *Moina micrura* (Kurz) in rearing *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) larvae. Paper presented at the Third Asian Fisheries Forum, 27-30 October 1992, Singapore.

Ang K.J., 1989. Intensive culture of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Paper presented at the Seminar on New Technologies in Aquaculture organized by the Malaysian Fisheries Society and the Ministry of Science, Technology and Environment on 17th August 1989, Kuala Lumpur. 21p.

Ang K.J., Cheah S.H. and Raffiq K.A., 1990. Some aspects of the morphology and histology of the ovaries of the Malaysian freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. p.607-611. In : The Second Asian Fisheries Forum

(eds.) Hirano, R. and Hanuy, I., 991 p. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.

Ang K.J., Cheah S.H. and Law A.T., 1989. Recent development in the culture of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in Malaysia. In : Modernization in Tropical Livestock and Poultry Production. (eds.) Engku Azahan Ahmad, Wong Hee Kum, Yeong Shue Woh and Mohd. Azis Dollah. 12th MSAP Annual Conference 1989 p.234-239.

Ang K.J., Cheah S.H., and Yamasaki S., 1990. Large-scale production of *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae in a new bio-stream culture tank system. In : Advances in Fisheries and Marine Sciences p.32-41. (eds.) Mohd. Ibrahim Hj. Mohames, Pathimah Ismail, Law A.T. and Cheah S.H. p.265.

Ang K.J. and Lam S.Y., 1992. High density culture of *Macrobrachium rosenbergii* in earthen ponds p.189-190. In Proc. of the National IRPA Seminar (Agriculture Sector). Vol. II-Livestock, Fisheries, Food and Post-harvest, Forestry, General (Eds. Ho Y.W., Vidyadaran M.K., Norhani Abdullah, Jainudeen M.R., Abd. Rani Bahaman). Ministry of Science, Technology and Environment Malaysia p.680.

Ang K.J. and Law Y.K., 1992. Culture of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) at the nursery phase p.532-533. In : Proc. National IRPA Seminar (Agriculture Sector). Vol. II (eds. Ho Y.W., Vidyadaran M.K., Norhani Abdullah, Hainudeen M.R., Abd. Rani Bahaman). Ministry of Science, Technology and Environment Malaysia p.680.

Ang K.J. and Law Y.K., 1992. *Macrobrachium rosenbergii* nursery production in cages with different stocking densities. Paper presented at the First World Fisheries Congress, p.10, 3-8 May 1992, Athens, Greece.

Ang K.J., Lee Y.M. and Law A.T., 1992. Protein requirements for broodstock *M. rosenbergii*. Paper presented at the Third Asian Fisheries Forum, 26-30 October 1992.

Ang K.J., Komilus C.S. and Cheah S.H., 1992. Culture of *Macrobrachium rosenbergii* in net-cages. Paper presented at the Third Asian Fisheries Forum, 26-30 October 1992, Singapore.

Law A.T., Ang K.J. and Kamaruddin M.S., 1989. Digestibility of low cost feed ingredients in pelleted feeds by *Macrobrachium*

*rosenbergii* In : The Second Asian Fisheries Forum (eds.) Hirano, R. and Hanyu, I. Asian Fisheries Society, p.333-336. Manila Philippines.

Law A.T., Cheah S.H. and Ang K.J., 1989. Prawn farming in Malaysia (in Chinese with English summary). In : Agriculture Reference Book 1988/89 produced by the Selangor Chinese Chamber of Commerce p.55-56.

Law A.T., Poh Y.T. and Ang K.J., 1992. Least-cost feed formulation for *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) by using linear programming technique. Paper to be presented at the Third Asian Fisheries Forum, 27-30 October 1992, Singapore.

M. Sc., Ph. D. and Honour Theses.

Abu Bakar Mat Tai., 1990. Studies of some aspects of Giant Prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in the nursery phase. M.Sc., Thesis, UPM p.156.

Alam M.J., 1992. *Moina micrura* (Kurz) as a live food substitute for *Artemia salina* (L.) in larval rearing of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Ph. D. Thesis, UPM p.215.

Chan Khai Yew., 1991. Toxicity of heavy metals to *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) eggs. Final Year Student Research Project UPM.

Komilus C.S., 1994. Cage culture of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Final Year Student Research Project UPM.

Khairuddin I. Water quality requirements for *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) culture. M. Sc. Thesis UPM.

Lee Yat Meng, 1992. Studies on broodstock nutrition of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Final Year Student Research Project UPM.

Ng Keat Chew, 1992. Acute toxicity of six selected insecticides on post-larvae of Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Final Year Student Research Project UPM.

Yap Kuang, 1992. The incorporation of Scott's emulsion cod liver oil into egg-custard in the larval rearing of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Final Year Student Research Project UPM.

Yeo Moi Eim, 1991. Phenol toxicity on udang galah, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) post-larvae. Final Year Student Research Project.

Contract number : **TS2-A-120**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Vaccination of grass carp and black carp against the virus of haemorrhagic disease in the P.R. China. \****

Titre : *Vaccination de la carpe de roseau et de la carpe noire contre le virus de la maladie hémorragique en République Populaire de Chine.*

▼ PROJECT LEADER : Prof. Dr. W. Ahne  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Tierärztliche Fakultät der Universität München,  
 Institution-hôte : Institut für Zoologie und Hydrobiologie.

▼ ADDRESS : Kaulbachstrasse 37,  
 Adresse : 80539 München, Deutschland.

▼ TELEPHONE : +49-89-2180 2785

▼ FAX : +49-89-2805 175

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :  
 - China : Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan.  
 - China : Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan.  
 - Denmark : National Veterinary Laboratory, Høngvej 2, 8200 Århus.

▼ KEY WORDS : fish disease; grass carp haemorrhagic disease; fish viruses; grass carp reovirus; attenuation of grass carp reovirus; vaccination of grass carp.  
 Mots clés : *maladie des poissons; maladie hémorragique de la carpe de roseau; virus des poissons; réovirus de la carpe de roseau; atténuation du réovirus de la carpe de roseau; vaccination de la carpe de roseau.*

▼ FINAL REPORT : 63p. English.  
 Rapport final :

\* see also STD1 Publication, 1989; TSD-290 project, p. 528

# Vaccination of grass carp and black carp against the virus of haemorrhagic disease in the P.R. China

## *Objectif of the research*

Grass carp and black carp are among the most important freshwater fish in the P.R. China. About 700 000 tons are produced yearly as food fish serving as essential protein source for the Chinese inland population. Since 1970, a severe haemorrhagic disease causing mass mortality of grass carp and black carp fry has been observed in fish farms all over the P.R. China. During the previous cooperative research (EC-contract TSD-A-290, 1985-1987) between the Institute of Hydrobiology, Wuhan, P.R. China, and the Institute of Zoology and Hydrobiology of the University of Munich, Germany, a reovirus was identified as the causing agent of the haemorrhagic disease of the cyprinid fish in China.

Vaccination has always played an important role in the control of infectious diseases. Vaccines are used extensively in human and veterinary medicine and even immunization of fish has recently become an effective tool for the control of infectious fish diseases.

In order to control the haemorrhagic disease of grass carp and black carp, preparations of killed virus were previously used on an experimental basis (EC-contract TSD-A-290). The vaccine administered by injection gave a solid protection of the fish against the virus. Since these vaccines have been shown to be effective by injection only, efforts were required to develop an attenuated vaccine useful for vaccination of fish by bath method.

During the contract TS2-A120 we concentrated our work mainly on the

establishment of virological and immunological techniques in China, on the immunology of grass carp, on the attenuation of the virus of haemorrhagic disease of grass carp and finally, on the vaccination of grass carp using different techniques. After development of an attenuated vaccine its efficiency, safety and stability have been studied.

In addition to the laboratory work efforts have been made to transfer virological and immunological know-how to the Chinese partner during lectures, lab-teaching and demonstration of new techniques.

## *Results*

Grass carp reovirus (GV) was isolated from several fish on 14 fish farms in 9 different provinces of the P.R. China. The viruses isolated from grass carp with haemorrhagic disease were uniform with regards to viral RNA-band patterns (SDS-PAGE), the lack of CPE induction in cell cultures, the antigens detectable by ELISA, the size and the morphology. Only the lab strain GCVH 873, which was isolated from grass carp by the Institute of Virology, Wuhan, showed differences in its RNA-band pattern and in the capacity of CPE induction in cell cultures.

Attempts of attenuation of GV during 53 *in vivo* passages in grass carp, black carp, silver carp and big head were not successful. In contrast, GV was successfully attenuated after 48 passages in grass carp kidney cell cultures (CIK-cells) and the attenuated virus (GV-CIKp48) proved to be stable, safe and immunogenic in grass carp and in rare minnow. The vaccine administered by injection induced high protec-

tion rates in grass carp when challenged with virulent GV. Since the vaccine administered by immersion method was less efficient, the use of GV-CIKp48 under field conditions will not be economical in China.

Studies on the immunogenicity of GCHV 873 polypeptides indicated that the VP6 outer capsid protein could be a promising candidate for the establishment of a grass carp reovirus subunit vaccine by biotechnology.

During the project enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) and immunofluorescence (IFT) have been established at the Institute of Hydrobiology, Wuhan. The production of high quality antisera to several antigens has opened up the study of immune response in fish and the diagnosis of fish diseases in China using up-to-date techniques. Knowledge of such techniques has been transferred to China during the cooperation.

## *Conclusions*

- Results of the project demonstrate the widespread occurrence of grass reovirus (GV) in grass carp producing facilities in the P.R. China. 14 grass carp farms of 9 Chinese provinces were found to be positive for the virus. This is in agreement with the observation on the occurrence of clinical signs of the haemorrhagic disease in different parts of China (Jiang and Ahne, 1989).
- 14 grass carp reoviruses were isolated from sick grass carp at the Institute of Hydrobiology, Wuhan, P.R. China, during the period of the project. The viruses were uniform with regard to RNA-band patterns, the lack of CPE induction in cell

cultures, the antigens detectable by ELISA, the morphology and pathogenicity.

- An isolate of grass carp reovirus (GCVH 873) obtained at the Institute of Virology, Wuhan, P.R. China, was found to be different from GV with regard to RNA patterns, CPE induction, antigens detectable by FITC and ELISA and by its pathogenicity to grass carp.
- A reovirus (89/24 isolated from common carp in China proved to be not related to the grass carp reoviruses in terms of nucleic acid patterns and antigenicity.
- Attempts to attenuate grass carp reovirus GV 14 by 53 *in vivo* passages in homologous (grass carp, black carp) and in heterologous hosts (silver carp and big head carp) proved to be not successful.
- Grass carp reovirus (GV 14) was successfully attenuated by 48 CIK cell cultures passages (GV-CIKp48).
- The attenuation of the virus (GV-CIKp48) was shown to be stable since its virulence was not regained during 20 back passages in grass carp fingerlings.
- Challenge models for haemorrhagic disease under aquarium conditions were developed for grass carp and rare minnow by injection and immersion method.
- Safety testing showed that the attenuated vaccine could be safely used by injection and immersion method both in grass carp and rare minnow.
- Potency testing showed that the vaccine was very efficient when administered by injection but it was much less successful when administered by immersion.
- The fact that the vaccine was not sufficient after immersion vaccination means that the use of the vaccine probably will not be considered as economical in China. The price of one dose of the vaccine for injection will exceed the value of the vaccinated fish. If the attenuated virus had been able to penetrate into and multiply in grass carp after vaccination by bath method, it would have



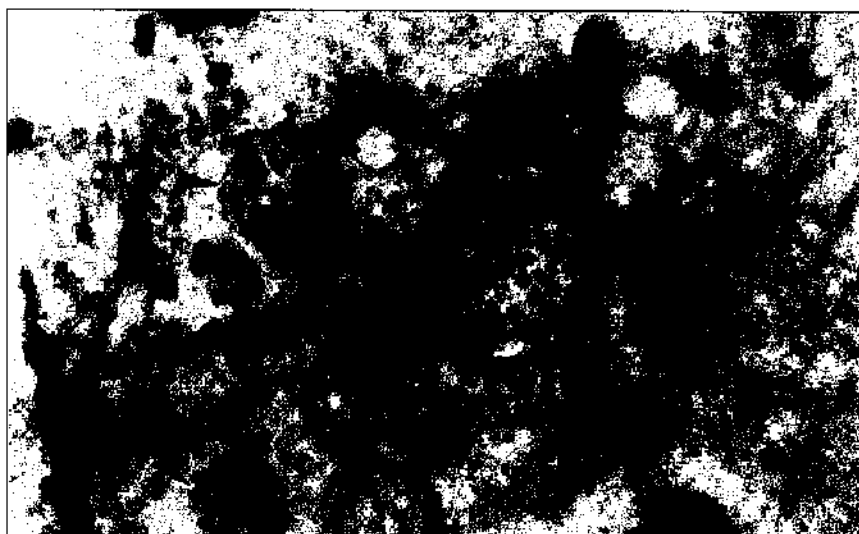
*Figure 1 - Sick grass carp showing haemorrhages in the musculature and in internal organs.*

been possible to perform the vaccination with strongly diluted vaccine and thereby at low vaccine cost. The reason why the attenuated virus did not induce sufficient immunity under immersion conditions is unknown. It is not unlikely that the attenuation may have induced one or more mutations affecting attachment, penetration or multiplication of virus.

- Studies on the immunogenicity of GCHV 873 polypeptides revealed that the VP6 outer capsid protein

could be a promising candidate for the second generation of grass carp reovirus vaccine e.g. subunit vaccine prepared by biotechnology.

- Passive immunization experiments indicated that a humoral immune response was induced in grass carp even if humoral antibodies could not be detected by antibody IFT.
- During the project an ELISA method was developed suitable for diagnosis of haemorrhagic disease of Chinese cyprinid fish. This will significantly improve the possibili-



*Figure 2 - Thin section electron micrograph of kidney tissue of grass carp with haemorrhagic disease exhibiting reovirus-like particles in the cytoplasm of infected cells (x 30.000).*

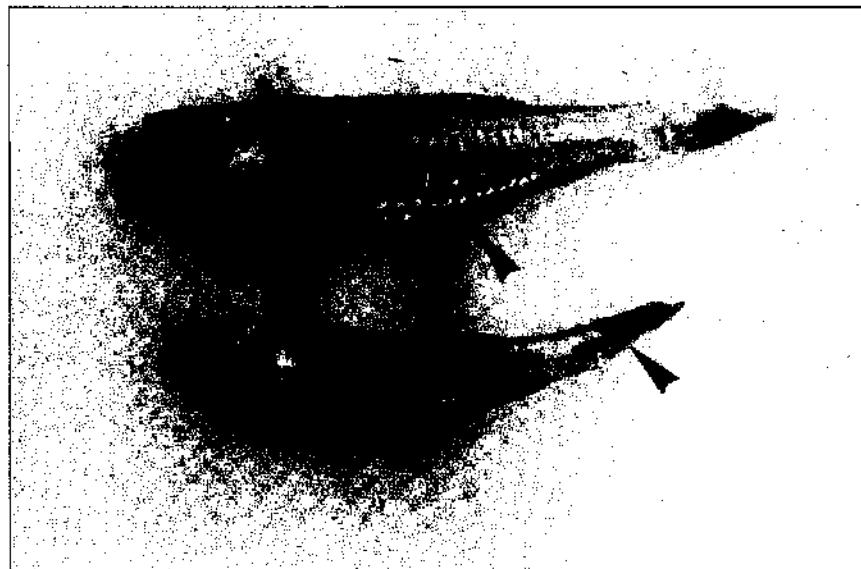


Figure 3 - Rare minnow infected with GV 14 by immersion method exhibiting bleedings in the skin, fin basis and in internal organs 7 days after infection.

ties for future studies on the epidemiology and control of fish disease in the P.R. China. So far the diagnosis has been based previously either on the presence of clinical symptoms, or on the detection of virus particles in the electron microscope, or on the presence of virus RNA in fish tissue or cell cultures by SDS-PAGE. The first method was scientifically unsatisfactory and the latter were unfitted for routine purposes.

- The development of immunofluorescence technique for detection of fish viruses in China opens up possibilities for diagnostic purpose and studies of the intracellular distribution of virus antigen in infected cell cultures.
- The affinity purification of grass carp immunoglobulin has not previously been achieved. The present results have allowed the conclusion that grass carp immunoglobulin is an IgM-like protein consisting of heavy and light chains with molecular weights of 73 and 27 kD, respectively.
- The production of a high quality rabbit antiserum to affinity purified

grass carp immunoglobulin has opened up the study of the humoral immune response of grass carp by up-to-date immunological techniques such as immunofluorescence and Western blotting. Detection of grass carp antibodies to virus antigens (VHSV and IPNV) has been achieved using indirect immunofluorescence techniques. Detection of grass carp antibodies to grass carp reovirus has not yet been successful. The reason for this is probably a low concentration of the antibodies in grass carp serum or a low concentration of virus antigen in the cell cultures used in immunofluorescence for detection of the antibodies.

- The aquarium situation at the Institute of Hydrobiology, Wuhan, was unsatisfactory. It has been improved by the introduction of 10 water recirculation units supplied with biological filters. This equipment, which was purchased with EC grant money, has allowed the keeping of a larger number of fish in the experimental aquaria for longer periods of time under controlled conditions.

- The ultracentrifuge, the equipment for the immunofluorescence microscope, the aquaria facilities as well as the high quality lab were purchased with EC grant money for the Institute of Hydrobiology, Wuhan. They significantly improved the technical level of the virological work of the Institute of Hydrobiology, Wuhan, P.R. China.
- During the cooperation, efforts have been made to transfer knowledge of new virological and immunological techniques to the P.R. China. That was done during lectures, lab-teaching and demonstrations.

## Publications

Jiang Y. and Li Z., 1987. Isolation of IPN virus from imported rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the P.R. China, *J. Appl. Ichthyol.*, 3, 191-192.

Jiang Y. and Ahne W., 1989. Some properties of the etiological agent of haemorrhagic disease of grass carp and black carp. In: *Viruses of Lower Vertebrates*, Ahne W. and Kurstak E. eds., Springer Verlag, Heidelberg, FRG, 227-240.

Jiang Y., Ahne W., Li Y. and Ogawa M., 1991. Isolation of an aquareovirus from common carp (*Cyprinus carpio*) in the P.R. China. *Proceedings of the Second International Symposium of Lower Vertebrates*, Oregon State University, Corvallis, 287-292.

## Oral communications

Ahne W. and Jiang Y., 1990. Some aspects of viral diseases with respect to Asian aquaculture. *Symposium on Diseases in Asian Aquaculture*, Bali, November 26-29.

Ahne W., 1992. Viruses of bivalve molluscs, crustaceans and fish with special references to Asian aquaculture. *23rd Annual Conference International Association for Aquatic Medicine*, Hong Kong, May 18-22.

Ahne W., 1992. Viruses of fish. *Lecture at the University of Wuhan*, P.R. China.

Jorgensen P.E.V., 1992. Purifying of Ig from fish immunized with different antigens. *23rd Annual Conference International Association for Aquatic Medicine*, Hong Kong, May 18-22.

Jorgensen P.E.V., 1992. Immunology of fish. *Lecture at the University of Wuhan*, P.R. China.

CONSERVATION  
ET MISE EN VALEUR DU MILIEU

CONSERVATION  
AND BETTER USE OF THE ENVIRONMENT

RESSOURCES EN EAU  
ET UTILISATION

*WATER RESOURCES  
AND THEIR USE*

Numéro de contrat : **TS2-A-198**  
Contract number :

- |   |   |
|---|---|
| ▼ TITRE :   | <b><i>Environnement et qualité des eaux du fleuve Sénégal (EQUESEN).</i></b>  |
| Title :   | <i>Environment and water quality of the Senegal river.</i>  |
| ▼ CHEF DE PROJET :<br>Project leader :                  | Dr. Jean Yves Gac   |
| ▼ INSTITUTION-HOTE :<br>Host institution :              | Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, ORSTOM.   |
| ▼ ADRESSE :<br>Address :                                | BP 1386, Dakar, Sénégal.<br>Rue de la Fayette 213, 75480 Paris Cedex 10, France.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +221-32 34 76   |
| ▼ FAX :   | +221-32 43 07   |
| ▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :<br>Associated Institutions : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sénégal : Université Cheikh Anta Diop, Faculté des Lettres et Sciences Humaines, Département de Géographie.</li> <li>- Sénégal : Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, ISRA.</li> <li>- Belgique : Fondation Universitaire Luxembourgeoise, Arlon.</li> </ul> |
| ▼ MOTS CLES :<br>Key words :                            | <p>vallée du fleuve sénégál; barrage; environnement; qualité de l'eau; cycle biogéochimique des éléments; gestion des eaux de surface; modélisation.</p> <p><i>senegal river valley; dams; environment; water quality; biogeo-chemical cycles of elements; surface water management; modelling.</i></p>       |
| ▼ RAPPORT FINAL :<br>Final report :                     | 564p. Français.   |

# Environnement et qualité des eaux du fleuve Sénégal (EQUESEN)

## Objectifs

L'objectif principal du projet EQUESEN sur «l'environnement et la qualité des eaux du fleuve Sénégal» était la mise en place d'un programme intégré de recherches pour l'acquisition (et la modélisation) des connaissances de base sur l'environnement fluvio-lacustre et estuarien du fleuve Sénégal. Par ses termes de référence, ce projet renvoie essentiellement à une étude des cycles biogéochimiques menée à l'occasion d'une période de sécheresse durable et postérieurement à la construction de barrages qui ont profondément modifié le fonctionnement de cet important écosystème tropical d'Afrique occidentale.

Le programme, nécessairement multidisciplinaire, s'est appuyé sur différentes méthodes d'approche :

- actualiser les connaissances sur le cadre physique de l'intégralité du bassin versant;
- identifier et quantifier les apports exogènes (pluies et poussières éoliennes) au bassin versant;
- fixer dans chaque écosystème les évolutions spatio-temporelles de la physicochimie des solutions et quantifier les apports d'alluvions;
- préciser les processus d'altération chimique, de l'érosion mécanique et de l'approfondissement des sols;
- définir les mécanismes régissant les échanges entre les eaux du fleuve et les eaux souterraines;
- déterminer l'impact des aménagements ainsi que des variations du climat sur la qualité des eaux pour une gestion rationnelle des ressources;
- étudier le phénomène de la remontée saline en aval du barrage de Diama et l'évolution synchrone des caractéristiques physicochimiques des eaux dans la retenue amont;

- mettre au point un modèle de gestion quantitatif et qualitatif des eaux du lac de Guiers;
- identifier des stations de référence pour un suivi allégé des transferts de matière (soluble, minérale et organique) et des changements écologiques les plus marquants (risques d'eutrophisation);
- décrire enfin le schéma évolutif du milieu estuarien par l'élaboration d'un modèle de la variabilité spatio-temporelle de la production primaire.

Parmi les résultats les plus significatifs de ce vaste projet, des responsables des différents sous-programmes mettent en relief les acquis suivants :

- une large chronique des connaissances historiques sur le milieu;
- une caractérisation des unités géomorphologiques, du façonnement des paysages et des transformations profondes dans les zones en voie d'aménagement;
- l'hydroclimatologie et la géodynamique actuelle d'un vieux paysage latéritique : le Fouta Djallon;
- une identification des écosystèmes dulçaquicoles et saumâtres et des potentialités agricoles;
- la modélisation séculaire de la remontée saline dans la basse vallée;
- la quantification des flux dissous et particuliers;
- la caractérisation de toutes les composantes hydrologiques du dispositif fluvio-lacustre;
- l'étude spatio-temporelle de la physicochimie du fleuve sur 1800 km;
- la mise en évidence des événements climatiques majeurs et l'estimation de la pluviométrie sur l'intégralité du bassin versant par le traitement de l'imagerie satellitaire;
- l'évolution hydroclimatique du bassin du Sénégal;

- la modélisation du tarissement de l'érosion mécanique;
- la quantification des aérosols désertiques;
- la mise en évidence des échanges réciproques entre les eaux de surface et les eaux souterraines dans la moyenne et la basse vallée et l'impact des ménagements hydroagriques sur la nappe alluviale;
- la mise au point d'un modèle de gestion des eaux du lac de Guiers, et enfin
- la dynamique phytoplanctonique et le schéma évolutif du milieu estuarien par la quantification de la variabilité spatio-temporelle de la production primaire.

Le rapport de synthèse du projet (564 pages), rédigé en français, comporte 12 chapitres répartis en 6 tomes. Une argumentation plus développée est fournie dans les 46 rapports et publications intermédiaires qui ont émaillé la réalisation progressive du programme ainsi que dans les 14 mémoires de thèse et de DEA soutenus par des étudiants africains et européens.

## Plan du rapport

I. Historique, de Ptolémée (200 av.JC) à Manantali (1987).

II. Présentation du bassin versant du fleuve Sénégal.

III. Les apports exogènes au bassin versant du fleuve Sénégal. Trois signaux d'entrée : pluies, poussières et remontée saline.

IV. Les écoulements du fleuve Sénégal. Les conséquences durables de la sécheresse actuelle sur l'appauvrissement des apports des grands fleuves au Sahel.



### V. Flux de matières en suspension et bilan de l'érosion des sols dans le bassin versant amont du fleuve Sénégal.

VI. Flux de matières dissoutes et bilan de l'altération chimique. Géodynamique actuelle des paysages amont. Evolution de la qualité chimique des eaux du fleuve Sénégal dans sa moyenne vallée.

## VII. Relations eaux de surface-eaux souterraines dans la vallée alluviale.

VIII. Hydrologie estuarienne (Diamma). Apports fluviaux de matières en suspension et en solution à l'embouchure du fleuve Sénégal. Façonnement des paysages dans sa basse vallée.

IX. Le phytoplancton dans l'estuaire du fleuve Sénégal.

## X. Hydrodynamique des masses d'eaux dans l'estuaire du fleuve Sénégal.

XI. Le lac de Guiers. Etude quantitative et qualitative du système lacustre et développement d'un modèle de gestion.

## XII. Références bibliographiques du projet EQUESEN.

## Résultats

## ■ Chapitre I

Le chapitre I (25 pages) est consacré à la reconnaissance historique progressive de la vallée du fleuve Sénégal. Cette paléocartographie, qui s'étale sur plus de 2 millénaires, dégage des principaux documents géographiques sélectionnés, des éléments paléogéographiques et paléohydrologiques (position relative des cours d'eau, contours des lacs, des flots, des zones submergées, extension de l'invasion marine des estuaires des basses latitudes tropicales). L'information est aussi recherchée au niveau des écrits anciens (phéniciens, carthaginois), des récits des voyageurs (arabes, portugais et génois du Moyen âge), et des rapports des missions et explorations européennes à partir du XVII<sup>ème</sup> siècle. Un paragraphe plus étoffé retrace les principales modifications hydrographiques, d'origine naturelle ou anthropique, survenues au cours du dernier siècle et plus particulièrement depuis 1916, année des premiers aménagements sur le fleuve Sénégal.

## ■ Chapitre II

Le chapitre II (44 pages) traite du cadre physique du milieu naturel tel que la situation géographique, l'hypsométrie, le contexte structural, le réseau hydrographique. Une attention particulière est accordée aux grands traits du modelé des paysages : la géomorphologie et sa nouvelle lecture après sa définition il y a près de 20 ans. Le contexte géologique est particulièrement actualisé en tenant compte des récents travaux sur le haut bassin du fleuve Sénégal en Guinée et au Mali, bien que certains développements sur la stratigraphie régionale puissent pour l'instant n'avoir que peu d'incidences sur l'évolution du bassin et le système hydrologique du fleuve. Pour ce qui concerne le Quaternaire, les nombreuses péripéties climatiques et glacio-eustatiques sont rappelées : les enseignements les plus significatifs au cours du Pléistocène et de l'Holocène concernent l'environnement sédimentaire du delta et de ses annexes lacustres (Rkiz, Ferlo-Guiers). La cartographie et la nature des sols à petite échelle restituent les résultats des reconnaissances pédologiques entreprises entre 1950 et 1970 : l'émergence de nouvelles approches, et en particulier l'apport de l'outil satellitaire, constitue une des priorités des futurs programmes de pédologie régionale à la périphérie de la vallée du Sénégal.

## ■ Chapitre III

Le chapitre III (64 pages) regroupe les données sur les trois types d'apports exogènes au bassin : les pluies, les poussières et la remontée saline. Après un bref rappel sur le cadre climatique et la mise en évidence d'une recrudescence notable de la sécheresse dans les années 80, sans équivalence connue dans les chroniques hydroclimatiques, la possibilité d'une rupture climatique est envisagée à la suite des déficits exacerbés des écoulements du fleuve Sénégal. La confrontation de plusieurs méthodes pour l'obtention des données pluviométriques est absorbée par l'étude de l'évaluation des volumes précipités (1986-1992) à partir du

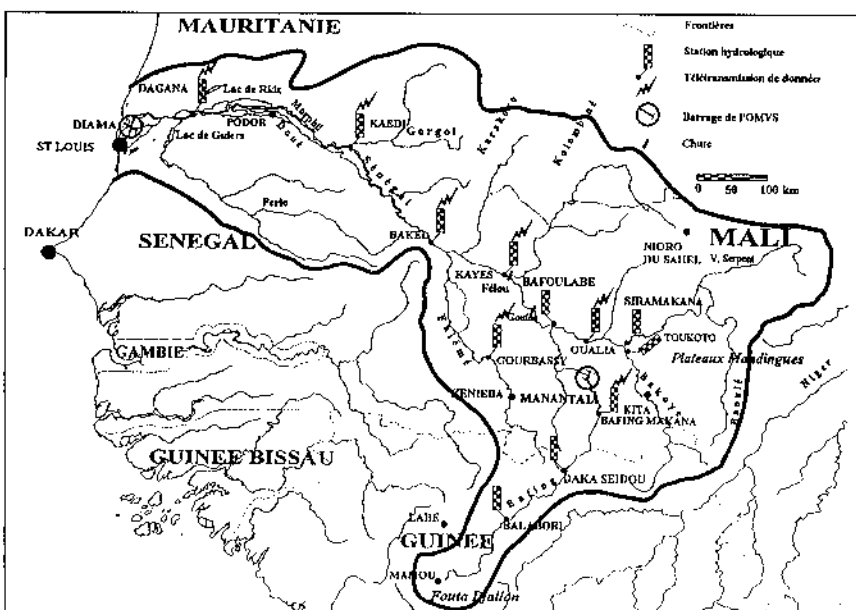


Figure 1 - Réseau hydrographique du Sénégal (Albergel et al., 1993).

programme EPSAT sur l'estimation des pluies par satellite : la méthode d'estimation a été validée sur la sous-région dans le cadre du projet EQUESEN. La reconnaissance sur la composition chimique et isotopique des pluies a conduit à considérer deux sources et deux itinéraires différents pour la vapeur génératrice des précipitations de mousson et des aérosols porteurs de sels marins. L'excès en sels d'origine marine dans les pluies par rapport au réseau hydrographique implique d'une part, qu'au cours de la sécheresse actuelle les nappes phréatiques ne contribuent que très peu à l'écoulement et que, d'autre part, la régulation saline des nappes s'effectue nécessairement par écoulement souterrain. L'étude du phénomène des brumes sèches et des poussières atmosphériques constitue une première dans ce type de projet. Compte tenu du fait que le Sahara est la plus importante source de poussières atmosphériques du globe, les données quantitatives et qualitatives acquises sur les dépôts éoliens constituent un inestimable référentiel pour la compréhension de certains paramètres climatiques et la dynamique, mal connue, de ces apports sédimentaires qui tapissent au même titre que les alluvions du fleuve les dépressions lacustres de la région. Si depuis 1983, la remontée saline dans la basse vallée du Sénégal a été endiguée, les modalités de cette intrusion marine qui jusqu'alors constituait une composante majeure du fonctionnement hydrologique de la région a été traitée. Par la reprise des témoignages anciens et des observations plus récentes, ainsi que par l'étude des causes et des mécanismes des invasions marines, et la reconstitution de l'extension spatio-temporelle de la salinité dans la vallée du fleuve depuis 1903, les facteurs limitants aux programmes de développement hydroagricoles sont explicités.

#### ■ Chapitre IV

Le chapitre IV (44 pages) est consacré aux écoulements du fleuve Sénégal dans le contexte plus général de l'appauvrissement durable des apports

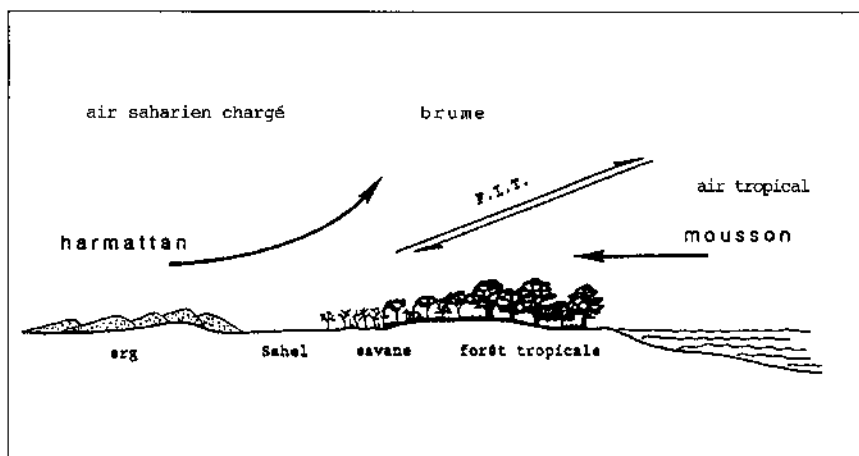


Figure 2 - Schéma de circulation des poussières atmosphériques.

des grands fleuves au Sahel (consécutif à la sécheresse des deux dernières décennies). Les considérations d'ordre historique, la quantification des écoulements depuis le début du siècle, la variabilité de l'abondance fluviale ainsi que la typologie des cycles hydrologiques (1979-1992) et les comparaisons entre les régimes du Sénégal et du Niger permettent d'ouvrir le débat sur la possibilité que les déficits des ressources en eau demeurent une constante de l'hydrologie régionale jusqu'à l'aube du XXI<sup>ème</sup> siècle. En effet, l'hypertarissement récent et l'évolution comparée des précipitations et des écoulements dans l'ensemble de l'Afrique intertropicale montrent qu'outre la sécheresse prolongée, l'épuisement corrélatif des nappes conduit à une minoration durable de la ressource en eau. Un minimum d'une dizaine d'années de bonnes conditions climatiques semble nécessaire pour reconstituer les aquifères.

#### ■ Chapitre V

Le chapitre V (35 pages) concerne les flux de matières en suspension (MES) et le bilan de l'érosion des sols dans le bassin versant amont du fleuve. Après un rappel des données antérieures très épisodiques, l'enregistrement continu des transferts d'alluvions est décrit à travers un nouveau protocole de mesures journalières pendant la crue du fleuve depuis 15 ans. L'évolution de la charge solide du fleuve avant ou après

aménagement présente la même physiologie : une phase d'érosion précoce (1/12 de l'année), une phase d'érosion tardive et de transport (2/12) et une phase d'alluvionnement (9/12). La présence du barrage de Manantali n'introduit aucune modification à ce schéma caractéristique des fleuves tropicaux. La réponse d'un bassin au cours de la phase d'érosion précoce qui concerne les eaux les plus turbides dépend de la crue annuelle mais elle est aussi tributaire de l'empreinte de l'année précédente. L'importance du flux moyen de matières (2,5 millions de tonnes, turbidité moyenne de 220 mg/l) ainsi que leur nature (granulométrie, minéralogie, composition chimique, carbone organique) sont précisés. Enfin sont étudiés les mécanismes qui règlent l'acquisition de la charge solide (autrement dit le déterminisme des processus d'érosion par le ruissellement) ainsi que le bilan de l'érosion actuelle.

#### ■ Chapitre VI

Le chapitre VI (58 pages), pendant du précédent pour les flux de matières dissoutes, traite de l'altération chimique, de la géodynamique des paysages amont et de l'évolution spatio-temporelle de la qualité chimique des eaux du fleuve. Sont ainsi analysés : le bilan chimique quantitatif des apports atmosphériques, la qualité chimique des eaux de surface (profil en long chimique allant des sources aux fleuves en passant par les ruisseaux et les

rivières), la quantification des flux de matières dissoutes (notamment les bicarbonates qui fixent l'importance de la consommation de gaz carbonique atmosphérique due à l'altération chimique), l'importance relative des mécanismes liés à l'érosion mécanique d'une part et à l'altération chimique d'autre part. Cette étude de la qualité des eaux du fleuve Sénégal montre qu'il n'y a aucune évolution vraiment significative entre l'amont et l'aval du bassin ce qui implique que la charge en solution est acquise en amont et que le transit dans toute la vallée se fait sans échanges avec la nappe alluviale. Le décalage dans le temps des concentrations maximales correspond à la simple durée de la propagation de la crue. Les eaux du Sénégal sont extrêmement diluées (60 mg/l) et légèrement basiques (pH moyen de 7,5). Les composantes essentielles sont les bicarbonates et la silice. Ces résultats montrent que la multiplication des programmes de recherche pour le contrôle de la qualité chimique (du moins en ce qui concerne les éléments majeurs) des eaux du Sénégal n'apportera aucune information nouvelle sur une quelconque évolution. Ce langage ne peut être tenu au niveau des éléments à l'état de «traces» qui peuvent être des marqueurs de l'éventuelle dégradation de l'environnement. Le constat est donc le suivant : une remarquable constance dans le temps et dans l'espace de la «qualité» des eaux du Sénégal.

## ■ Chapitre VII

Le chapitre VII (42 pages) concerne les relations entre les eaux de surface et les eaux souterraines dans la vallée alluviale. Après une présentation (délimitations, structures, caractéristiques hydrauliques) des différents aquifères (Maastrichtien, Eocène, Quaternaire) sont retracées les évolutions des niveaux de base, de la qualité chimique des eaux souterraines et de la piézométrie, lesquelles permettent de proposer un modèle de bilan hydrologique. De manière générale, la minéralisation des eaux souterraines de la vallée du Sénégal augmente de l'amont vers l'aval (de 0,1 à 70 mg/l) :

la minéralisation des eaux est plus élevée en rive gauche qu'en rive droite. La salinité élevée des nappes de la basse vallée est d'origine marine. Dans la haute vallée, les eaux souterraines sont bicarbonatées calciques : elles sont bicarbonatées sodiques dans la moyenne vallée et chlorurées sodiques dans l'ensemble de la moyenne vallée. La mise en service des barrages et l'extension consécutive des périmètres irrigués n'ont apporté aucune amélioration dans la qualité chimique des eaux souterraines. Au contraire, dans certains secteurs de la basse vallée, la remontée des nappes phréatiques remobilise les sels, la salinité augmente et le risque d'alcalinisation persiste. Un bon drainage des zones cultivées est nécessaire pour améliorer durablement la qualité des eaux. La chronique des teneurs en tritium a par ailleurs montré que toutes les nappes de la vallée se sont rechargées avant les essais nucléaires (1953) et qu'il s'agit donc d'eaux récentes.

## ■ Chapitre VIII

Le chapitre VIII (80 pages) traite de l'hydrologie estuarienne, des apports de matières en suspension et en solution ainsi que du façonnement des paysages dans la basse vallée et le delta du Sénégal. L'artificialisation du régime du fleuve Sénégal date de novembre 1985 par la mise en fonction du barrage de Diama à 50 km de l'embouchure du fleuve. Son triple rôle consiste à endiguer la remontée des eaux marines, à créer un réservoir d'eau douce en amont et enfin à améliorer les conditions de remplissage des réservoirs potentiels (lacs de Guiers, lac de Rkiz, vallée du Ferlo, cuvette du Ndiaké...). Au cours des cinq années (1986-1990), les déversements à Diama vers l'océan ont représenté 80 % (8 milliards de m<sup>3</sup>) des volumes d'eaux qui ont transité à l'exutoire amont de Bakel. Les flux de matières en suspension étudiés de 1989 à 1993 représentent un tonnage moyen de 1,3 million de tonnes pour une turbidité moyenne de 170 mg/l. Ces valeurs sont à corréler avec les enregistrements à la station amont de Bakel à

l'entrée de la plaine alluviale. Chaque année, près de 900.000 tonnes de matériaux sont retenus dans l'axe fluvial ou détournés vers les dépressions lacustres. Les risques de colmatage des zones de transferts sont certains. La nature des matériaux en suspension ne présente pas de différences significatives avec ceux de l'amont (les minéraux dominants sont le kaolin, les smectites, l'illite et le quartz). Les flux dissous moyens annuels sont estimés à 700.000 tonnes avec une prédominance des bicarbonates, de la silice mais aussi du chlore et du sodium, qui indiquent l'influence des apports océaniques par les précipitations et le jeu des nappes marines fossiles. Enfin, l'évolution morphodynamique du delta s'est trouvée modifiée par les aménagements. Le façonnement des paysages est désormais intimement lié à l'activité éolienne par la promotion du vent au rang d'agent morphodynamique majeur qui a entraîné un dysfonctionnement des principaux axes hydrauliques du delta.

## ■ Chapitres IX et X

Les chapitres IX et X (75 pages) traitent du phytoplancton et de la nouvelle hydrodynamique, induite par les barrages et les endiguements des rives, dans l'estuaire du fleuve Sénégal. Dans l'estuaire, la dynamique phytoplanctonique est fortement affectée par les lâchers d'eau douce récurrents en provenance du barrage anti-sel de Diama, en interaction avec les sollicitations liées à la progression des ondes de marée. La spatialisation des divers peuplements d'algues est ainsi finement déterminée par l'échelonnement dans le temps des divers régimes hydrodynamiques qui animent les masses d'eau. Outre le blocage de la progression saline dans la basse vallée, l'effet du barrage de Diama se manifeste par une superposition au cycle hydrologique saisonnier d'événements aléatoires inféodés aux lâchers d'eau douce qui réinitialisent l'ensemble des processus hydrodynamiques et écologiques qui caractérisent l'estuaire. La partie amont de l'estuaire demeure ainsi durablement marquée

par l'influence continentale. Il s'y développe des assemblages spécifiques caractérisés en particulier par la petite taille des algues. A l'aval, l'influence marine est toujours dominante, notamment au travers des pulsations de l'upwelling côtier dont les effets contribuent à enrichir sensiblement les eaux estuariennes en stimulant plus ou moins directement et rapidement la production phytoplanctonique. La superposition et les interactions à court terme des processus physiques horizontaux (apports continentaux, circulations liées aux marées) et verticaux (diffusion verticale turbulente, stratification), structurants et destructurants, sont décrits. Un modèle numérique bidimensionnel vertical, qui reproduit la circulation de la marée et la dispersion du sel dans l'estuaire, a été développé et validé. La variabilité des processus physiques et l'intervention des courants de densité significatifs liés à la formation de fronts salins et à leur déplacement dans l'estuaire est déterminante, à l'échelle de l'écosystème, dans le contrôle de la formation puis du devenir des assemblages phytoplanctoniques. Enfin, un modèle conceptuel intégrant le fonctionnement hydrodynamique de l'estuaire et les caractéristiques écologiques qui lui sont assujetties est proposé.

## ■ Chapitre XI

Le chapitre XI (59 pages) est consacré au lac de Guiers, défluent du fleuve Sénégal. Depuis les années 1950, le lac sert de réservoir d'eau douce aux installations agricoles. A l'horizon de l'an 2000, le Guiers devrait constituer le point de départ du canal de Cayor, vaste projet d'adduction d'eau vers les régions sud du pays très déficitaires dans leur approvisionnement. Comme une première étude du lac de Guiers avait été commencée dès 1976, ce dernier volet plus appliqué du programme EQUSEN avait pour but, d'une part, d'appréhender les effets de la mise en fonction du barrage de Diama (en 1985) sur l'environnement lacustre (conditions hydrologiques, qualité des eaux et changements écologiques les plus marquants) et, d'au-

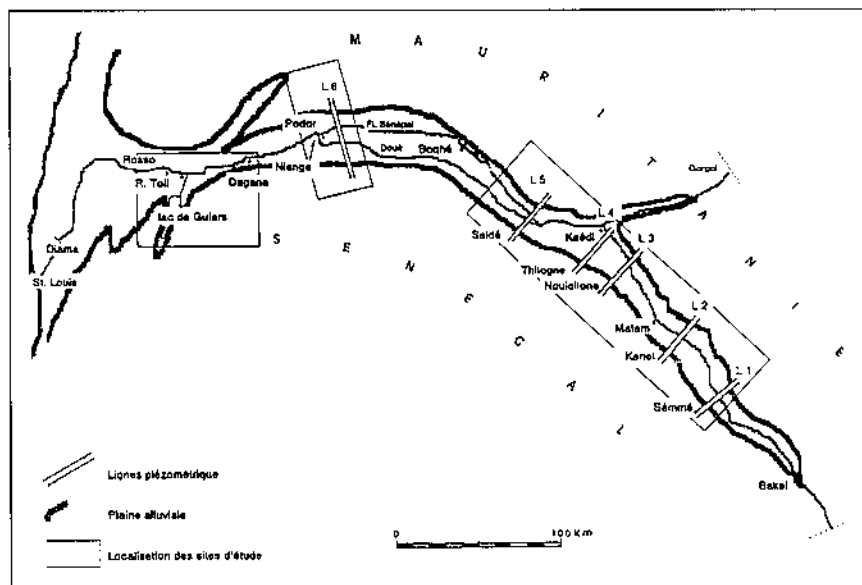


Figure 3 - La vallée alluviale du fleuve Sénégal.

tre part, de proposer des outils de gestion du lac, quantitatifs tout d'abord, et qualitatifs ensuite. L'impact des barrages est clairement mis en évidence (meilleur remplissage, plus grande stabilité du plan d'eau pour les effets positifs; disparition des cultures traditionnelles de décrue, surface réduite des zones d'inondation, prolifération de la végétation aquatique et augmentation très sensible des pertes par évaporation pour les effets négatifs). Les conséquences néfastes de la stabilisation du plan d'eau sont explicitées tant du point de vue hydrologique que biologique. La qualité générale des eaux du lac de Guiers (salinité moyenne de 245 mg/l) est désormais accessible par la définition d'une seule station de référence (abaques et formules permettant de calculer avec une grande fiabilité la teneur moyenne du lac pour les divers éléments chimiques). Depuis 1985, l'adoucissement des eaux pour l'ensemble du lac a été de quelque 20 %. En région sud, il atteint près de 50 %. Les conditions qualitatives se sont améliorées mais elles ont simultanément accentué le développement de la végétation aquatique déjà favorisé par les nouvelles conditions hydrologiques. La prolifération de *Pistia stratiotes* et l'extension des typhaies en sont les exemples les plus visibles aujourd'hui. Signa-

lons aussi l'apparition et le développement très rapide d'espèces végétales nouvelles au lac comme *Potamogeton schweinfurthii* et *Ceratophyllum demersum*. Les apparitions épisodiques de fleurs d'eau (algues cyanophycées) depuis 1991 peuvent faire croire à un début d'eutrophisation des eaux, lié à l'extension des cultures irriguées autour du lac mais présent aussi dans l'ensemble de la vallée du fleuve Sénégal. Les premières investigations menées ont concerné les formes de l'azote et du phosphore dissous. Elles ne révèlent pas de situation préoccupante mais le phénomène et ses origines nécessiteront un suivi régulier. Un premier modèle de gestion globale a été développé. Il intègre les aspects quantitatifs et qualitatifs de cette gestion et permet de simuler les alternatives et leurs effets respectifs. Son utilisation a permis de vérifier les hypothèses avancées quant au rôle des divers paramètres hydrologiques dans l'évolution qualitative des eaux. Ce modèle préfigure l'outil idéal s'il peut être développé pour l'ensemble de la vallée. Terminons en soulignant que les risques d'eutrophisation des eaux lacustres sont réels et iront croissants avec le développement de la culture irriguée dans la vallée où l'eau est désormais pérennisée.

## ■ Chapitre XII

Le chapitre XII (38 pages) rassemble une liste aussi exhaustive que possible des travaux entrepris sur le fleuve Sénégal. Les recherches référencées dans la dernière partie de cette synthèse comportent plus de 700 citations d'auteurs.

Le programme EQUASEN, mené de 1989 à 1993 par quatre partenaires (l'ORSTOM, la FUL, l'ISRA et l'UCAD) s'est achevé en décembre 1993 par un séminaire de restitution des résultats aux scientifiques et aux agents du développement. De par ses acquis, sur un bassin versant de dimension régionale, dans des domaines aussi variés que la climatologie, l'hydrologie, la géomorphologie, la géologie, la géochimie, l'hydrogéologie, l'hydrobiologie, la limnologie, il constitue désormais un inestimable référentiel de connaissances actualisées sur un écosystème aquatique continental anthropisé; il peut nourrir des ambitions encyclopédiques. Il est à souhaiter que cette synthèse, sur un fleuve sahélien fragile, où l'eau est désormais pérennisée, étudié dans une phase critique des contraintes climatiques, contribue à un heureux partage de l'espace en harmonie avec la protection de la nature et le développement économique et social des pays riverains de la vallée du fleuve Sénégal. En se fondant sur tous les résultats d'EQUASEN, les économistes et les sociologues devront maintenant examiner comment les populations s'approprient et gèrent ce nouveau patrimoine.

## Publications et rapports

Gac J.Y., 1989. Environnement et qualité des eaux du Sénégal. Rapport scientifique n°1, multigr., projet EQUASEN de la CEE, TS2/0198F/EDB, DG XII programme STD, Bruxelles, 29pp.

Gac J.Y., Cogels F.X., Appay J.L., Bouchez J.M., Duprey J.L., Labrousse B. et Orange D., 1990. Reconnaissance géochimique sur les eaux de la lame de submersion de la vallée morte du Ferlo (Sénégal). Rapport ORSTOM, Dakar, projet CEE (EQUASEN), 85pp.

Gac J.Y., Appay J.L. et Labrousse B., 1990. L'intrusion des eaux océaniques dans la basse

vallée du fleuve Sénégal au cours du XXème siècle. Rapport ORSTOM, Dakar, projet CEE (EQUASEN), 52pp.

Cogels F.X. et Gac J.Y., 1990. Bilan limnologique du lac de Guiers avant la mise en fonction du barrage de Diam : hydrologie, qualité et gestion des eaux. Rapport ORSTOM, Dakar, projet CEE (EQUASEN), 38pp.

Monteillet J., Kane A., Saos J.L. et Diouf B., 1990. Environnements sédimentaires du Bas-Sénégal, après la mise en eau du barrage de Diam : Analyse des particules supérieures à 100 µm. In: Rapport scientifique n° 2, Projet EQUASEN, avril 1990, 14pp.

Orange D. et Gac J.Y., 1990. Reconnaissance géochimique des eaux du Fouta Djallon (Guinée). Flux de matières dissoutes et en suspension en Haute-Gambie. Géodynamique, 5(1), 35-49.

Orange D. et Gac J.Y., 1990. Bilan géochimique des apports atmosphériques en domaines sahélien et soudano-guinéen d'Afrique de l'Ouest (bassins supérieurs de Sénégal et de la Gambie). Géodynamique, 5(1), 51-65.

Kane A., Saos J.L. et Monteillet J., 1990. Environnements sédimentaires du Bas-Sénégal, après la mise en eau du barrage de Diam : Analyses granulométriques. In: Rapport scientifique n° 2, Projet EQUASEN, avril 1990, 13pp.

Diouf B., Barusseau J.P. et Kane A., 1990. Environnements sédimentaires du Bas-Sénégal, après la mise en eau du barrage de Diam : Evolution de la zone d'embouchure du fleuve Sénégal : bilan des premières observations morphosédimentaires. In: Rapport scientifique n° 2, Projet EQUASEN, avril 1990, 7pp.

Gac J.Y., 1990. Environnement et qualité des eaux du Sénégal. Rapport scientifique n° 1, multigr., projet EQUASEN de la CEE, TS2/0198F/EDB, DG XII programme STD, Bruxelles, 54pp.

Cogels F.X., Gac J.Y., Appay J.L., Evora N. et Labrousse B., 1990. Fonctionnement et bilans hydrologiques du lac de Guiers de 1976 à 1989. Rapport ORSTOM, Dakar, projet CEE (EQUASEN), 60pp.

Gac J.Y., Appay J.L., Cam N. et Orange D., 1990. Le haut bassin versant du fleuve Sénégal. Rapport ORSTOM, Dakar, projet CEE (EQUASEN), 108pp.

Gac J.Y., Appay J.L. et Diallo M.I., 1990. La visibilité horizontale au sol à Dakar (Sénégal) de 1987 à 1989. Projet CEE (EQUASEN), Rapport multigr., ORSTOM, Dakar, 45pp.

Gac J.Y., Cogels F.X., Kane A. et Saos J.L., 1990. Environnement et qualité des eaux du Sénégal. Rapport scientifique n° 3, multigr., projet EQUASEN, TS2/0198F/EDB, DG XII programme STD, Bruxelles, 1 novembre 1990, 63pp.

Leger D., Schmit J.P., Youla M., Cogels F.X. et Gac J.Y., 1990. Etude d'un écosystème aquatique sahélien. Composition chimique élémentaire des eaux du lac de Guiers (Sénégal). Rapport du CECI (Centre Canadien d'Etudes et de Coop. Internationale), 85pp.

Orange D., Gac J.Y., Paquet H. et Quantin P., 1991. Minéralogie des matières en suspension des bassins amont des fleuves Sénégal, Gambie et Niger (Afrique de l'Ouest). Rapport CEE (projet EQUASEN), 19pp.

Cogels F.X., Dacruz Evora N. et Gac J.Y., 1991. L'évaporation du lac de Guiers (Sénégal) de 1976 à 1989. Bilan et essai d'interprétation. Rapport CEE (projet EQUASEN), 25pp.

Gac J.Y., Cogels F.X., Evora N. et Labrousse B., 1991. Le bilan hydrologique du lac de Guiers en 1990. Rapport CEE (projet EQUASEN), 20pp.

Gac J.Y., 1991. Environnement et qualité des eaux du Sénégal. Rapport scientifique n° 4, avril 1991, 122pp.

Baillon F. et Gac J.Y., 1991. L'avifaune du lac de Guiers. Rapport CEE (projet EQUASEN), 13pp.

Evora N.D., Gac J.Y. et Cogels F.X., 1991. Logiciel de gestion prévisionnelle (LGPLG) des eaux du lac de Guiers. Rapport CEE (projet EQUASEN), 56pp.

Gac J.Y., Cam M. et Orange D., 1991. Données hydroclimatiques et géochimiques sur le bassin versant du fleuve Sénégal et sur la Guinée (Tome 1). Rapport CEE (projet EQUASEN), 87pp.

Gac J.Y., Cam M., Diallo M.I. et Orange D., 1991. Le point sur les observations quotidiennes des brumes sèches au Sénégal de 1984 à 1991. Rapport CEE (projet EQUASEN), 13pp.

Gac J.Y., Cam M. et Orange D., 1991. L'impact de la sécheresse actuelle sur le bilan hydrologique du fleuve Sénégal à Bakel. Rapport CEE (projet EQUASEN), 32pp.

Gac J.Y., Cam M., Cecchi P., Cogels F.X., Kane A. et Saos J.L., 1991. Environnement et qualité des eaux du fleuve Sénégal. Rapp. scientifique n° 5 projet EQUASEN, 202pp.

Cecchi Ph., 1991. Analyse de la variabilité du vent à St Louis durant la saison froide (décembre 1989-mai 1990). Doc. Scientifique du Centre Rec ODT, 24pp.

Gac J.Y., Cogels F.X., 1991. Géochimie des eaux de la vallée du Ferlo. Sous thème B: Gestion des ressources en Eau. In: Proceedings of the VII Congress of Water Resources (International Water Resources Association), mai 1991, Rabat, 23-25.

Gac J.Y., 1991. Intrusion des eaux océaniques dans la basse vallée du Sénégal. Sous thème A3: Politique de l'eau. In: Proceedings of the VII Congress of Water Resources (International Water Resources Association), mai 1991, Rabat, 27-28.

Cogels F.X., Cam M., Evora N.D. et Gac J.Y., 1992. Utilisations et applications pratiques du modèle d'aide à la gestion des eaux du lac de Guiers (modèle LGPLG). Alternatives de gestion actuelle et future. Rapport CEE (projet EQUASEN), 47pp.

Gac J.Y., Cogels F.X. et Evora N., 1992. Fonctionnement et bilan hydrologique du lac de Guiers (Sénégal) en 1991. Rapport CEE (projet EQUASEN), 40pp.

Cogels F.X., Cam M., et Gac J.Y., 1992. Evolution annuelle et interannuelle des chlorures dans

le lac de Guiers à N'gnith de 1973 à 1991. Rapport CEE (projet EQUESEN), 40pp.

Carn M., Sonko P.N., Gac J.Y. et Guillot B., 1992. Epsat-: Logiciel de traitement d'images pour l'estimation de la pluviométrie à partir de l'imagerie IR. Meteosat. Rapport CEE (projet EQUESEN), 42pp.

Gac J.Y., Carn M., Cecchi P., Cogels F.X. et Millet B., 1992. Environnement et qualité des eaux du fleuve Sénégal. Rapp. scientifique n° 6 projet EQUESEN, 67pp.

Coly A. et Gac J.Y., 1992. Le lac de Guiers: modalités de gestion hydrologique et approche quantitative en 1991. Rapport CEE (projet EQUESEN), 38pp.

Gac J.Y., Carn M. et Cogels F.X., 1992. Les brumes sèches: Evénements climatiques majeurs au Sahel: Gros plan sur les observations journalières au Sénégal de 1984 à 1991. Veille Climatique Satellitaire, ORSTOM, Météo France, 41, 48-59.

Cogels F.X. et Gac J.Y., 1992. Lake of Guiers (West Africa). International lake environment committee foundation Newsletter (ILEC), 20, 6-7.

Cogels F.X. et Gac J.Y., 1992. Evaporation and annual evolution of chloride concentrations in the water of a shallow sahelian lake: lake of Guiers (Sénégal). A paraître In: Verh. Internat. Verein. Limnol.

Cogels F.X., Niang A., Carn M. et Gac J.Y., 1992. Recherche d'une station de référence pour un suivi qualitatif régulier des eaux du lac de Guiers. Doc. multigr. ORSTOM-CEE, 20pp.

Kane A., 1992. Déversements au barrage de Diama et transport de matières en suspension au cours de l'année hydrologique 1990. In: Proceedings of the International Symposium on Erosion and Sediment transport Monitoring Programmes in River Basins, Oslo.

Thiebaut J.P., Saos J.L. et Bader J.C., 1992. Variation des hauteurs d'eau du fleuve Sénégal de 1986 à 1992. Doc. multigr. ORSTOM-CEE, 78pp.

Gac J.Y., Carn M. et Cogels F.X., 1992. Environnement et qualité des eaux du Sénégal. Rapport scientifique n° 7. Rapport CEE (projet EQUESEN), 74pp.

Cogels F.X., Thiam A. et Gac J.Y., 1993. Premiers effets des barrages du fleuve Sénégal sur le lac de Guiers. In: Revue d'Hydrobiologie tropicale, 26(3), 105-107.

Gac J.Y., Coly A., Niang A., Carn M. et Cogels F.X., 1993. Bilan hydrologique du lac de Guiers en 1992. Vers une gestion concertée des crues du fleuve Sénégal. Doc. multigr. ORSTOM-CEE, 21pp.

Cogels F.X., Niang A., Carn M. et Gac J.Y., 1993. La qualité des eaux du lac de Guiers. 1. Bilan qualitatif 1989-92. - 2. Effets des aménagements du fleuve Sénégal - 3. Première utilisation d'un modèle de gestion qualitative. Doc. multigr. ORSTOM-CEE, 50pp.

Orange D., Gac J.Y. et Diallo M.J., 1993. Constituent composition of Harmattan dust and geochemical balance of atmospheric depositions in continental West Africa. In: IAHS Proceedings, Tokyo, juillet 1993.

Cogels F.X., Niang A., Coly A. et Gac J.Y., 1994. Le lac de Guiers: Etude générale du système lacustre et problématique de gestion. Doc. multigr. ORSTOM-CEE, 68pp.

## ■ Rapport de synthèse du programme EQUESEN. 6 tomes

Chap. I: Historique, de Ptolémée (200 av.JC) à Manantali, 25pp.

Chap. II: Le bassin versant du fleuve Sénégal, 44pp.

Chap. III. Les apports exogènes au bassin versant, 64pp.

Chap. IV. Les écoulements du fleuve Sénégal, 44pp.

Chap. V. Flux de matières en suspension et bilan de l'érosion des sols dans le bassin versant amont du fleuve Sénégal, 35pp.

Chap. VI. Flux de matières dissoutes et bilan de l'altération chimique. Géodynamique actuelle des paysages amont. Evolution de la qualité chimique des eaux du fleuve Sénégal, 58pp.

Chap. VII. Relations eaux de surface-eaux souterraines dans la vallée alluviale, 42pp.

Chap. VIII. Hydrologie estuarienne (Diama). Apports fluviaux de matières en suspension et en solution à l'embouchure du fleuve Sénégal, 80pp.

Chap. IX et X. Phytoplancton dans l'estuaire du fleuve Sénégal, 75pp.

Chap. XI. Le lac de Guiers: Etude quantitative et qualitative du système lacustre et développement d'un modèle de gestion, 58pp.

Chap. XII. Références bibliographiques du projet EQUESEN, 45pp.

## ■ Thèses de doctorat

Orange D., 1990. Hydroclimatologie et géodynamique actuelle d'un vieux paysage latéritique: le Fouta Djallon. Doctorat d'Etat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 220pp.

Cecchi P., 1992. Phytoplancton et conditions du milieu de l'estuaire du fleuve Sénégal: Effets du barrage de Diama. Doctorat d'Etat, Université de Montpellier II, 406pp.

Diagana A., 1994. Etudes hydrogéologiques dans la vallée du fleuve Sénégal de Bakel à Podor: Relations eaux de surface et eaux souterraines. Thèse de 3e Cycle, Université de Dakar, 126pp.

## ■ Mémoires de DEA et maîtrises

Dacruz Evora N., 1990. Bilan hydrique du lac de Guiers. Importance de l'évaporation d'une

nappe d'eau libre en zone sahélienne. Maîtrise d'Hydrologie. Faculté Polytechnique de Mons, Belgique.

Faye A., 1990. Eau et milieu physique dans le bassin de l'axe Gorom-Lampsar (Sénégal). Maîtrise de Géographie. Faculté des Lettres et des Sciences Humaines, Université de Dakar.

Leger D., 1990. Etude d'un écosystème aquatique sahélic, composition chimique élémentaire des eaux du lac de Guiers (Sénégal). Maîtrise de Géographie. UQAM, Université du Québec, Montréal, Canada.

Faye A., 1991. Les écoulements du fleuve Sénégal à la station de Diama au cours de l'année hydrologique 1990. DEA de Géographie Physique. Faculté des Lettres et des Sciences Humaines, Université de Dakar.

Diama S.M., 1992. Etude des aquifères alluviaux de la vallée du fleuve Sénégal (secteur Rosso, Dagana et lac de Guiers). DEA de Géologie. Département de Géologie de la Faculté des Sciences, Université de Dakar.

Koussoubé Y., 1992. Application de la géophysique (électrique) à l'étude des aquifères alluviaux de la vallée du fleuve Sénégal (nord Guiers, Dagana, Bas-Ferlo). DEA de Géologie. Département de Géologie de la Faculté des Sciences, Université de Dakar.

Coly A., 1992. I. Le régime hydrologique de la Koulountou à Missirah-Gonasse: la modification saisonnières de 1983/1984. II. Les modalités de la gestion hydrologique du lac de Guiers en 1991. DEA de Géographie Physique. Faculté des Lettres et des Sciences Humaines, Université de Dakar.

Niang A., 1992. I. La salinité de la haute Casamance. II. Premières approches pour la mise au point d'un modèle de gestion intégrée des eaux du lac de Guiers. DEA de Géographie Physique. Faculté des Lettres et des Sciences Humaines, Université de Dakar.

Da Boit M., 1993. Impacts des aménagements hydroagricoles sur la nappe alluviale dans la région de Richard-Toll/lac de Guiers. DEA de Géologie. Département de Géologie de la Faculté des Sciences, Université de Dakar.

Bassel M., 1993. Conséquence durable de deux décennies de sécheresse. L'hypersalinisation de la Casamance entre 1987 et 1992. DEA de Géographie Physique. Faculté des Lettres et des Sciences Humaines, Université de Dakar.

Kane O., 1993. Contribution à l'étude des systèmes irrigués dans la zone du lac de Guiers. DEA en Sciences de l'Environnement. Institut des Sciences de l'Environnement, Université de Dakar.

Contract number : **TS2-A-318**  
 Numéro de contrat :

- |   |   |
|---|---|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Optimal management of surface and underground reservoirs (conjunctive use) for irrigation. *</i></b>  |
| Titre :   | <i>Gestion optimale des réservoirs de surface et souterrains pour l'irrigation (utilisation conjonctive).</i>   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | K. Lecher   |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Universität Hannover, Institut für Wasserwirtschaft, Hydrologie und Landwirtschaftlichen Wasserbau, IWH.  |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Appelstrasse 9A,<br>30167 Hannover, Deutschland.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +49-511-762 22 37   |
| ▼ FAX :   | +49-511-762 37 31 - Tx : 09-23868 unihn d   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Argentina : Centro Regional de Agua Subterranea, CRAS.</li> <li>- Brazil : Universidade Federal do Ceara, UFC, Pos-Graduação Engenharia Civil, Recursos Hidricos.</li> <li>- Spain : Universidad Politecnica de Valencia, UPV, Departamento de Ingenieria Hidraulica.</li> </ul> |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | conjunctive use; irrigation; groundwater quality; underground dams.<br><i>utilisation conjonctive; irrigation; qualité de l'eau souterraine; barrage enterré.</i>   |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 102p. English.  |

\* see also STD1 Publication, 1989; TSD-298 project, p. 580

# Optimal management of surface and underground reservoirs (conjunctive use) for irrigation

## *Objectives of the research*

---

The principle aim of this cooperative research is the development of practical and effective methods for the management of water, a scarce resource in arid and semi-arid regions, by conjunctive use.

In the proposed project the optimal management of conjunctive use under quality aspects was to be investigated.

Salinization and enrichment in other solutes can in the long-term lead to changes in groundwater quality, reduction of agricultural yields, reduction of available water, soil degradation, and loss of arable land. Therefore, it was aimed to evaluate water quality by :

- modelling the solute transport process in groundwater;
- simulating long-term processes;
- developing optimal management strategies; and
- a new conceptual tool for the management of conjunctive use systems.

The developed submodels were to be applied to two different conjunctive use systems :

- the irrigation area of San Juan, Argentina, an intensively used agricultural region, with a system of surface reservoirs and artificial recharge sites; and
- the irrigation area of Morada Nova, Ceara, Brazil, with a surface reservoir and an artificial underground dam. It was planned to build more underground dams step by step as trap-dams in the framework of another project.

The studies of both project areas were to lead to general criteria, to a conceptual model, which can be applied to other projects, too.

Due to the fact that this project could only be supported by EC with 50 % of the requested funds, the working program had to be shortened.

Therefore, as regards groundwater quality, only nitrate simulation was undertaken at San Juan. With respect to water allocation, mainly the spatial distribution of surface and pumped groundwater was analysed. Furthermore, long-term simulation of project management and aspects of soil salinity had to be neglected.

Concerning the case study at Morada Nova, the research work was restricted to groundwater simulation.

## *Material and methods*

---

A conjunctive use system can consist of the following subsystems :

- Surface reservoir
- Surface water distribution network
- Groundwater reservoir.

The new conceptual model (chapter 5 - Final report) allows the management of a conjunctive use system under quantitative and qualitative aspects. This tool which helps to develop an efficient system management in a step by step process was applied to the water resource system at San Juan.

The conjunctive use subsystems are roughly characterized and the mathematical models, used here for simulation and optimization are also described (for detailed information see chapter 6 of final report).

## ■ Subsystem surface reservoir

The subsystem surface reservoir serves as short-term storage for the incoming river discharge. The surface reservoir outflow is a connecting element to the surface water distribution system and serves as an input value for this subsystem.

The application of optimization methods for controlling surface reservoir systems requires an analytical description of the problem, which often simplifies the characteristics of the reservoir. Incremental Dynamical Programming (IDP) (Bernholtz & Graham, 1960) has been used for the case study San Juan in order to derive the time distribution of the optimal reservoir outflow over a hydrological year.

## ■ Subsystem surface water distribution

The available water from the surface reservoir (reservoir outflow) and the water extracted from the groundwater reservoir are to be distributed «optimally» for different usages. Each water application is associated with an objective. These objectives can orientate for example yields of hydropower generation or irrigation of irrigable area.

Due to limited resources it often appears that different utilisation possibilities or objectives are in contradiction with each other. Other conflicts can appear because the use of groundwater resources is related to pumping costs. These costs are higher when more groundwater is needed to meet the water demand.

The problem of determining the «optimal» distribution strategy for mul-



tiobjective utilisation of water resources is leading to the evaluation of different goals. This makes it necessary to consider the preferences of the Group of Decision Makers (GDM) in the process of determining an «optimal» distribution strategy.

From the large amount of methods found in the references for solution of multiple-objective-decision-problems, an algorithm developed by Monarchi (1972) has been selected which has been further developed by Bogardi & Duckstein (1992).

This algorithm is called the «Sequential Multiobjective Problem Solving Technique» (SEMOPS). The initial version of SEMOPS is limited to continuous variables and expects that the goals can be described in simple differentiated functions. The algorithm in its original form determines only one solution for the investigated multiple-objective-decision-problem.

Bogardi & Duckstein (1992) extended this method by adding evolution strategies (Rechenberg, 1973), and allowed the use of discrete variables. SEMOPS was applied to a water resources planning and allocation problem in southern Thailand.

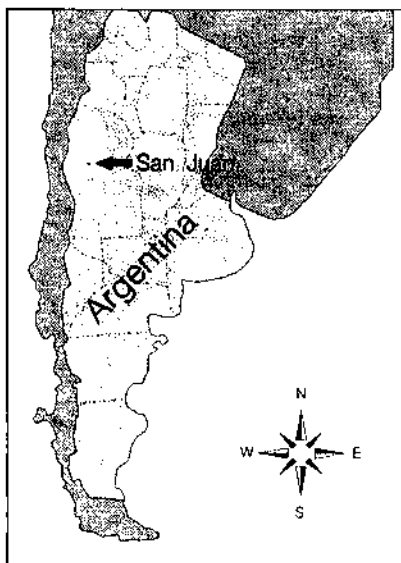


Figure 1 - Position of the project area.

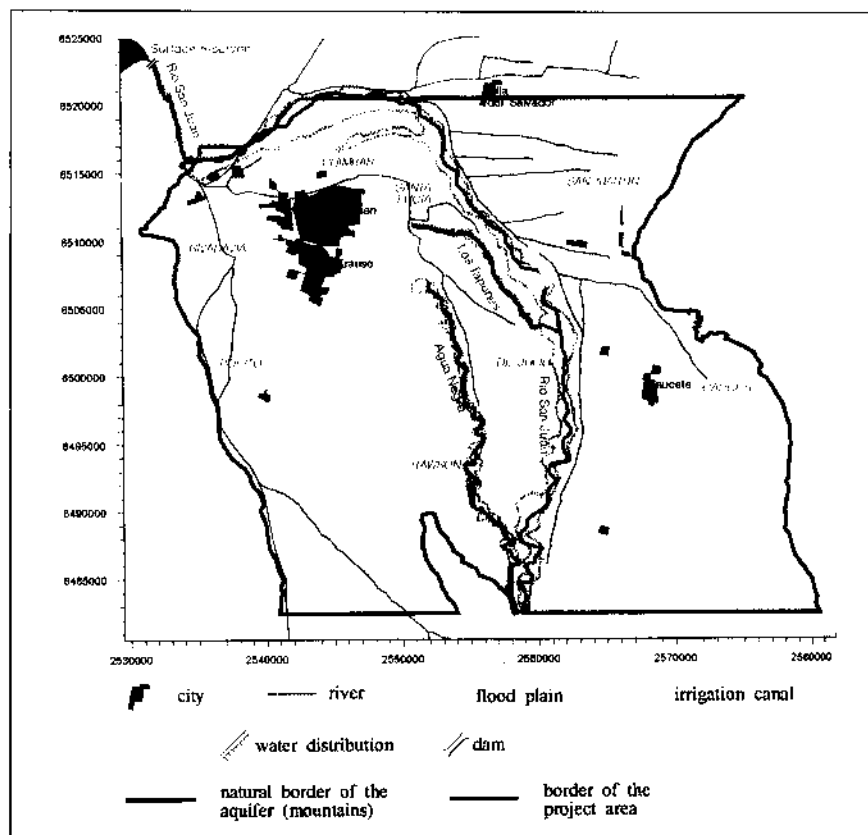


Figure 2 - Project area in San Juan.

In this research project, a multiobjective surface water distribution model based on SEMOPS for solving allocation problems within a conjunctive use system has been developed.

An essential improvement is that the band width of the possible decision variables do not have to be known. It is variable during the decision process and is determined depending on the water supply and already allocated water quantities.

#### ■ Subsystem groundwater reservoir

For the case study in Argentina and Brazil modified groundwater flow models have been applied. For the San Juan area, a 2 D groundwater transport model has been developed and tested.

### Results

A short-term management system has been developed for the present conjunctive use case study, «San Juan/Ar-

gentina», using the new conception model.

At first, the characteristics of the subsystems surface reservoir, surface water allocation network and groundwater reservoir were analysed. This was followed by a selection of decision variables and the relevant management goals. Depending on state variables and system characteristics the submodels have been chosen, adapted and calibrated adequately.

With the help of these submodels an analysis of the present state of the system has been carried out. The effects of the present management system were analysed. At present, the management of conjunctive use system is aimed at preserving inflow water in the system as much as possible.

With the aid of the water allocation model, it can be proved that by controlling the reservoir with maximum water withhold in the system,

even during a dry year no water supply bottlenecks for population and industry exist. The considered water allocation schemes can almost completely meet the entire irrigation requirement. The achievable yields from hydropower utilisation significantly exceed pumping costs.

The groundwater analysis shows that small depth of groundwater occur, especially in irrigated areas, and that the present management leads to a further increase of the groundwater table. Therefore, there is an increasing risk of salinization of irrigated areas.

The evaluation of measured nitrate concentrations in groundwater shows that the nitrate concentration in the surroundings of San Juan City is already very high. The temporal development of nitrate distribution in the past indicated that by maintaining present management, a further increase of nitrate concentration in surrounding areas of the city will occur. Moreover, the flow velocities will be reduced due to the filling of the aquifers and the conditions in the project area. This leads to a fixation of the pollutant trail eastward of San Juan City.

Due to the fact that long-term reduction of nitrate concentration is of special importance, the short-term management system has been formulated according to the guidelines, derived from a corresponding groundwater management.

A future management system should therefore follow the long-term goal of reducing the high nitrate concentrations in the immediate surroundings of the city and of maximizing the system outflows. Furthermore, a balance between system inflows and outflows should be achieved in the long-term. In addition, a further salinization of irrigation areas should be prevented and in the future a rehabilitation of already salinized area should be achieved.

The use of the groundwater model for a selected area proved that the conjunctive use system of San Juan should in fact be operated according to the following restrictions :

- Maintaining minimal pumping volume for the well groups to lower groundwater table in irrigated areas and at the same time to reduce nitrate concentrations in these areas;
- Avoiding artificial groundwater recharge;
- Diverting reservoir discharge as little as possible in the Rio San Juan to minimize infiltration from the river bed;
- High load of the by-pass; and
- Meeting a lower boundary value for the discharge of Rio San Juan at the system boundary.

The calculated reservoir operation curves for «Maximizing the system outputs» show that water surpluses in

reservoir have to be reduced in the short-term to relieve the entire system.

The water allocation schemes calculated by the multi-objective decision model allow a full irrigation of the economically important irrigation areas 1 to 4 even under maximizing the system output. By operation of well group 4, eventually the less important irrigation area 5 can be almost completely irrigated. For the considered month, using these water allocation schemes, the discharge of Rio San Juan at the system boundary attains approximately 40 % of the reservoir discharge. The related yields from hydropower utilisation correspond approximately to the pumping costs.

The investigation of the water supply bottleneck within a typical dry year shows that the realisation of all man-

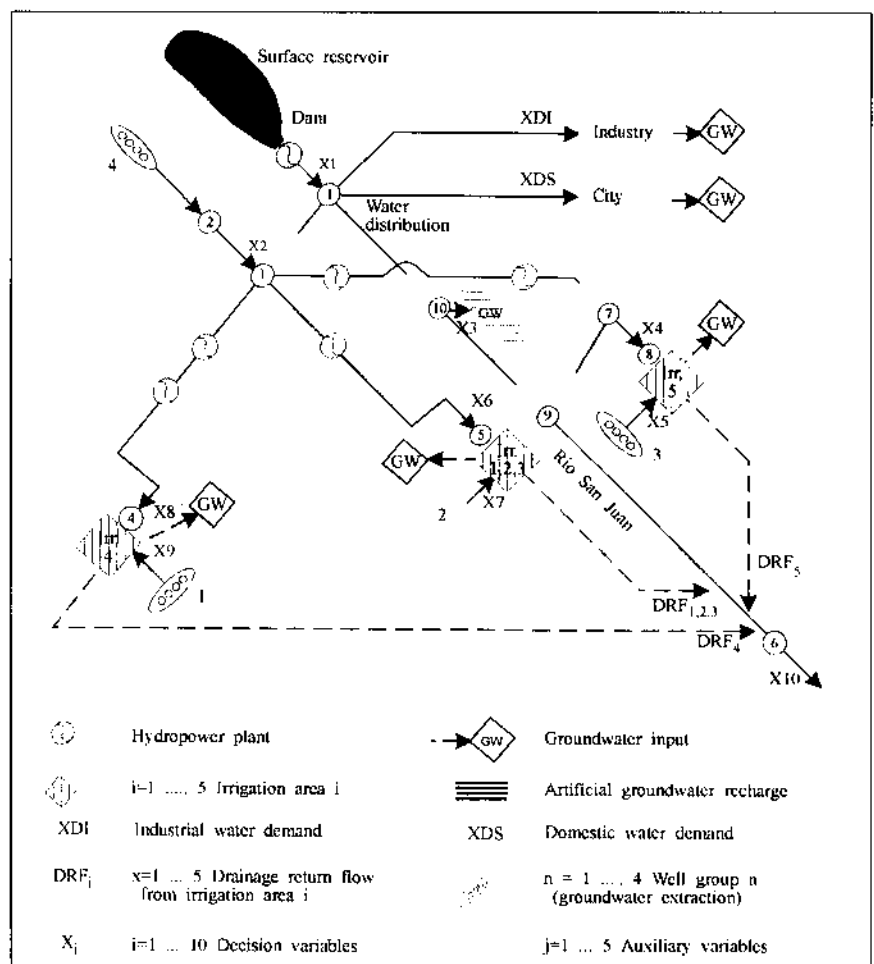


Figure 3 - Flow network of the project area San Juan.

agement goals is compatible with the strategy «Maximal system outputs».

Concerning the long-term analysis, it has been proved that with the acquired short-term management system, the reduction of nitrate concentrations and the lowering of the groundwater table can also be realised in the long-term.

The investigation carried out indicates that in the present case study, the qualitative aspects (groundwater quality) should be emphasized. Quantitative aspects gain a special importance when, for example, the irrigated areas are to be expanded or cultivated with high water requirements.

Under the present short-term management system no necessity for changes in the system structure are expected.

The case study at Morada Nova gives an example of the strategy to manage an irrigation area in a semi-arid region with groundwater reservoirs.

The main objective was to calculate the available water resources for irrigation and to develop a management concept for the groundwater reservoir. The results show that the following steps should be taken for an optimal management :

- calculation of number and location of pumping wells according to the site of the irrigation plots;
- calculation of the potentially available pumping rate and its temporal course;
- adaptation to the temporal demand of irrigation water.

Optimization can be achieved by artificial infiltrations with water from the surface reservoir *Acude Chile*. The recharge should be continuous, so that the groundwater reservoir is filled up permanently. To avoid water logging and salinization hazards by capillary rise, the groundwater table should be controlled by pumping.

## Conclusions

The study shows that - following the methodology of the new conceptual model - efficient water management, considering both quantitative and qualitative aspects, can be developed for conjunctive use systems similar to that at San Juan, Argentina. Nevertheless, the new conceptual tool will have to be applied to other water resource systems to test the flexibility of the decision structure developed here and to include - if necessary - further decision steps into this general concept.

Considering the future of the conjunctive use systems with multi-purpose water use, the modelling of the surface reservoir will have to be included in the multi-objective water allocation model to follow a completely dynamic approach. This will offer an interesting possibility to simulate and optimize the use of surface and underground waters in an interactive manner.

As regards the optimal use of underground dams, research is still needed. Due to the considerable reduction of funds by EC, only rough management actions could be defined for this specific irrigation project at Morada Nova, Brazil. In the future, the use of artificially stored groundwater and the interaction with soil salinization will have to be analyzed in more detail. Further efforts will be necessary to derive a general strategy for the efficient management of this type of water resources systems.

## Publications

- Barovic G., 1979. Einfluß der Sorption auf Transportvorgänge im Grundwasser. Mitteilungen des Institutes für Wasserwirtschaft, Hydrologie und landwirtschaftlichen Wasserbau, Universität Hannover, Heft 46, Hannover.
- Baume G., 1984. Trap-dams : artificial subsurface storage of water, *Water International*, 9 (1984), 2-9.
- Bear J., 1979. *Hydraulics of groundwater*. McGraw Hill Series in water resources and environmental engineering.

Bernholtz B. and Graham L.J., 1960. Hydrothermal economic scheduling : solution by Incremental Dynamic Programming. *Transactions AIEE*, Vol. 79.

Bogardi J. and Duckstein L., 1992. Interactive multi-objective analysis embedding the decision maker's implicit preference function. *Water resources Bulletin*, vol. 28, N° 1, 1-14.

Boochs P.W., Mull R., Riemeier B. and Tegtbauer D., 1986. Groundwater modelling in areas with shallow groundwater. *Proceedings of the 2nd Scientific Assembly of the IAHS : conjunctive water use*. Budapest, Hungary, 1986, 77-85.

Correa N.R., 1988. Optimale Betriebsregeln für die Verbundbewirtschaftung von Oberflächen- und Grundwasserspeichern. Mitteilungen des Institutes für Wasserwirtschaft, Hydrologie und landwirtschaftlichen Wasserbau, Universität Hannover, Heft 68, Hannover.

Correa N.R. and Billib H.A., 1988. Long-term optimal management of a system with conjunctive water use. *Proceedings of the VIth IWRA World Congress on Water Resources*, Ottawa, Canada, 1988, vol. 1, 75-86.

Correa N.R. and Billib H.A., 1990. Strategies for the management of an irrigation system with conjunctive water use - Consideration of quality aspects. *Proceedings of the 14th ICID Conference on Irrigation and Drainage*, Rio de Janeiro, Brazil, 1990, Vol. 1-A, 91-102.

Cras, 1985. Analisis del Contenido de Nitrato y otros Parametros indicadores de Contaminacion del Agua Subterranea en el Area de Acuífero libre del Valle de Tulum. Centro Regional de Agua Subterranea, P-276, San Juan, Argentina.

Heidari, Chow, Kokotovic, Meredith, 1971. Discrete differential dynamic approach to water resources system optimization. *Water resources research*, AGU, Vol. 7(2).

Ito K., 1951. On stochastic differential equations, *Am. Math. Soc.*, New York.

Kinzelbach W., 1987. Numerische Methoden zur Modellierung des Transports von Schadstoffen in Grundwasser. Oldenburg Verlag, München Wien.

Klenke M., 186. Numerische Modelltechnik in der Grundwasserhydrologie. Mitteilungen des Institutes für Wasserwirtschaft, Hydrologie und landwirtschaftlichen Wasserbau, Universität Hannover, Heft 59, Hannover.

Monarchi D.E., 1972. Interactive algorithm for multiple objective decision making. Technical report n° 6, Hydrology and Water Resources Department, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.

Pielke M., 1992. Bewirtschaftung des Grundwassers urbaner Räume. Mitteilungen des Institutes für Wasserwirtschaft, Hydrologie und landwirtschaftlichen Wasserbau, Universität Hannover, Heft 78, Hannover.

Rechenberg J., 1973. Evolutionsstrategie. *Problemata Nr. 15*, Frommann-Holzboog Verlag, Stuttgart.

## II

CONSERVATION  
ET MISE EN VALEUR DU MILIEU

CONSERVATION  
AND BETTER USE OF THE ENVIRONMENT

GESTION  
ET DEFENSE DES SOLS

---

*SOIL MANAGEMENT  
AND PROTECTION*

Numéro de contrat : TS2-A-108  
Contract number :

- |  |  |
|--|--|
| ▼ TITRE :  | <b><i>Salure des sols maghrébins.<br/>Influence sur les propriétés physiques et physico-chimiques<br/>des sols et sur la minéralisation de l'azote. *</i></b>  |
| Title :  | <i>Salinity and alkalinity of the soils of the Maghreb.<br/>Consequences on their physical and physico-chemical properties<br/>and on nitrogen mineralization.</i>   |
| ▼ CHEF DE PROJET :<br>Project leader :                     | C. Cheverry, (Professeur ENSAR)<br>et M. Robert, (Directeur de Recherche INRA)   |
| ▼ INSTITUTION-HOTE :<br>Host institution :                 | Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes (ENSAR).  |
| ▼ ADRESSE :<br>Address :                                   | Rue de Saint Briec 65,<br>35042 Rennes Cedex, France.  |
| ▼ TELEPHONE :  | +33-99-28 50 00  |
| ▼ FAX :  | +33-99-28 54 30  |
| ▼ INSTITUTIONS<br>ASSOCIEES :<br>Associated Institutions : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Algérie : INA Alger - INESA Batna - INESA Tiaret - INESA Blida.</li> <li>- Maroc : IAV Hassan II, Rabat.</li> <li>- Tunisie : Faculté des Sciences de Tunis.</li> <li>- Belgique : UCL, Laboratoires de Louvain-la-Neuve et de Chimay.</li> <li>- France : INRA Versailles, Science du Sol et Métabolisme des Végétaux.</li> </ul>                      |
| ▼ MOTS CLES :<br><br>Key words :                           | <p>sol salé; gestion des périmètres irrigués; propriété physique des sols;<br/>comportement de l'azote en milieu salé; simulation des processus<br/>pédologiques en milieu salé.</p> <p><i>saline and alkaline soils; irrigated land management; physical<br/>properties of the soil; nitrogen mineralization in saline conditions;<br/>simulation of soil changes in saline conditions.</i></p> |
| ▼ RAPPORT FINAL :<br>Final report :                        | 59p. Français (39p. rapport principal, + 6 figures, + 20 p. annexes).  |

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-193, p. 610

# Salure des sols maghrébins. Influence sur les propriétés physiques et physico-chimiques des sols et sur la minéralisation de l'azote

## Objectif de la recherche

Le but du programme a été de répondre à la nécessité d'une recherche moderne, face au problème de l'aggravation de la salure dans les pays du Maghreb, en s'appuyant sur des bases physiques, physico-chimiques, de manière à garantir les possibilités de généralisation des résultats obtenus à d'autres régions du monde. Un objectif particulier a été de rapprocher les fonctionnements hydriques, physico-chimiques et biologiques de ces sols. La rédaction d'un ouvrage, intitulé : «Simulation des processus pédologiques dans les sols maghrébins» a été l'un des autres objectifs de ce programme, afin de mettre entre les mains des jeunes chercheurs de ces pays un outil informatique fiable.

Le projet a visé à développer la collaboration entre des équipes scientifiques de l'Europe (Belgique, France) et des équipes du Maghreb. Un soin particulier a été apporté à déplacer le pôle des activités de l'Europe vers le Maghreb, compte tenu du potentiel de recherche qui y a été créé.

## Matériel et méthodes

**Sur le terrain**, les sites privilégiés ont été la vallée du Chéouli en Algérie, les oasis du sud et certains périmètres irrigués au Maroc, les Marais de l'ouest en France. Les méthodes ont été des méthodes de caractérisation pédologique des sols : études fines de toposéquences de sols, cartographie à grande échelle; caractérisation du transfert de l'eau et des sels : suivi des nappes, conductivimétrie électro-

magnétique, méthodes d'appréciation de la stabilité et des propriétés hydrodynamiques des sols, mise en oeuvre d'un simulateur de pluie ...

Les méthodes utilisées **en laboratoire** ont été la diffractométrie RX (minéralogie des argiles), la microscopie optique et électronique (MEB, MET, sonde associée), les méthodes classiques de détermination de la salure des sols, les méthodes physiques (caractérisation de la porosité, rétention en eau, dispositifs de mesure du gonflement-retrait...), les méthodes biochimiques permettant d'apprécier les différentes formes de l'azote.

## Résultats

### ■ Fonctionnement physique des sols du Maghreb

L'effet des sels sur la **dégradation physique** des sols salés a été étudié par Daoud (1993) dans la vallée du Chéouli (Algérie). Les premiers stades de l'évolution après mise en irrigation (distribution des sels et du sodium échangeable dans les profils) ont été décrits. Les mesures faites révèlent par ailleurs que les pluies hivernales n'éliminent que 50 % des sels apportés par les périodes d'irrigation. Les conséquences de la salinité et de la sodicité sur la morphologie des sols (passage d'une structure grumeleuse à une structure spongieuse, comportement des prismes dans les sols argileux), sur la stabilité structurale et les propriétés hydrodynamiques, ont fait l'objet d'observations dans les divers pays. Les sels se sont avérés favoriser

la formation des croûtes de battance (Saïdi, 1992).

Les effets des sels sur le **phénomène de rétention en eau** ont été étudiés en laboratoire, à Rabat, Alger, Versailles, sur des échantillons à dominante argileuse, prélevés au Maroc dans des sols "tirs" (Badraoui) ou en Algérie (Daoud). Sur des pâtes de sols préparées en présence de différentes concentrations salines, il est possible de montrer une différence de comportement lorsque la concentration saline dépasse 10 meq/l. Le % d'argile et la surface spécifique s'avèrent les seuls paramètres importants de la rétention en eau, à point de flétrissement (pF) élevé. La charge des matériaux (CEC) est surtout importante aux faibles pF. Les sols saturés en Na<sup>+</sup>, à faible concentration (10-3M) ont retenu le maximum d'eau. Les différences de rétention d'eau entre le Ca<sup>++</sup> et le Mg<sup>++</sup> n'ont pas été significatives, quelle que soit la concentration et quel que soit le pF; celles entre le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup> ont été très hautement significatives (Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup>) aux faibles pressions (<1 bar) (travaux réalisés avec de la bentonite).

La conductivité hydraulique est, elle, une propriété très sensible à l'effet des sels. Daoud, travaillant sur les argiles des sols du Chéouli, a noté la faible conductivité hydraulique de ces argiles (10<sup>-8</sup> cm/s), liée à la faible taille des particules (10 à 200 nm), et la moindre sensibilité aux sels du fait de la rigidité des particules. L'effet antagoniste du sodium échangeable et de la concentration saline a pu être bien vérifié et précisé. Mais le processus

d'action des sels est particulièrement complexe dans la mesure où les anions de type  $\text{Cl}^-$  et  $\text{SO}_4^{2-}$  ont également un rôle. Ainsi le magnésium en présence de  $\text{Cl}^-$  peut avoir un rôle analogue à Na, alors qu'en présence de  $\text{SO}_4^{2-}$  son action est voisine du calcium.

Des études réalisées sur les échantillons de 42 parcelles de Versailles ayant reçu des apports de sels alcalins (Na ou K) et ayant de faibles quantités de Na ou K échangeables (<5 %) montrent bien le mécanisme initial qui consiste en une dislocation des constituants les plus élémentaires qui sont organisés en petites particules interstratifiées (illite+ feuillets isolés).

L'efficacité des différents **amendements ou conditionneurs** quant à l'amélioration des propriétés physiques des sols salés a été expérimentée. Azib (1989), dans les Marais de l'Ouest français, a précisé les conséquences d'un apport de gypse sur les caractéristiques structurales, et de gonflement-retrait de prismes. Des quantités considérables de gypse (20 tonnes/ha) sont nécessaires pour empêcher la dégradation de la structure.

Les travaux réalisés en Algérie ont surtout concerné l'utilisation du **phosphogypse**, résidu de l'industrie des engrais; à l'est de l'Algérie plus de 2500 t/j sont ainsi rejetés à la mer. Les essais réalisés dans la région de Batna montrent une amélioration de la vitesse de filtration et une influence importante sur le dessalage (abaissement de la C.E. et du SAR). L'effet du phospho-gypse a également été étudié sur le fonctionnement biologique d'un sol salé : il provoque une augmentation de l'activité respiratoire et une intensification de la minéralisation de l'azote. L'utilisation du phospho-gypse semble donc pouvoir être préconisée. Il reste à étudier plus en détail certains risques environnementaux à long terme (fluor, éléments radioactifs).

L'effet des **conditionneurs** a été étudié en simulateur de pluie à l'INESA de Tiaret (Saidi, 1993). Ceux



Figure 1 - Canal d'irrigation au Maroc.

épanchés en surface peuvent prévenir la formation de la croûte de battance et l'ordre d'efficacité est polymères organiques (polyacrylamide neutre, anionique ou cationique) > polycations minéraux (à base d'aluminium). Les polymères cationiques (minéraux ou organiques) sont les plus efficaces au niveau des argiles; les polymères neutres ou anioniques sont plus efficaces pour renforcer la stabilité structurale des agrégats.

Des **études géochimiques** ont été poursuivies (étude expérimentale de la composition des solutions en présence de gypse et de mirabilite, Zouggari, 1992), et une ouverture vers la mécanique des sols en milieu salé a été tentée (influence de la concentration et de la nature des solutés sur la déformation de matériaux argileux, Charpentier S. (1991).

#### ■ Fonctionnement biologique et biochimique des sols salés du Maghreb

L'étude du mouvement des sels dans les périmètres irrigués doit nécessairement comprendre celle du mouvement des nitrates car il importe de minimiser les pertes en cet élément : pertes qui sont nuisibles tant sous l'angle de la minimisation des inputs, que sous

celui de la conservation de l'environnement. Le but premier a été d'obtenir une estimation de la fraction de l'azote minéralisable en fonction de la profondeur, de la densité de la biomasse microbienne et de l'effet de la salure sur les diverses constantes cinétiques. Soudi *et al.* (1990) ont étudié la **constante de minéralisation de l'azote organique** en fonction de la profondeur.

La vitesse de minéralisation de l'azote du sol suit une cinétique mixte d'ordre un puis d'ordre zéro. L'homogénéisation, la réhumectation et la mise en incubation d'un sol se traduisent en effet par un flash de minéralisation qui s'atténue exponentiellement et est suivi d'un processus de minéralisation à vitesse constante c'est-à-dire d'ordre zéro. Cette constante suit avec la profondeur une loi parabolique telle que :  $MR = AD^{-B}$ , où MR est la vitesse de minéralisation, A et B sont deux constantes caractéristiques du sol, et D est la profondeur. La grandeur des constantes A et B a été mise en rapport de façon significative avec les contenus en acides aminés des profils étudiés.

Plusieurs travaux de Soudi et collaborateurs (1990, 1991, 1992 a et b) ont

porté sur le **potentiel en azote minéralisable des divers sols marocains**. Les valeurs trouvées varient de 62 à 273 mg/kg de sol. Le flash initial de minéralisation représente 23 à 41 % de l'azote minéralisé en quatre mois. Cette fraction, très probablement liée à la décomposition de la biomasse microbienne, représente donc la quantité d'azote qui risque d'être perdue en cas soit de pluviosité excessive soit d'une distribution trop superficielle du système racinaire.

**L'effet de la salure** sur les propriétés de minéralisation et de nitrification des sols maghrébins a été étudié par Dellal et Halitim (1993) en Algérie et Soudi *et al.* (1991) au Maroc. On observe une diminution considérable de la biomasse microbienne en fonction de la salure. L'activité biologique globale est fortement déprimée par les concentrations salines élevées. Le pouvoir respiratoire a été réduit de 30 % pour une conductivité électrique de 24 mS.cm<sup>-1</sup>.

L'ammonification apparaît par ailleurs réduite d'environ 50 % lorsque la conductivité électrique de l'extrait de pâte saturée est comprise entre 20 et 24 mS.cm<sup>-1</sup>. A cette même concentration saline, la nitrification est totalement inhibée. A des concentrations salines intermédiaires, **une accumulation de nitrites a été décelée**. Les observations de Dellal et Halitim montrent que la phase transitoire conduit à des concentrations en nitrite qui vont jusqu'à 20 % de la quantité initiale d'ammonium. On conçoit sans peine l'importance de ce phénomène tant du point de vue agronomique (toxicité de l'ion nitreux) que du point de vue environnemental.

Le problème des interactions entre les propriétés physiques et biologiques,

phénomène le plus complexe des sols soumis à l'irrigation, a fait l'objet d'un début d'étude par le biais du phénomène d'oxydation de l'ammonium (travaux au Maroc). Ce programme STD a enfin permis d'aborder le problème de la valorisation des eaux salines pour la nutrition des plantes horticoles (Blida, Algérie).

### Conclusions et commentaires additionnels

Les efforts accomplis en commun par les équipes européennes et maghrébines durant ces huit dernières années, lors de deux programmes STD consécutifs, nous permettent d'attirer l'attention des «decision makers» sur l'intérêt de gérer de manière plus durable les milieux salés ou risquant de le devenir : gestion raisonnée de l'eau, mais aussi de la stabilité structurale des couches superficielles du sol, des engrais azotés et plus généralement de l'activité biologique. Les travaux réalisés pourraient par ailleurs être étendus dans un proche avenir dans trois directions :

- la confrontation des résultats obtenus sur les sols salés du Maghreb avec ceux obtenus au Moyen-Orient (Syrie, ...);
- la prévision des conséquences d'une poursuite de l'artificialisation du milieu : «bentonisation» des sols du Sahara; utilisation dans cette même région de la nappe de l'Albien; risques d'intrusion d'eaux marines compromettant la qualité des eaux des nappes littorales;
- l'application des méthodes rodées par les équipes du projet STD à d'autres problèmes agronomiques du Maghreb, le problème de l'intérêt de la jachère dans certaines zones céréalières, par exemple.

### Publications

Daoud Y. and Robert M., 1992. Influence of particle size and clay organization on hydraulic conductivity and moisture retention of clays from saline soils. *Applied Clay Science*, 6, 293-299.

Daoud Y. et Robert M., 1989. Influence de la nature de l'anion et du pH sur la conductivité hydraulique et la rétention en eau des pâtes de kaolinite sodique. *Agronomie*, 9, 629-633.

Daoud Y., Cheverry C. et Robert M., 1993. Comportement physico-chimique du magnésium dans les sols salés des plaines du Chélif (Algérie). Conséquences sur les propriétés des sols. Soumis à la revue «Science du Sol», France.

Azib M., 1989. Etude de l'évolution, de la genèse et du comportement des sols argileux salés, d'origine sédimentaire (Marais de l'ouest de la France). Thèse de Doctorat, ENSA-Rennes, 138pp.

Daoud Y., 1993. Contribution à l'étude des sols des plaines du Chélif. Le phénomène de salinisation, conséquences sur les propriétés physiques des sols argileux. Thèse de Doctorat d'Etat. Alger, 230pp.

Saidi B., 1992. Effets des conditionneurs sur les propriétés physiques des sols (stabilité des agrégats et infiltration stabilisée). Thèse de Magister, INA-Alger, 125pp.

Soudi B., Sbai A. and Chiang C., 1990. Nitrogen mineralisation in semi arid soils of Morocco : rate constant variation with depth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 756-761.

Soudi B., Amrani M. et Stitou M., 1991. Effet de la salinité sur l'ammonification et la nitrification dans des sols de zones semi-arides du Maroc. Comm. in "International Conf. on Agric. Manag. in salt affected areas", 25 avril-3 mai 1991, Agadir, Maroc.

Dellal A. et Halitim A., 1992. Activités microbiologiques en conditions salines : cas de quelques sols salés de la région de Relizane (Algérie). *Agricultures*, 1, 335-340.

Soudi B., 1989. Etude de la dynamique de l'azote dans les sols marocains : caractérisation et pouvoir minéralisateur. Thèse Doctorat, Rabat et Université Louvain-La-Neuve (Belgique), 1989, 140pp.

Laudelout H., Cheverry C. et Calvet R., 1993. Simulation des processus pédologiques dans les sols maghrébins, Ouvrage à publier par l'IAV-Rabat et l'ENSA-Rennes, 220pp.



Numéro de contrat : **TS2-A-257**  
Contract number :

▼ TITRE : **Mise en valeur des sols acides du delta du Mékong. \***

*Title :* *Upgrading of the acid sulphate soils of the Mekong delta.*

▼ CHEF DE PROJET : Henri Laudelout  
*Project leader :* (UCL - Centre de Recherches Forestières, Chimay, Belgique)

▼ INSTITUTION-HOTE : Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat.  
*Host institution :*

▼ ADRESSE : Avenue de la Faculté d'Agronomie 22,  
*Address :* 5030 Gembloux, Belgique.

▼ TELEPHONE : +32-81-61 19 55

▼ FAX : +32-81-61 49 41 - Tx : 59 165 CRAGx

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
*Associated Institutions :*

- Belgique : UCL, Laboratoires de Louvain-la-Neuve et de Chimay.
- Pays-Bas : Université de Wageningen.
- Vietnam : University of Can Tho.
- Vietnam : Institut des Sciences Agronomiques, Ho Chi Minh Ville.
- Vietnam : Institut des Sols et Fertilisants, Hanoi.

▼ MOTS CLES : delta du mékong; sol acide; toxicité aluminique; résistance aux facteurs nuisibles; fertilisation; gestion de l'eau; mise en valeur des sols; riz; sorgho; canne à sucre; phaseolus aureus; culture fourragère; nirs; élevage laitier.  
*Key words :* *mekong delta; acid soils; aluminium toxicity; resistance to injurious factors; fertilisation; water management; soil management; rice; sorghum; sugar cane; phaseolus aureus; forage crops; nirs; milk production.*

▼ RAPPORT FINAL : 41p. Français (+1 figure, + 33p. annexes).  
*Final report :*

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-190, p. 607

# Mise en valeur des sols acides du delta du Mékong

## Objectifs

L'objectif essentiel de ce programme STD2 était l'achèvement des programmes qui l'ont précédé : STD1 (TSD-190-B) et divers programmes subventionnés par des ONG.

Tous ces programmes ont eu pour objectif de contribuer au renouveau de la recherche agronomique au Vietnam avec comme finalité le développement d'une recherche agronomique indépendante et surtout intégrée dans le mouvement international de la recherche.

Il va de soi que cet objectif général devait se concrétiser par des travaux adaptés aux conditions locales.

Le problème majeur dans le Sud du Vietnam était et reste l'acidité du sol et les effets de toxicité qui en découlent.

L'acidité du sol peut représenter une contrainte majeure comme c'est le cas pour les sols sulfatés acides du delta ou la conséquence à la fois du développement pédogénétique sous un climat humide et d'une dégradation profonde des sols rouges et gris. La restauration et l'amélioration de ces sols passent obligatoirement par la réduction des phénomènes de toxicité aluminique liés à l'acidité.

## Matériel et méthodes

La première démarche consistait à rechercher des cultivars des espèces cultivées qui se caractérisent par une adaptation aux conditions locales de sol et de climat et surtout par une résistance marquée à la toxicité aluminique.

Deux voies s'ouvraient, la première était de rechercher, parmi les cultivars locaux qui se distinguent par leur rusticité et leur frugalité, des variétés qui auraient un potentiel de production suffisant et une résistance génétique marquée à la toxicité aluminique, cette recherche se faisant par expérimentation contrôlée en phytotron et par les tests classiques de comparaison intervariétale au champ.

L'autre voie était de mettre à la disposition de la recherche agronomique vietnamienne un réseau de

connexions internationales permettant l'introduction des cultivars provenant de régions dont le Vietnam avait été coupé pendant les années de guerre.

Ensuite, il convenait d'établir des techniques culturales qui permettraient d'augmenter la productivité par la neutralisation des effets de toxicité liés à l'acidité. A côté des mesures de fertilisation minérale et d'amendement, d'application malaisée et difficilement généralisables dans une phase initiale, la voie royale pratiquée depuis des siècles dans toutes les

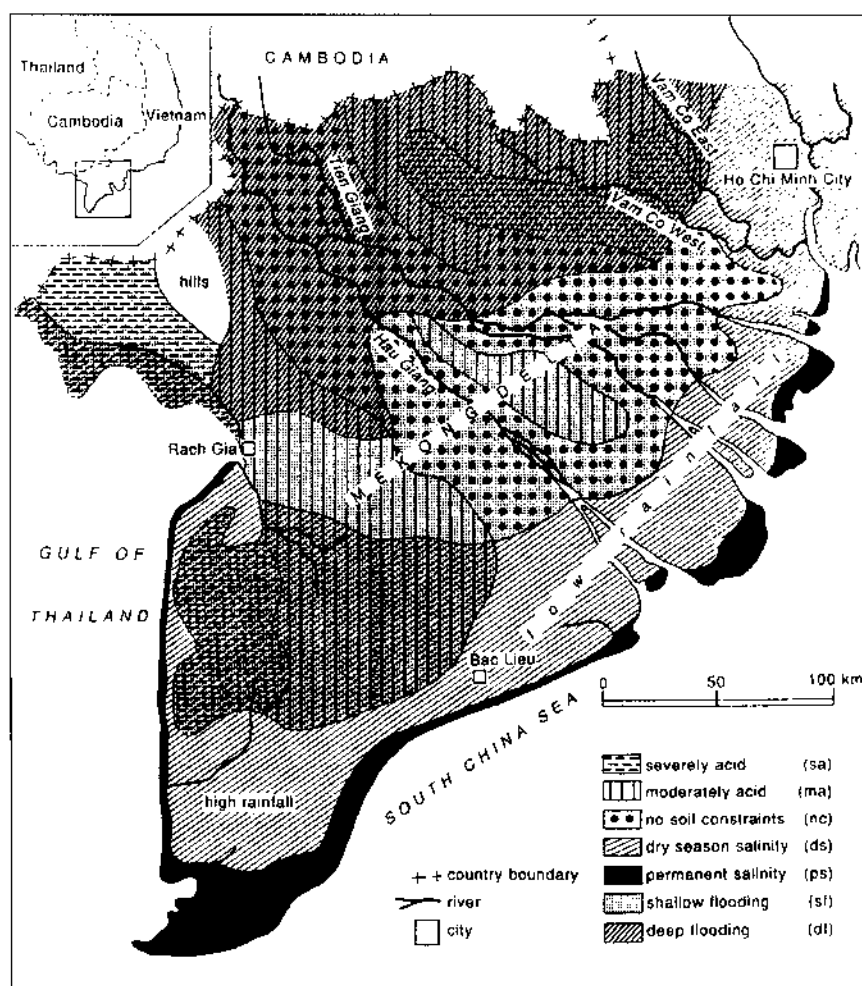


Figure 1 - Carte des types de sol du delta du Mékong, en fonction des contraintes liées à l'activité, la salinité et l'engorgement des sols.

régions humides a consisté à neutraliser la toxicité aluminique par enrichissement du sol en matière organique.

Cet apport se réalise en deux étapes : synthèse de matière organique par le système racinaire des graminées et des légumineuses en mélange prairial puis apport de fumier à partir de l'élevage. C'est là l'essence du «ley farming» ou «alternate husbandry». Une approche non réductionniste de cette technique imposait l'étude d'une grande variété de problèmes : produire de l'herbe impose la connaissance de sa valeur nutritive pour le bétail et donc indirectement la connaissance de l'incidence d'une meilleure alimentation sur la quantité et la qualité de la production laitière.

## Résultats

En examinant les résultats de l'aval vers l'amont, c'est-à-dire de la production laitière vers les propriétés des sols qui constituent les contraintes essentielles de leur mise en valeur ou de leur restauration, on peut noter que les résultats essentiels obtenus sont les suivants :

### ■ Elevage laitier

Un document a décrit les travaux effectués sur la construction, les coûts et les recommandations en matière d'aménagement de bâtiments simples adaptés à de petits troupeaux en milieu paysan traditionnel. Sous ces conditions (petits producteurs), on a démontré que la solution paille-urée était faisable mais que la difficulté essentielle de son évaluation était l'hétérogénéité du cheptel.

La transformation du lait chez les petits producteurs est extrêmement artisanale. Son évaluation économique a été faite.

L'alimentation du bétail chez ces producteurs est aussi rudimentaire que le traitement de la production laitière.

Les résultats relatifs à ce dernier sujet se distribuent en trois catégories :

### ■ Evaluation de la qualité des fourrages

Évaluation de la qualité des fourrages par la spectrométrie dans le proche infrarouge. On a calibré la méthode pour les principales espèces fourragères cultivées au Viêt Nam. On peut actuellement estimer de façon rapide et précise leur composition chimique et leur digestibilité. Cette propriété a été également étudiée par la méthode de digestibilité enzymatique qui a été implantée à la Station de Zootechnie de l'Institut Agricole du Sud Viêt Nam où elle peut rendre des services en attendant que le hardware nécessaire à l'exécution des analyses IR y soit disponible.

### ■ Conservation des fourrages

La soudure alimentaire pendant la saison sèche peut se faire soit en recourant à des ensilages de *Pennisetum* ou de *Panicum* soit par l'apport de paille de riz traitée.

Les résultats montrent l'importance d'exploiter le fourrage, *Pennisetum* ou *Panicum* à un stade jeune et donc riche en sucres fermentescibles. En ce qui concerne la paille de riz traitée à l'urée et à la mélasse, les essais ont montré que le traitement de la paille pendant 10 jours à 30 °C par une solution aqueuse apportant 6 % d'urée et 2 % de mélasse donnait les meilleurs résultats.

### ■ Production des fourrages

Comme nous l'avons dit ci-dessus, une des approches consistait à faire un choix des espèces fourragères, graminées et légumineuses et cet objectif a été réalisé par un essai de comparaison variétale, sur des cultivars de *Panicum maximum* et de *Setaria sphacelata* importés d'Amérique latine sur plusieurs sites très différents au point de vue pédologique. D'autres essais ont été conduits sur des *Panicum* et *Andropogoneae* et des légumineuses *Stylosanthes sp.*

On a expérimenté également la valeur de 13 cultivars de sorgho destinés à être affouragés en vert ou ensilés.

Parallèlement aux essais au champ sur ces espèces et cultivars, leur résistance à la toxicité aluminique a été testée en phytotron.

Ces essais mettent en évidence la nécessité d'un programme génétique sur l'existence et la transmission du caractère «résistance à l'aluminium». Ceci ne faisait pas partie du programme mais on sait l'importance attachée à ce problème dans des pays comme le Brésil.

On n'a pas négligé le problème crucial en agronomie tropicale de la compatibilité des graminées et des légumineuses dans les mélanges prairiaux.

Les essais de fumure minérale ont mis en évidence l'extrême pauvreté organique des terres grises et rouges et la nécessité de restaurer leur fertilité organique par une formule de «ley farming» avant de passer à l'intensification par la fumure minérale.

### ■ Observations fondamentales sur la plante

L'étude du phénomène de toxicité aluminique en milieu parfaitement contrôlé s'impose car l'infertilité des sols acides n'est pas uniquement due à la toxicité aluminique.

Les travaux ont porté sur le riz étudié en phytotron par comparaison de plusieurs cultivars à 3 niveaux de concentration en Al. Ces études ont permis de mettre en évidence que le diagnostic de la sensibilité à l'Al pouvait se faire par observation de la capacité de tallage.

L'infertilité des sols acides du delta peut être liée à la contamination de l'eau des rizières par l'eau de mer. L'effet dépressif causé par le chlorure de sodium s'ajoute à celui de l'aluminium.

Parmi les multiples espèces cultivées ou non qui ont été étudiées au point de vue de leur résistance à l'aluminium, de nombreuses observations ont montré que l'accroissement de la concen-



Figure 2 - Bétail laitier amélioré -  
Race Yellow & Red Sindhi (Delta du Mékong, Vietnam).

tration en Al conduisait d'abord à une stimulation du végétal, stimulation qui se poursuivait jusqu'à un seuil au-delà duquel commençait les phénomènes de toxicité.

Ce seuil est situé à des niveaux très variables et se met très facilement en évidence dans le cas du riz. Il n'en est pas de même pour le sorgho qui a été étudié à ce point de vue.

Cet aspect est particulièrement important au point de vue de l'utilisation des amendements dans les sols acides : si le traitement réduit la concentration en Al et ne remplace pas son effet stimulant, on peut s'exposer à rééditer un échec du chaulage sur les sols acides de régions tropicales.

#### ■ Observations fondamentales sur le sol

Bien qu'un examen très superficiel des sols sulfatés acides conduise à penser que les problèmes essentiels y sont de nature physico-chimique (acidité, toxicité, carences), ce qui a conduit à un manque d'intérêt pour les problèmes physiques, l'évolution des techniques agricoles a imposé l'étude de la physique du sol tant sous l'angle fondamental que sous les aspects appliqués.

Le mouvement de l'eau dans les macropores des sols argileux a été étudié et une observation intéressante est que 82 % des précipitations sur les banquettes sont éliminées par les macropores ou ruissellement.

Le problème le plus difficile dans l'agriculture telle qu'elle est pratiquée dans la région des sols sulfatés acides est évidemment le lessivage des acides produits dans le sol des banquettes. L'efficacité des précipitations est considérablement diminuée par l'in-

filtration à travers les macropores mais ce mode d'écoulement reste le mécanisme essentiel dans le lessivage des banquettes.

## Références

### ■ Elevage laitier

Chung Anh Dung, Le Xuan Cuong, Vuong Ngoc Long and Lecomte Ph., December 1992. Characteristics of dairy cattle housing at small holder farms in Ho Chi Minh City, Institute of Agricultural Science of South Vietnam, STD TS2 0257b, research report 7, 24pp.

Dinh Huynh, Le Ha Chau and Lecomte Ph., December 1992. Evaluation of yield and forage quality of several forage species in sole and mixed pasture at different cuttings, Institute of Agricultural Science of South Vietnam, STD TS2 0257b, research report 2, 7pp.

Le Ha Chau, Dinh Huynh and Lecomte Ph., December 1992. Adaptability of introduced pasture species on grey podzolic soils of the southeast area of South Vietnam, Institute of Agricultural Science of South Vietnam, STD TS2 0257b, research report 1, 15pp.

Lecomte Ph., Sinnaeve G., Dinh Huynh, Vu Van Do, Thong Quanh Minh, décembre 1992. Qualité des fourrages cultivés dans le Delta du Mékong (Vietnam). Mise au point de calibrations pour la prédiction de différents paramètres en spectrométrie infrarouge proche. Station de Haute Belgique, STD TS2 0257b, rapport de recherches, 13pp.

Nguyen Hoai Huong, Dinh Huynh, Phan Bui Ngoc Thap and Lecomte Ph., December 1992. Effects of some additives on quality silages, Institute of Agricultural Science of South Vietnam, STD TS2 0257b, research report 3, 16pp.

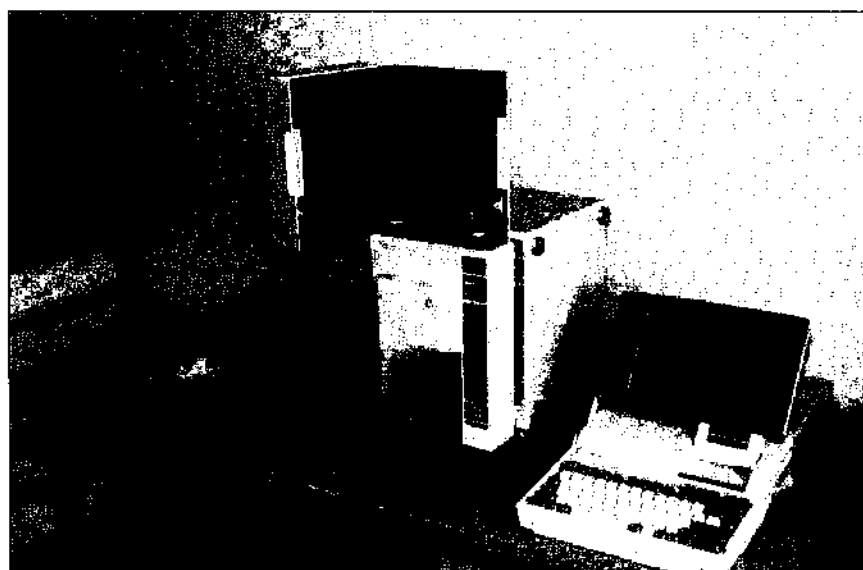


Figure 3 - Dispositif NIRS pour la détermination de la qualité et de la digestibilité des fourrages.

Tong Quang Minh, Le Xuan Cuong, Doan Duc Vue, Pham Ho Hai and Lecomte Ph., December 1992. Results of study on the effects of urea treated rice straw on productivity of dairy cattle and draught buffalo, Institute of Agricultural Science of South Vietnam, STD TS2 0257b, research report 8, 12pp.

Vuong Ngoc Long, Le Xuan Cuong, Dang Phuoc Chung and Lecomte Ph., December 1992. Evaluation of productivity and zootechnical parameters of local breed and different types of dairy crossbreds, Institute of Agricultural Science of South Vietnam, STD TS2 0257b, research report 6, 20pp.

## ■ Observations fondamentales sur la plante

Tang Van Hai, Houben V., Nzok Mbouti C. et Dufey J.E., octobre 1993. Diagnostic précoce de la résistance de cultivars de riz (*Oryza sativa* L.) à la toxicité aluminique. Agronomie (sous presse).

Duong Hoa Xo, décembre 1991. Influence du sodium sur l'absorption N, P, K et la croissance du riz (*Oryza sativa* L.) en milieu acide. Etude des différentes formes de phosphore dans quel-

ques sols acides sulfatés de la région de Ho Chi Minh Ville. Rapport de recherches UCL-Sciences du sol, 57 pp.

Pham Thi Doan, décembre 1992. Test de la résistance aluminique de 14 variétés de sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench. Influence du phosphore sur l'absorption ionique et sur le rendement en matière sèche du sorgho (variété SVR 157) en fonction de l'aluminium. Rapport de recherches UCL-Sciences du sol, 89pp.

Nguyen Duc Thuan, octobre 1993. Chemical evolution of acide sulfate soil solution after flooding as influenced by different types of phosphorus fertilizers and cultivation regimes. Effect of types of phosphorus fertilizers on rice growth and nutrient uptake. Rapport de recherches, UCL-Sciences du sol, 48pp.

## ■ Observations fondamentales sur le sol

Bouma J., van Mensvoort M.E.F. and Le Van Khoa, 1993. Ways and means of modelling acid sulphate soils. In : D.L. Dent and M.E.F. van Mensvoort (eds), Selected Papers of the Ho Chi Minh City Symposium on Acid Sulphate Soils, ILRI Publ. 53, ILRI, Wageningen, 331-340.

Le Van Khoa, 1991. Relationship between some soil physical characteristics and morphology in acid sulphate clays, Mekong Delta, Vietnam. Technical report 5, project VH 10, Department Soil Science and Geology, Wageningen Agric. University, 93pp.

Sterk G., 1993. Leaching of acid from the topsoil of raised beds on acid sulphate soils in the Mekong Delta, Vietnam. In : D.L. Dent and M.E.F. van Mensvoort (eds), Selected Papers of the Ho Chi Minh City Symposium on Acid Sulphate Soils, ILRI Publ. 53, ILRI, Wageningen, 241-246.

Vo Tong Xuan, 1993. Recent advances in integrated land uses on acid sulphate soils. In : D.L. Dent and M.E.F. van Mensvoort (eds), Selected Papers of the Ho Chi Minh City Symposium on Acid Sulphate Soils, ILRI Publ. 53, ILRI, Wageningen, 129-136.

Contract number : TS2-A-285  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE :	<b><i>Improvement in the productivity of crusting soils and depleted sandy soils in areas of Zimbabwe under intensive cropping.</i></b>
Titre :	<i>Amélioration de la productivité des sols encroûtés et des sols sablonneux épuisés dans les régions du Zimbabwe soumises à la culture intensive.</i>
▼ PROJECT LEADER : Chef de projet :	Giovanni A. Ferrari
▼ HOST INSTITUTION : Institution-hôte :	Università di Firenze, Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta.
▼ ADDRESS : Adresse :	P. Le Cascine 15, 50122 Florence, Italy.
▼ TELEPHONE :	+39-55-36 70 37
▼ FAX :	+39-55-33 32 73
▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS : Institutions associées :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- France : INRA-SESCPF, Olivet.</li> <li>- Italy : CNR, Firenze.</li> <li>- Italy : CNR, Pisa.</li> <li>- Italy : Istituto Agronomico per l'Oltremare, Firenze.</li> <li>- Italy : Università di Udine.</li> <li>- Spain : CSIC, Madrid.</li> <li>- Zimbabwe : University of Zimbabwe, Harare.</li> </ul>
▼ KEY WORDS : Mots clés :	soil degradation; soil crusting; soil compaction; organic matter; soil structure; sandy soils; soil management; zimbabwe. <i>dégradation du sol; sol encroûté; compactage du sol; matière organique; structure du sol; sol sablonneux; mise en valeur du sol; zimbabwe.</i>
▼ FINAL REPORT : Rapport final :	166p. English.

# Improvement in the productivity of crusting soils and depleted sandy soils in areas of Zimbabwe under intensive cropping

## Objective of the research

The general purpose of the project was to establish a model of experimental approach to the problems of sustainable soil management and amelioration of physical and chemical characteristics of crusting soils and depleted sandy soils in Zimbabwe.

In particular, for crusting soils, the aim of the research was :

- to investigate the processes responsible for degradation of soil structure;
- to test the effectiveness of different treatments in controlling crust formation;
- to suggest to local farmers suitable soil management, able to promote the conservation of favourable soil physical properties.

For sandy soils research activity was directed :

- to individuate the chemical-physical and chemical processes leading to the rapid loss of soil fertility;
- to investigate the influence on these processes of human activities, such as land clearing and cropping systems;
- to suggest suitable practices to restore and maintain soil fertility.

## Materials and methods

### ■ Crusting soils

Three sites were selected as representative of the different physical and socio-economical environments in which crusting soils occur. In-depth

research was conducted in the Hamilton section of Mazowe Citrus Estate, near Harare. According to the US Soil Taxonomy, the soil was classified as Rhodic Kandistalf. Three couples of trenches were dug for accurate description of soil macrostructure. Five main types of soil structure were recognized. Undisturbed soil samples were collected :

- in each horizon of the three selected soil profiles for a preliminary micromorphological, physical and chemical characterization;
- in the trenches and along the seed row, the traffic interrow and no traffic interrow, of Mazowe field for detailed successive studies.

Micromorphological studies were made on oriented thin sections by petrographic microscopy, image analysis and by scanning electron microscopy in back-scattered electron mode, to measure total porosity, pore shape and size distribution, and for a more detailed analysis of the processes of structure degradation, specifically aimed to detect the effects of traffic compaction.

The mechanisms of crust formation were analysed according to the methods generally adopted in soil studies. The studied properties include : mineralogical composition and elemental composition; particle size distribution and clay dispersibility in water; free and amorphous Iron and Aluminium oxides; total N and C; effective cation exchange capacity, exchangeable cations and base saturation; soil pH and zero point of charges; total and available macro- and micronutrients; total

heavy metals content and their soil sorption capacity; P forms and P sorption capacity; organic matter characterisation by molecular weight distribution and humification index; influence of heavy metals (Cd) on soil respiratory activity; distribution pattern of soil nematodes; pore size distribution by mercury intrusion; water retention and shrinkage properties.

Additionally, some laboratory experiments were undertaken, directly related to soil mechanical properties and crust formation : tensile strength of natural soil aggregates; modulus of rupture; aggregate stability; oedometry; rainfall simulation.

Two different types of field experiments were performed concurrently, to overcome intrinsic disadvantages resulting from each single approach; a series of experiments with rain simulation and one with plots subjected to natural rainfall. In connection with field experiments, the strength of soil crust was measured by different devices : Torvane and three types of hand penetrometer. Penetration resistance profiles were also determined using a Rimik cone penetrometer.

Two cycles of field rain simulation experiments were performed in 1992 and 1993. The portable rainfall simulator was assembled in the field over plots about 1 m in size, surrounded by a 50 cm-wide buffer zone. The following conditions were tested : naturally crusted; simulated tillage (down to 15 cm); simulated tillage but with phosphogypsum spread at the rate of

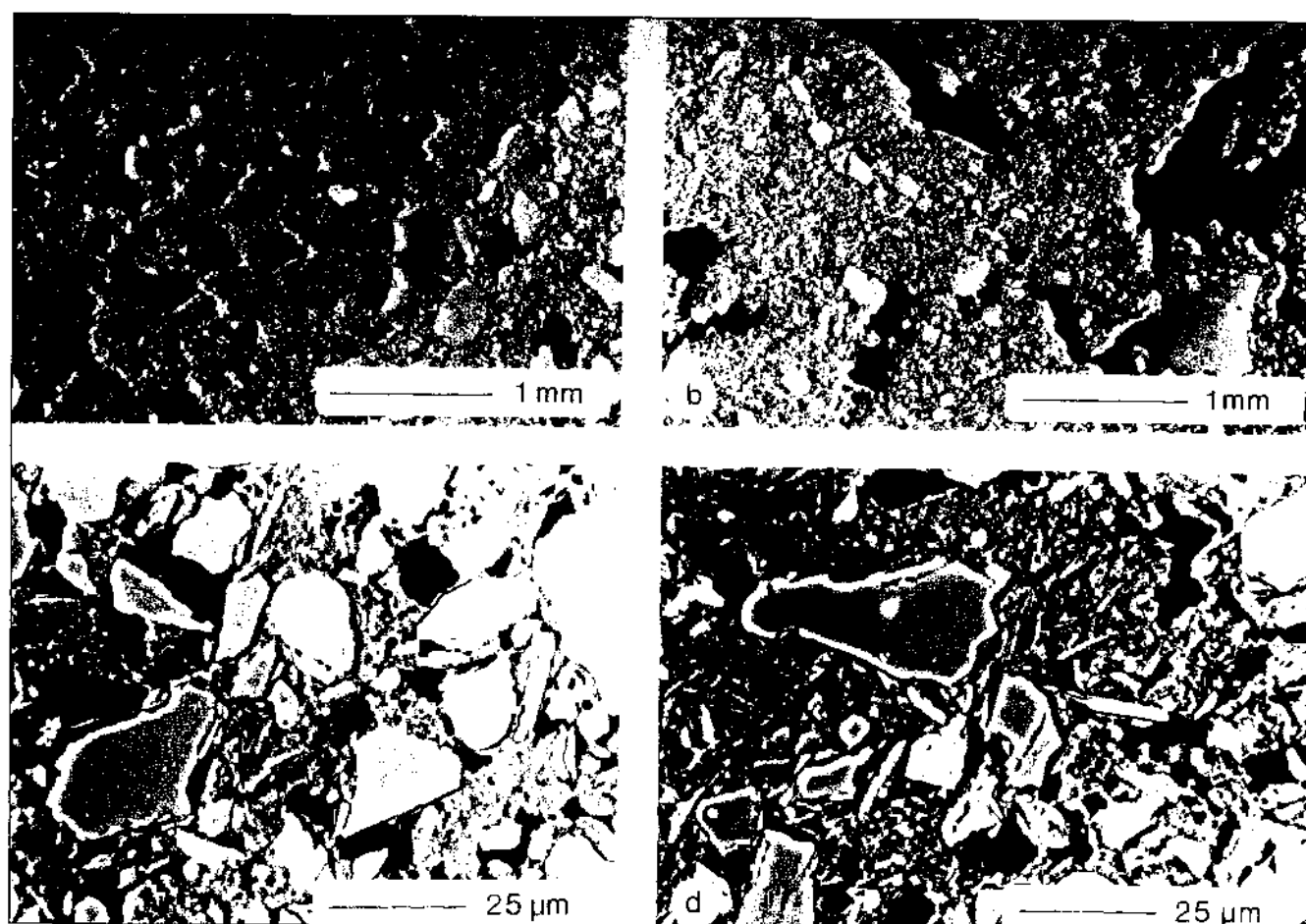


Figure 1 - Backscattered electron images of T1-4 (a, x30), T2-3 (b, x30), T2-6 (c, x960). Pores are shown black, silt and sand particles smooth light grey, clay matrix granular dark grey.

5-t-ha<sup>-1</sup>. Simulated rainstorms of different duration were tested at different time intervals. Runoff and infiltration rate were calculated and dry crust strength and surface roughness were measured.

In natural rainfall experiments, duplicated runoff plots were constructed, of the same size of those used for rainfall simulation experiments, and the efficacy in controlling crust formation of different inorganic conditioners was tested: gypsum (2.5-t-ha<sup>-1</sup>); Wac (basic Al polychlorosulfate - 500 L-ha<sup>-1</sup> and Glotal (Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O - 2.5-t-ha<sup>-1</sup>). For comparison, other plots were prepared from untreated soil (control and mulch covered) and Bt horizon material, placed on the surface to form a 15 cm thick layer. Runoff was collected and measured after each effective rainstorm during the rainy season (November to

March). At the beginning of March mulch was removed from mulched plots and gypsum was applied (5-t-ha<sup>-1</sup>). Shear strength and penetrometer resistance were measured at the end of the dry season.

#### ■ Sandy soils

Three soils were selected in different climatic regions: the Marondera soil (Soil Productivity Research Laboratory Farm), in the region of medium rainfall (750-1000 mm), has a finer texture and a better developed horizonation than the other two. The Masvingo soil (Makoholi Experimental Station) has a lithological and pedological discontinuity to a well developed hydromorphic soil. The last soil, situated in the Mbembesi resettlement area has developed on Kalahari sands and shows a well marked process of clay translocation. The last

two soils are situated in a low rainfall area (450 to 650 mm) subject to periodical droughts.

Sampling was carried out in 1990, 1991 and 1992 in areas under natural vegetation, cleared but not cropped and cropped of Marondera, Masvingo and Mbembesi sites, as well as in some selected treatments of long term field experiments in Grasslands Experimental Station (Marondera) and Makoholi Experimental Station (Masvingo).

On selected soil samples physical and chemical analyses were carried out, for assessing soil fertility and its evolution. Particular attention was paid to the dynamics of soil organic matter. Physical properties, particularly pore shape and size distribution, were also studied in detail.



## Results

### ■ Crusting soils

The results obtained have evidenced how cultivation of the soils examined causes an unfavourable combination of chemical, biological and physical modifications.

The status of organic matter in the cultivated soils has declined in both quantitative and qualitative terms : organic carbon content has fallen well below that of uncultivated soils and the organic matter of cultivated soils is depleted of fractions important for soil aggregation, like carbohydrates and high molecular weight humic acids. From a chemical point of view, a significant decrease in the level of some important elements, such as calcium and magnesium, has occurred, accompanied by a reduction of the CEC, that appears strongly related to organic matter. Cropping and fertilization also induce a strong increase in the amount of semi-permanently absorbed phosphorous that may have a negative influence on physical properties.

The microbial activity is not strongly depressed by cultivation but the nematode population, considered to be a sensitive indicator of the biological status of the soil, has decreased and partly migrated towards deeper horizons.

In the case of the Mazowe site, the physical conditions of the tilled layer are very seriously compromised. The degradation of the structural conditions of the soil is actually involving the whole tilled horizon. Different kinds of degraded structure, like massive areas and very large polygonal blocks, have been observed to occur down to a depth of about 30 cm and to make for a substantial portion of the horizon's volume. This kind of compaction phenomena are clearly responsible for the serious tillage problems complained about by the users. The causes of such compaction and crusting phenomena are many. Cultivated

soils lack effective, stable structural cements like organic matter and iron oxides; and their structural stability is mostly entrusted to clay minerals. Such clay minerals have a low effectiveness in maintaining soil structure because they are of the low-activity type (Kaolinite) and because of the general physico-chemical equilibrium of the colloidal phase; it has been clearly evidenced how, at the surface of cultivated soils, conditions exist that are rather favourable to clay dispersion. Such conditions are a pH level higher than the point of zero charge and a low electrolyte concentration of the soil solution, and are fostered by the depletion of exchangeable bases and by the presence of large amounts of absorbed phosphate that saturate most positive charges on soil colloids.

Structural stability experiments have shown how aggregates are rapidly destroyed by any kind of natural wetting procedure. This instability of structure causes slow water infiltration under heavy rainstorms, often occurring in this environment, and makes for a surface layer that easily gets saturated and is highly vulnerable to the effects of mechanical stress by raindrop impact and mechanised traffic. It appears that the most serious compaction is related to management practices including heavy traffic on wet soil, while field experiments have shown the importance of rain kinetic energy for structural collapse.

Among the possible management actions to overcome such constraints, it was chosen to experiment with some techniques presenting the following requisites :

- to rely on readily available inputs;
- to be susceptible to be experimented in the relatively short time span allowed.

In this framework, ready availability of inputs was considered at the experimental level, without immediate concern for economic factors.

Results from different types of field experimentation substantially concur on a series of points.

The upturning of the soil has a ready positive effect : that, however, appears to decrease with time and tends to level off towards the end of the first rainy season.

Many data have been collected on the effect of gypsum; it appears that gypsum is able to improve the hydrological response of the soil, but this needs qualification, as improvement appeared to be subordinated to the rainfall pattern, being most evident only in relation to short and/or low-intensity rain. Efficiency of gypsum under repeated, severe rainstorms is in doubt. Some unexpected effects on soil mechanical properties have arisen, gypsum causing the development of harder surface crusts; while this does not necessarily indicate negative effects on all soil mechanical properties, it is clearly necessary to check this point more carefully.

The effectiveness of the other kinds of chemical conditioners tested has proved to be no better than that of gypsum, as their effect decreases even faster.

The treatments aimed at protecting the soil from rain impact have given strikingly good results; on the time scale experimented, they have shown the ability to stop surface crust formation and dramatically improve water storage.

### ■ Sandy soils

All the soils examined appear to have a low fertility status even under natural vegetation. In the soils of Masvingo and Mbembesi areas (Bulawayo region) this depletion goes to such extremes as to interfere with the normal trend of humification. As the capability of these soils to retain nutrients is very poor, fertilizers have very little residual effects, or none at all.

Under natural vegetation Marondera soil is fairly well provided with K and P, while it is clearly deficient in secondary nutrients (Ca, Mg and S) and micronutrients. Once cleared and cultivated, a remarkable decrease in relative macro - and micronutrients status can be observed.

The organic matter levels give an indication of the progressive decrease of the original soil fertility. Under natural vegetation, the organic matter content in the top layer was about 1.7 %. This level decreased once the soil had been cleared, and after cultivation, without adding fertilizers, the relative organic matter status was below 50 %. Even the effective cation exchange capacity is very low and decreases after clearing. Results show that organic matter content and ECEC in not cropped-not cleared soil, in cleared soil and in the different treatments follow exactly the same trend. This observation emphasises the close dependency of ECEC on humic substances of this type of soils and the necessity of maintaining a suitable level of organic matter.

Application of manure is the only treatment that leads to a noticeable increase in available nutrients. When results of soil analysis carried out in 1990, 1991 and 1992 are compared, it is observed that manure application has been the most effective treatment to preserve the original level of soil organic matter.

The results of pore size distribution analysis show that total macroporosity was significantly higher in the not cleared-not cropped soil. In the latter the porosity did not show any significant difference between the different treatments.

Masvingo soil shows an even lower chemical fertility than the one in Marondera. This organic matter level is 0.8 % in the not cleared soil. Very low amounts of available and total plant nutrients, strong acid reaction and very poor ECEC are the main features of this soil. In addition, and as

a result of the very poor contents of clay and organic matter, this soil has no possibility to retain added P and the loss by leaching of P applied as fertilizers can be expected. Available P is the only nutrient which shows higher levels in the cultivated plots, mainly in the treatments which have received manure applications. However, P bound to organic ligands is not firmly held and in this soil more than 88 % of the sorbed P can be immediately desorbed.

Although in this site soil analyses carried out in 1990, 1991 and 1992 do not show clear trends with regard to the effect of organic and inorganic fertilizers on the chemical status of the soil, it is clear that cattle manure application has been the best way to increase the amount of available nutrients.

Pore size distribution analysis presents a pattern similar to that found in Marondera. Both soils showed typical single grain structures; fine material and organic matter were so low that a bridge or pellicular structure was very rare, especially in Masvingo soils. Organic matter added with the manure is completely insignificant to promote aggregation and therefore to improve soil porosity.

Chemical fertility of Mbembesi soil under natural vegetation is also very poor. Reaction is strongly acid, organic matter is under 1 % and the effective CEC is very unsatisfactory. In such conditions, plant nutrition problems are considerable. Nitrogen, P, K, Ca and Mg are deficient. Total macronutrient reserves are at minimum levels and micronutrient deficiencies can also be expected. After cultivation, the organic matter level slightly decreases and so does the ECEC. No differences were found between P and K contents under natural vegetation and in the cultivated land. On the contrary, the levels of Mg, Ca and some micronutrients (Mn and Zn) considerably decreased.

In Mbembesi soil the microbial biomass decreased after clearing and cultivation, as expected, but not dramatically (15-20 %). The amount of soil microbial biomass C in the not cleared soil was, however, already very low.

The basal respiration of the soil follows the same trend of microbial biomass indicating that no further stress has been imposed on soil microorganisms by cultivation and that soil microbial biomass simply adapted itself to the lower C input by reducing itself. The flow of mineralization is very high in the not cleared soil. In the cleared soil this amount is reduced by about 50 % and a further decrease is observed in the cropped soil. It seems that the soil progressively loses its ability to restore a quick microbial activity after rewetting, possibly because of the reduced amount of easily degradable organic substrates available to microorganisms. The metabolic quotient of soil microbial biomass remains constant after clearing and cultivation. This means that mineralization is not enhanced and the lower carbon content of the cropped soil is caused by lower organic C inputs.

## Conclusions

### ■ Crusting soils

The investigations conducted have shown that the crusting soils have a very limited potential for structure regeneration; because of the combination of low-activity clays, low organic matter and iron oxides, the principal structuring agent is biological activity. Biological activity however, even if not depressed by cultivation practices, is too slow to allow recovery from compaction phenomena acting every year.

The economical and technical problems for tillage are pushing soil users towards adoption of reduced tillage practices; in the short time observed, such practices appear to give unfavourable results, as compacted volumes are allowed to remain; however,

this is to be expected in the first years of reduced tillage practice and a correct evaluation of the results requires a longer-term experimentation.

The general picture obtained of the fertility status of crusting soils is not an optimistic one; continuation of the present management system, necessarily entailing a permanence of the present trends in the soil system's evolution, appears to be destined to a further decrease in soil productivity and to an increased need of inputs to maintain fertility. In other words, the system appears to be a non-sustainable one.

In spite of the rather unsatisfying results of gypsum treatments, the low cost of this conditioner suggests that a definite answer may only be looked for through full-scale agronomical experimentation, at the medium term level; such experimentation would be necessary both to establish all the technical facts and to evaluate the economics of the problem. As regards the other inorganic conditioners, the economical implications of their potential use are unfavourable, as they are more expensive and less readily available on site than gypsum.

The practical feasibility of mulch treatments is in doubt, on the grounds of problems to be encountered in providing adequate amounts of cheap materials. The effectiveness of the technique, however, suggests that a determined effort to solve practical problems could well be worthwhile. The ability of such treatments to influence other soil properties remains to be tested, however, and it is also necessary to state that the amount of cover provided for in the experiments was quite high. Here, too, a full-scale field trial would be of help, especially to evaluate the amount of cover representing the best compromise between effectiveness and practical feasibility.

The rapid decay of the favourable structural properties of Bt horizon, brought to light, represents a serious

limitation of this treatment as it is clearly not repeatable. Furthermore, the experiments have not yet involved submitting the Bt to management practices, like fertilization and tillage, imposed on the Ap; it is expected that when this is done, effectiveness of the treatment will further decrease.

The general conclusion that can be drawn about management perspectives is that, having understood basic mechanisms and factors of the degradation of the crusting soils, a series of full-scale field trials, protracted over several years, is highly recommendable in order to establish definite parameters for management actions to be taken. This kind of experiment could also take into account certain interventions that could not be tested in the present research, such as changes in the fertilization techniques and, especially, alternative tillage systems.

Large-scale experimentation is also important to give indications on technical and socio-economical sustainability of any change in management to be adopted. The present research has indicated the necessary knowledge framework for establishing such field trials and interpreting their results.

## ■ Sandy soils

In sandy soils the only way to improve soil fertility and maintain quality of the organic fraction is the regular addition of large quantities of cattle or other manure producing livestock.

When dry spells and drought are a recurrent feature of the climate, the amount of organic C reaching the soil is further limited because of the decrease in yields due to water stress, and the soil necessitates substantial manuring to maintain a minimum level of CEC and prevent complete structure degradation.

Suggestions must take into account not only technical aspects, but also local economic and social realities. Most of the solutions normally em-

ployed to improve efficiency and yields of fertilizers in sandy soils are not applicable in the socio-economic situations of resettlement areas and would also probably be of rather limited value under such a severe condition of soil depletion.

The only sustainable farming system in these areas is, from both an environmental and economic point of view, extensive livestock husbandry. Conditions might be improved by introducing drought resistant fodder crops, but selection of locally adapted cattle, or preferably game meat production, would probably give better results.

In resettlement areas the government should encourage the establishment of integrated farming systems with enough livestock to sustain minimum soil productivity. The only alternative would be to provide farmers with a continuous supply of chemical fertilizers, but these lands would hardly be able to repay them or to face irreversible degradation and consequent further poverty of the people living on them.

## Publications

Borselli L., Carnicelli S. and Galligani U., 1994. Field studies on the infiltration capacity of a crusting soil of Zimbabwe. Workshop : «Sustainable management of tropical catchments», Leicester, U.K., January 1994 (in press).

Bruand A., D'Acqui L.P., Nyamugafata P., Darthout R. and Ristori G.G., 1993. Analysis of porosity in a tilled «crusting soil» in Zimbabwe. *Geoderma*, 59, 235-248.

Bruand A. and Cousin I., 1994. Variation of textural porosity of a clay-loam soil during compaction. *Geoderma*, (submitted for publication).

Carnicelli S., Ferrari G.A. and Pagliai M., 1994. Processes of structure degradation in Zimbabwe crusting soils. Proceedings of the 9th International Working Meeting on Soil Micromorphology, 12-17 July 1992, Townsville, Australia, (in press).

D'Acqui L.P., Bruand A. and Pagliai M., 1994. Study of porosity with mercury porosimetry and image analysis on back-scattered electron scanning images (BESI). Application to tilled «crusting soil» in Zimbabwe. 9th International Working Meeting on Soil Micromorphology, 12-17 July 1992, Townsville, Queensland, Australia, (in press)

Le Bissonnais Y., Bruand A., Nyamugafata P. and D'Acqui L.P., 1994. Variability of aggregate stability and surface crusting in Zimbabwe. International Symposium on «Scaling, Crusting, Hardsetting soils : Productivity and conservation», 7-11 February 1994. Brisbane, Australia, (submitted for publication).

Pardo M.T., Almendros G. and Lopez-Fando C., 1994. Effect of increasing rates of cadmium on the respiratory activity of a crusting soil from Zimbabwe. 15th World Congress of Soil Science, 10-16 July 1994. Mexico, (in press).

D'Acqui L.P., Ristori G.G., Nyamugafata P., Pardo M.T., Dodero A. and Sparvoli E., 1994. Studies on crusting in a kaolinitic soil from Zimbabwe and the effect of different conditioners. International Symposium on «Scaling, Crusting, Hardsetting soils : Productivity and

conservation», 7-11 February 1994. Brisbane, Australia, (submitted for publication).

### *Papers in preparation*

---

De Nobili M., Pardo M.T. and Pagliai M., 1994. Degradation of tropical sandy soils following intensive cultivations.

De Nobili M. and Fornasier F., 1994. Effects of cultivation and soil management on chemical and physical fertility of sandy soils in Zimbabwe.

De Nobili M. and Fornasier F., 1994. Microbial biomass and response to rewetting in a sandy soil developed from Kalahari sands.

De Nobili M. and Fornasier F., 1994. Characterization of humic substances in a crusting soil of Zimbabwe.

Pagliai M., Camicelli S. and Ferrari G.A., 1994. Structural changes in cultivated tropical soil under rain simulation.

### *Oral communications*

---

Fornasier F. Problematiche della sostanza organica e fertilità dei suoli in Zimbabwe, Università di Udine, 11 november 1993.

Pagliai M. Soil structure, porosity and water movement in soil, Università di Catania, 10-12 december 1992.

Pagliai M. Soil crusting, Università di Pisa, 15 november 1993.

Pardo M.T. The problem of phosphate sorption in acid soils from Zimbabwe. International course of soil fertility, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid, Spain, May 1991.

Contract number : TS2-A-301  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Study of the dynamics of soil organic matter in the Amazon ecosystem and after deforestation, a basis for efficient agricultural management.***

Titre : *Etude de la dynamique de la matière organique du sol dans l'écosystème amazonien et après déforestation, base d'une gestion agricole efficace.*

▼ PROJECT LEADER : Dr. Carlos C. Cerri  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Centro de Energia Nuclear na Agricultura,  
 Institution-hôte : Universidade de Sao Paulo.

▼ ADDRESS : Avenida Centenario 303, Caixa Postal 96,  
 Adresse : 13.400-970 Piracicaba, Sao Paulo, Brésil.

▼ TELEPHONE : +55-194-33 51 22

▼ FAX : +55-194-22 83 39

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS : - France : Institut Français de Recherche Scientifique  
 Institutions associées : pour le Développement en Coopération, ORSTOM.  
 - Spain : Centro de Ciencias Medioambientales, Madrid.

▼ KEY WORDS : brazil; amazon basin; organic matter; humification; mineralisation;  
 organic matter fractions; litter composition; microbial biomass;  
 nutrients dynamics; soil database; pastures; perennial crops.  
 Mots clés : *brésil; bassin amazonien; matière organique; humification; minéralisation; fraction de la matière organique; composition de la litière; biomasse microbienne; dynamique des nutriments; base de données des sols; pâturage; culture pérenne.*

▼ FINAL REPORT : 130p. English.  
 Rapport final :

# Study of the dynamics of soil organic matter in the Amazon ecosystem and after deforestation, a basis for efficient agricultural management

## Objectives

The overall objective of this research was to determine the impact of agricultural use of deforested tropical soil on the changes in content and quality of soil organic matter and selected nutrients in the Brazilian Amazon. Considering the main proposal of this work and the large region studied, specific objectives were established to develop the present study, as follows :

- to identify representative locations under native forest in the three main regions of the Amazon basin (Central, Eastern and Southwestern) that will be used as references;
- to quantify potential nutrient production through the study of the dynamics of litter and soil organic matter under native forest, in the reference locations;
- to recognize the possible *initial effects* of the slash and burn technique and pasture installation on the contents and quality of soil organic matter and nutrients;
- to follow-up the *long term effects* of pastures and other land uses on the contents and quality of soil organic matter and nutrients, in connection with major soil physical and microbiological properties;
- to evaluate the spatial variability of the changes measured in selected locations, using a geostatistical approach;
- to propose a general framework (through the mapping of soil organic matter contents) for the comparison between selected locations, and to correlate the observed variations with differences in local factors, especially climate and parent rock.



Figure 1 - Landsat/TM color composition showing pastures and forest areas at Nova Vida Farming.

## Material and methods

The present study was organized in two phases :

- in the natural ecosystem (Amazon primary forest); and
- in systems cultivated after deforestation (perennial crops and pastures).

The activities were localized in selected areas of Central Amazon (Manaus region), Eastern Amazon (Capitao Poço and Paragominas districts) and Southwestern (Ouro Preto d'Oeste and Ariquemes districts). The choice of these areas was based on the knowledge of differences in physical aspects of the region such as soil diversity, climate, land-use and logistical facilities. Soil analyses in each studied site consisted of physical analyses (bulk density and particle size fraction and microscopic studies); chemical analyses (soil pH, exchange-



Figure 2 - The Madeira river in Porto Velho-Rondônia.



Figure 3 - Timber exploration in Ouro Preto d'Oeste.

able cations and exchangeable acidity). Nutrients dynamics were studied in the laboratory with electroultrafiltration (EUF) technique and in the field with tension free lysimeters. The humus stability was determined by crossing  $\text{CO}_2$  release with incubation and oxid hydrolysis of soil humus. Organic balance was based on C and N elemental analyses, and stable isotope techniques, especially  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio and occasionally  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Biological activity was determined by microbial biomass analyses. Previous data from the RADAMBRASIL Pro-

ject for the entire Brazilian Amazon basin were computed and base wide C and N stocks were calculated for the entire Brazilian Amazon Basin.

## Results

### ■ Central Amazon Region

Carbon-13 measurements showed that 1 year after pasture establishment, C originating from pasture ( $\text{C}_p$ ) already represented 5 % of C in the 0-0.20m layer, but was mainly present in the surface layer. After 2 years,  $\text{C}_p$  repre-

sented 20 % of C in the 0-0.20m soil layer, but had increased faster in the surface than in the deeper layers. At the same time, C of forest soil origin ( $\text{C}_f$ ) had decreased strongly, especially in the 0.10-0.20m soil layer. After 8 years,  $\text{C}_p$  represented 47,7 % of C in the whole 0-0.20m layer, but had increased more slowly in depth than in the surface layers. Under natural forest, the C/N ratio decreased with depth from 15-18 to 11-12. Nitrogen was mainly accumulated in the 0.03-0.10m and 0.10-0.20m layers, and to a larger extent more in MEF than in MFF, as in the case of C. Although C/N ratio decreased in the MFB soil and recovered after 1 year in the MFP1 soil, the N content only slightly changed in the 0-0.20m layer of both soil areas. In MEP2 soil, a strong decrease in the N content was noticed, specially in the 0.10-0.20m layer, when compared with MEF soil. However, the N content was restored and even showed a slight increase after 8 years under pasture. After burning, a reduction in the carbon content was observed in the humic acids which gradually recovered with pasture planting, reaching levels higher than the C content under natural forest after 9 years. This effect is accompanied by a reduction of N in humic molecules which makes the C/N ratio increase. Results also evidenced the drastic effect of deforestation on soil microbial biomass-C and N even after 6 months of grass cultivation. However, after 14 months there was a reasonable recovery of microbial biomass. The dynamics of K were appreciably affected by forest burning and pasture installation. Burning carried out after deforestation caused a clear increase in K which affects both exchangeable K (EUF-K 20°C) and reserve K (EUF-K 80°C), especially in this soil where clay content (kaolinite type) is very high. The highest K values are found in the surface horizon due to the burning effect and recycling of this element through animal urine and faeces. Quantities of EUF extracted P from these soils are very low, both at 20°C and 80°C, which is why significant differences between the pastures sur-

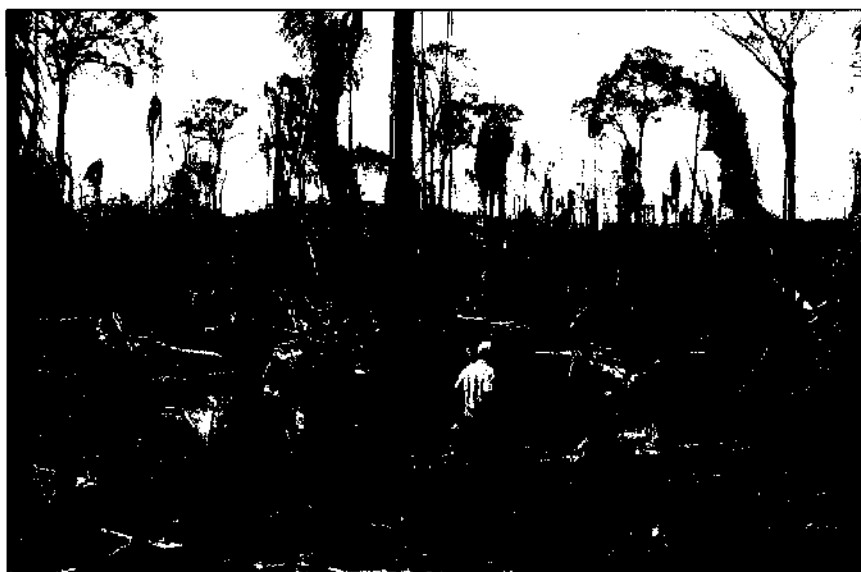


Figure 4 - Recently burned forest.

veyed do not appear. The practice of burning has some positive effects on the Ca and Mg content (8.9 mg Ca/100 g in the forest, 18.4 in the 3-year and 15.8 in the 9-years pasture) which proves that this effect is maintained with good pasture management. The seasonal studies confirmed that, for most of the ions considered, higher amounts were leached at 0.20m under native forest than under burned sites. However, the relative coincidence between cylinders and plates after one year resulted from their contrasting seasonal behaviour : during the first humid period, a higher mobility of the ions was observed in the cylinders under burned forest than under native forest, whereas the opposite occurred with the plate lysimeters. During the dry season and the second humid period, the tendency was reversed, and the highest mobility of most of the ions was observed in the plates under the burned forest.

#### ■ Eastern Amazon Region

The distribution of C and N in the whole soil profiles under native forest (CPF), rubber tree + cocoa plantation (CPH), and *Pennisetum* pasture (CPP10) were compared. There was a maximal accumulation of C and N in the surface layers decreasing rapidly towards the deeper layers. The C content was similar in the three soils, although slightly higher in the surface layer of CPH (26.4 mg.g<sup>-1</sup>) than of CPF and CPP10 (20.9 mg.g<sup>-1</sup>). After 10 years, the presence of C originating from pasture (Cp) was detected down to a depth of about 0.40m, with a predominant input in the 0-0.20m layer. In the upper 0.10m layer Cp ranged between 8.4 and 9.5 t.ha<sup>-1</sup>, which represented from 46 to 52 % of total C in this layer. When compared to a forest soil CPF, the estimated value range of Cf losses in the whole 0-0.20m layer was 12.9-14.3 t.ha<sup>-1</sup>, that is 41-46 % in 10 years. It reached 9.5-10.6 t.ha<sup>-1</sup> (47-55 %) in the upper 0-0.10m layer, and did not exceed 3.4-3.7 t.ha<sup>-1</sup> (28-30 %) in the 0.10-0.20m layer. The humic acids of soils under cocoa cultivation are those

which display the greatest intensity of vibration bands indicating the nitrogenous group. The pyrolytic ratios used as humification indices show that mineralization generally diminishes in the different systems in comparison with the original forest (increase in the furfural/pyrrole ratio) and that humification increases with the benzene/toluene ratio and diminishes with the pyrrole/phenol one. The results obtained demonstrated a dependence of the microbial population not only on the organic matter availability, but also on soil structure, which is responsible for oxygenation and water retention. In the burned area, despite the fertilizing effect of the ashes, the microbial biomass was decreased by 87 % in the upper soil layer and could be attributed not only to microbial death by heat but also to exposure of the bare soil to weather influences. Crop introduction, studied in the second site, could restore organic matter to the soil. Annual, perennial and 10-year-old pasture crops provided indices of 175, 283 and 472 gC.g<sup>-1</sup> soil respectively. Younger pasture provided a better environment for microbial biomass-C development than the forest site, with a higher representation in total soil organic matter stock. The microbial biomass-N was higher in the forest than at all pasture sites, indicating the impor-

tance of this soil organic matter compartment in nutrient cycling. Higher Ca and Mg levels were observed in cultivated soils as a consequence of liming. The forest from Fazenda Bosque displayed high K levels in the surface horizon which were maintained and even increased in the 5-year-old pasture but reduced in those which were 10 and 15 years old. An appreciably high N level (EUF-N 16.08 mg.100g<sup>-1</sup>) was detected with a NO<sub>3</sub>/N<sub>org</sub> ratio of approximately 1/1, but pasture creation caused a drop in N levels mainly affecting the NO<sub>3</sub>-fraction.

#### ■ Southwestern Amazon Region

Pasture soils had slightly higher C and N contents, and the C/N ratio was close to 10, with no difference observed between the forest and pasture soils. Modification of the natural forest system showed an enrichment of the humic acids in the C content, whilst the N content diminishes, as can be observed in the data relating to the elemental analysis. C/N ratios were considerably increased due to the incorporation of C into humic molecules. In soils from the Benjamin farm, after the first week, no difference was observed between the mineralization rates of C under forest and pasture. The amount of CO<sub>2</sub>-C released after



Figure 5 - Four year old pasture at Nova Vida Farming (front), forest control site (behind).



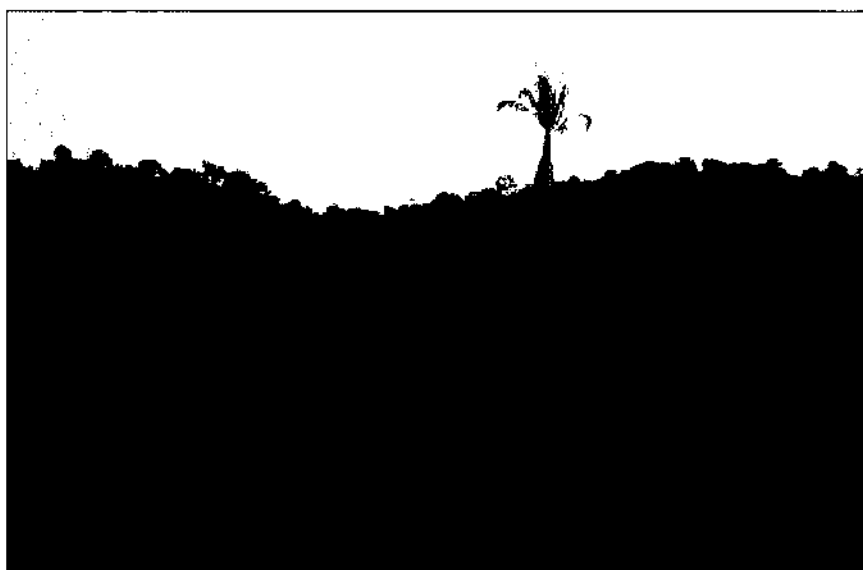


Figure 6 - Twenty year old pasture (LRP20) in Ouro Preto d'Oeste.

45 days reached  $27.2 \text{ mg.g}^{-1}$  and  $26.5 \text{ mg.g}^{-1}$  respectively. In soils of the Nova Vida farm, after the first week, the mineralization of C was about 1.2 times higher under the forest than under pasture. Phosphorous levels in the forest are higher than in some of the other sites surveyed (EUF-P  $20^{\circ}\text{C}$  + EUF-P  $80^{\circ}\text{C}$  =  $0.31 \text{ mg P.100g}^{-1}$ ), as befits the higher pH of the soil and its higher Ca content. The 8-year pasture shows P values similar to that of the forest. The 20-year-old pasture displays a clear increase, probably due

to good pasture management practice combined with the fact that soil conditions are more favourable. Most of the K (approximately 80 %) is found in easily available form, as is usual with this type of soil. The K level drops slightly in the 8-year-old pasture but in the 20-year-old, an increase is detected due to the presence of livestock whose excrement constitutes an important K contribution while Ca content slightly increases as the result of burning. The forest N level is higher

than in pastures where the reduction is high, mainly affecting the  $\text{NO}_3$ - fraction.

### Conclusions and additional comments

The studies carried out on all regions indicate that no generalization can be drawn regarding the rate of recovery of the SOM content and dynamics of nutrients following clear cutting and pasture or crop installation. This rate depends on several factors, such as the geological substratum, the local climate and type of pasture or crop management.

In all the situations studied, changes in the natural ecosystem not only induced a short-term decrease in SOM content, but also a change in the quality of organic constituents. The effects of deforestation and burning on the quality of SOM differ as a function of the depth of the studied layer, probably because they were exposed to different temperatures.

Total C amount in the first meter of soil under tropical forest are related to differences in local climate, especially a longer duration of the dry season, that contribute to a better decomposition and incorporation of litter-derived humus to mineral colloids.

Soil C content and its distribution were clearly modified under crops and pasture. The main decrease in soil C occurred during the second year following burning, and varied according to the region and type of local management. The initial C content was frequently recovered; it was sometimes surpassed in adequately managed areas and in case of pasture degradation was not recovered at all.

Soil microbial biomass decreased after clear cutting and burning, then increased again with organic C increase. However, in all pasture soils, the biomass was always lower than or at least equal to that of the forest soils.



Figure 7 - Twenty year old pasture (Nova Vida farming).

Deforestation and burning always cause a rise in soil pH through ash accumulation and usually have a positive effect on K and Ca contents and very moderate effect on P. This initial amelioration of soil fertility after burning makes possible the establishment of perennial or annual crops and pastures.

No satisfactory solution can be found for agricultural practices in the humid tropics, if management strategies do not pay attention to fertilization practices, with specific consideration for each geographic region and soil type.

Pasture cultivated and kept under good management conditions, particularly by controlling secondary vegetation development, represents a viable alternative, provided it supports livestock or is accompanied by moderate NPK

fertilization or at least P together with liming.

### *Selected publications*

---

Andreux F., Cerri C.C., Eduardo B. de P. and Choné T., 1990. Humus contents and transformations in natural and cultivated soils. *The Science of the Total Environment*, 1990, 249-265.

Andreux F., Dutarte P., Guillet B., Choné T. and Desjardins T. The status of soil organic matter in fragile ecosystems. In: N. Senesi (Ed.) 6th Int. Meet., International Humic Substances Society, Monopoli, University of Bari, Italy, Sept. 1992. Elsevier (in press).

Cerri C.C., Volkoff B. and Andreux F., 1991. Nature and behaviour of organic matter in soils under natural forest and after deforestation, burning and cultivation near Manaus. *Forest Ecol. Manag.*, 38, 247-257.

Cerri C.C. and Moraes J.F.L.. Organic carbon content in soils of Amazon basin. In: Paleoclimatic changes and carbon cycle. *Geoquímica Ambiental*, 1, Niteroi R.J., 1992, 81-86.

Choné T., Andreux F., Correa J.C., Volkoff B. and Cerri C.C., 1991. Changes in organic mat-

ter in an Oxisol from the Central Amazonian forest during eight years as pasture, determined by  $^{13}\text{C}$  isotopic composition. In: *Proc. 8th ISEB "Diversity of Environmental Biogeochemistry"*, (J. Berthelin ed.), Elsevier, Amsterdam, 395-405.

Desjardins T., Volkoff B., Andreux F. and Cerri C.C., 1991. Distribution du carbone total et de l'isotope  $^{13}\text{C}$  dans des sols ferrallitiques du Brésil. *Science du Sol*, 29(3), 175-187.

Diez J.A., Polo A, Cerri C.C. and Andreux F., 1991. Efectos comparativos en cultivos intensivos sobre nutrientes en oxisoles desforestados. *Turrialba, Rev. Interam. de Agric.*, 41(3), 150-159.

Luizao R.C.C., Bonde T. and Rosswall T., 1992. Seasonal variation of soil microbial biomass. The effects of clear felling a tropical rainforest and establishment of pasture in the Central Amazon. *Soil Biol. Biochem.*, 24(8), 805-813.

Martins P.F.S., Cerri C.C., Volkoff B., Andreux F. and Chauvel A., 1991. Consequences of clearing and tillage on an Amazonian natural ecosystem soil. *Forest Ecol. Manag.*, 38, 273-283.

Contract number : **TS2-A-324**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Soil erosion and river sedimentation in Swaziland.***

Titre : *Erosion des sols et sédimentation des rivières au Swaziland.*

▼ PROJECT LEADER:  
 Chef de projet : Prof. Dr. Hezekiel M. Mushala (Thomas Scholten;  
 Peter Felix-Henningsen; Roy P.C. Morgan; R. Jane Rickson)

▼ HOST INSTITUTION :  
 Institution-hôte : University of Swaziland.

▼ ADDRESS :  
 Adresse : Private Bag 4,  
 Kwaluseni, Swaziland.

▼ TELEPHONE :  
 +268-840 11  
 +268-851 08

▼ FAX :  
 +268-852 76 - Tx : 2087 WD

▼ ASSOCIATED  
 INSTITUTIONS :  
 Institutions associées : - Deutschland : Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
 Institut für Geographie, Abteilung für Landschaftsökologie.  
 - U.K. : Silsoe College, Cranfield University (formerly Cranfield Institute  
 of Technology, Silsoe College).

▼ KEY WORDS :  
 Mots clés : soil erosion survey; land classification; soil and saprolite properties;  
 hydraulic conductivity; infiltration; erodibility; rainfall simulation; land  
 use systems; socio-economic survey; swaziland.  
*enquête sur l'érosion des sols; classification des terres; propriété des  
 sols et des saprolites; conductivité hydraulique; infiltration; propension  
 à l'érosion; pluie artificielle; système d'utilisation des terres; enquête  
 socio-économique; swaziland.*

▼ FINAL REPORT :  
 Rapport final : 138p. English.

# Soil erosion and river sedimentation in Swaziland

## Objectives of the research

To carry out an erosion risk assessment, including a detailed erosion survey, a detailed survey of the physical, chemical and mineralogical characteristics of soils and saprolites, and a socio-economic survey of the farmers in proximity of the study sites. On this basis to recommend long-term preventive and remedial measures of soil conservation.

## Materials and methods

After a reconnaissance survey of the study areas, four representative sites were identified for detailed soil and saprolite investigations. On each site the soils were described and mapped along a catena and samples collected for laboratory analyses. Field measurements of infiltration capacity, saturated and unsaturated hydraulic conductivity and shear strength were carried out concurrently. The results were used to evaluate the erodibility of the soils based on the soil hydrological properties, texture, organic carbon content, aggregate and structure stability including permeability. In addition, the effect of soil genesis and land use on microstructure, clay mineralogy and base and aluminium saturation were studied with emphasis on their relation to the soil's susceptibility to erosion.

The erosion survey comprised four phases :

- detailed erosion mapping using stereoscopic interpretation of aerial photographs for 1972 and 1990 to produce 1:50,000 scale maps of erosion features;

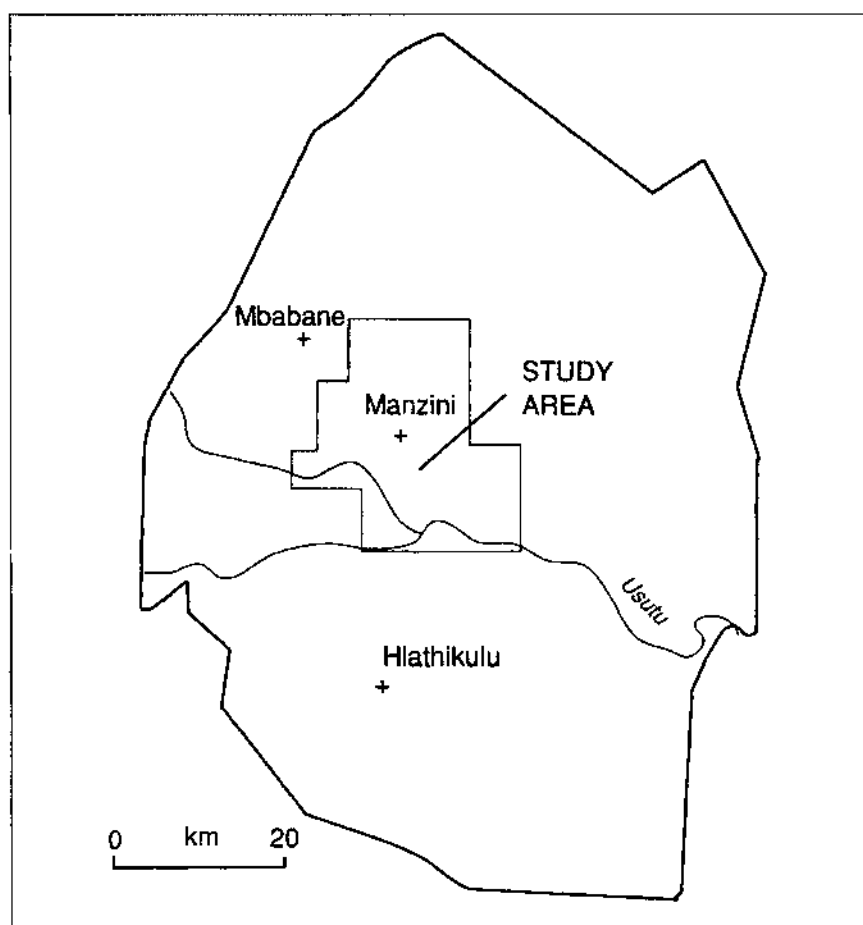


Figure 1 - Location of the study area for the erosion survey.

- generalisation of the information shown on the erosion feature maps to produce maps of erosion severity;
- comparison of erosion severity for the two dates;
- an analysis of the relationship between erosion severity classes and land systems.

Further erosion analyses were undertaken by investigating relationships between erosion and land facets. The aim was to ascertain whether the erosion on each facet could be evaluated using a factorial scoring system and the USLE and SLEMSA models. Additional analyses were undertaken to establish the factors affecting the

changes in erosion severity classes as identified by the erosion survey.

A rainfall simulation experiment was also conducted in order to understand how the hydrological and geomorphological behaviour of the soil changes as vegetation cover declines in response to grazing.

In between these field and laboratory experiments, a socio-economic survey was conducted to establish the relationship, if any, between the socio-economic conditions of the land users and the occurrence of soil erosion in the study area.

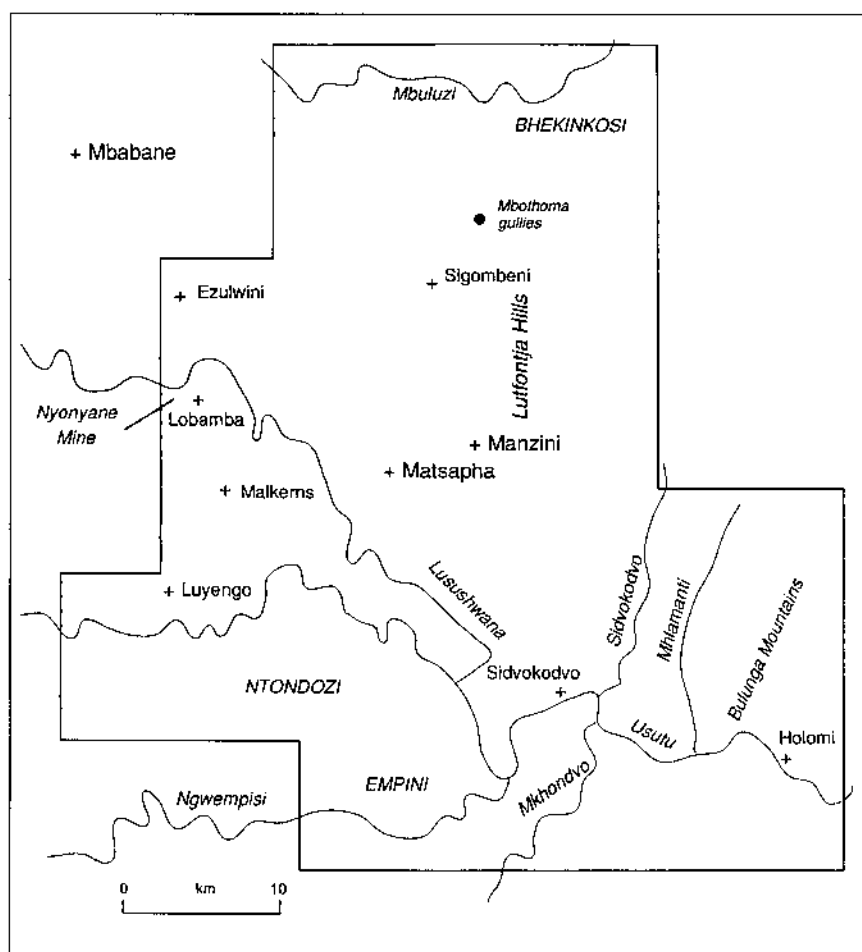


Figure 2 - Details of the study area for the erosion survey.

## Results

### ■ Results of the soil and saprolite analyses:

#### ■ Soil properties

Very low to low CEC (2 - 15 cmol<sub>c</sub>/kg); pH values (KCI) of 3.5 - 4.5 for the topsoil i.e. high acidic conditions, high aluminium saturation and low base saturation; high clay contents (25 - 35 %) at summit and backslope positions, 40 - 55 % at midslope positions and 60 - 75 % at footslope positions, depending on the type of land use and erosion features; clay minerals predominantly consist of kaolinite and small amounts of gibbsite; and medium to high shear strength values (0.5 - 1.2 kg/cm<sup>2</sup>).

#### Soil structure stability

Subangular to angular blocky structure, partly columnar in the Bw

horizons. Mean aggregate size (10 - 50 mm); high structure stability; clay mineralogy shows that actual structure development due to swelling and shrinking is almost slightly given; and high shear strength values are indicative of the high structure stability.

#### Infiltration

Drainage conditions are generally moderate to moderately rapid in non-eroded areas (2 - 10 cm/hr); in over-grazed areas (vegetation cover < 50 %) - areas of sheet erosion, pathways and cattle tracks-infiltration rates below 0.5 cm/hr; values increase to 12 - 15 cm/hr on cultivated land.

#### ■ Saprolite properties

Low CEC (values between 6 - 10 cmol<sub>c</sub>/kg); pH values (KCI) of 4.5 - 5.6 increase with depth; low clay contents (5 - 10 %), mainly sand and silt (each fraction 20 - 50 %), depending on parent material; no organic

carbon; clay minerals predominantly consist of kaolinite, and increase with depth, smectite; high pore volume; and low to medium shear strength values (0.2 - 0.6 kg/cm<sup>2</sup>).

#### Saprolite structure stability

Original rock structure still present-friable to very friable; poor structure and low structure stability.

#### Infiltration

Drainage conditions moderately rapid; increasing infiltration rates with depth (5 - 10 cm/hr - upper horizon - 25 - 40 cm/hr lowest horizon).

### ■ Erosion survey

#### ■ Erosion severity

The situation in 1972 was such that only 6.9 % of the study areas was in the high erosion class, 21.1 % was in the moderate class; 33.6 % in the low class and 38.4 % had no observable erosion. By 1990 some 13.6 % of the study area was in the high erosion class, 26.1 % was in the moderate class, 28.2 % was in the low class, while 31.5 % of the area showed no observable erosion. It is obvious that erosion had become more severe between the two dates. Most of the severely eroded land is found within the Manzini, Jabuleni and Lobamba Land Systems, although the Chibidze Land System is also badly affected.

The relationship between erosion severity and land facets was difficult to establish because the number of study sites was too small. The predictions of mean annual soil loss for 1972 made by the USLE are between five and ten times higher than those made by SLEMSA.

(USLE  $\bar{x}$  = 1314 t/ha, s.d. = 1862 t/ha; min. 21 t/ha - max. 7103 t/ha. SLEMSA  $\bar{x}$  = 193 t/ha, s.d. 309 t/ha; min. 2 t/ha - max. 1419 t/ha).

The factors considered as affecting the changes in the erosion severity classes included changes in vegetation and land use, changes in path and/or settlement density and changes in land management practices (including soil conservation). The relationship be-

tween these factors and the erosion status cannot be explained in terms of "cause and effect". The same factor can be associated with both an increase and decrease in erosion severity over time.

#### ■ Rainfall simulation

The rainfall simulation exercise established the following relationships at the  $p = 0.05$  significance level:

- The measured soil loss ( $A$ ; g) from each simulated storm was significantly and linearly correlated with the storm runoff ( $Q$  tot; l).

The relationship was expressed by:

$$A = 271.5 Q_{\text{tot}} - 6197$$

$$n = 8, R^2 = 0.8105$$

- Total storm was significantly and linearly related to the infiltration capacity ( $fc$ ) of the soil:

$$Q_{\text{tot}} = 57.2985 - 0.8126fc$$

$$n = 8, R^2 = 0.7409$$

- There was a significant relationship between discharge ( $Q$ ; l/min) and the sediment concentration ( $SC$ ; g/l) in the runoff over the whole range of cover conditions:

$$SC = 3.378 + 0.2373Q$$

$$n = 37, R^2 = 0.1302$$

- Infiltration capacity increased significantly with percentage vegetation cover ( $COV$ ) in the following relationship:

$$fc = 7.136 + 0.4191 COV$$

$$n = 8, R^2 = 0.5773.$$

#### ■ Socio-economic survey:

The socio-economic survey indicated that the problem of soil erosion is well known to the farmers, and is mainly attributable to land tenure arrange-

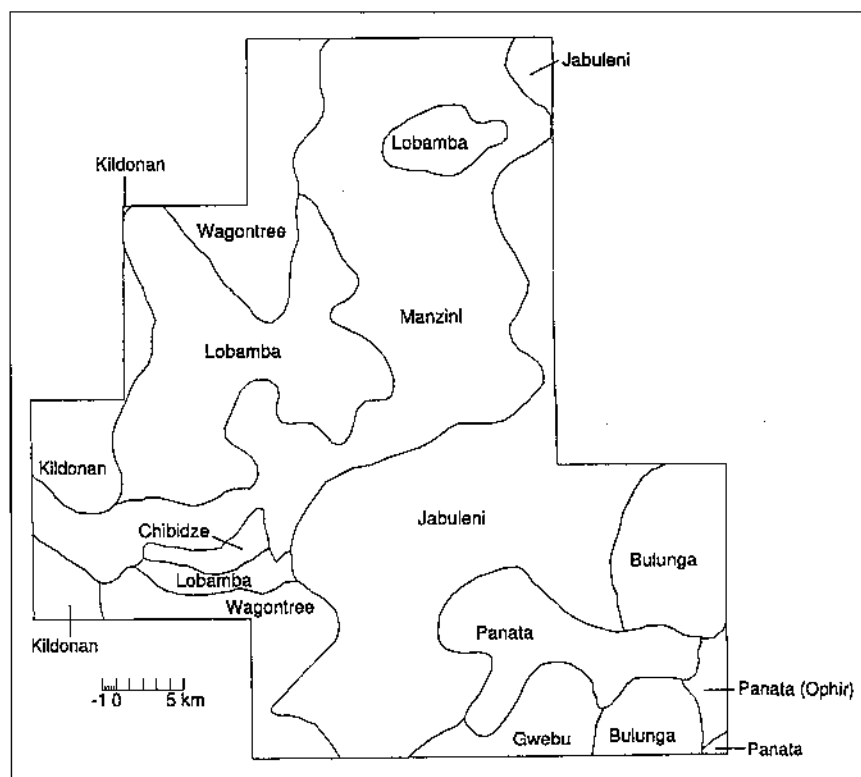


Figure 3 - Land systems of the study area (after Murdoch, Webster and Lawrance, 1971).

ments. Some of the feasible erosion control measures cannot be undertaken without a major restructuring of land tenure in the country. The local leadership needs to be sensitized to involve land users in the planning and implementation of programmes.

### Conclusions

Some of the results are not conclusive and there is room for further research. For example, although soil erosion has worsened over the years, further research is required to determine the

extent to which land use and management contribute to the problem. At the same time further investigations are required to ascertain the hydrological conditions of the soils and saprolites. Long term measurements to ameliorate the soil erosion problem would include a restructuring of the land tenure system, participation of land users in the planning and implementation of sustainable erosion control measures, and capacity building within the local leadership to evaluate the problem and effect measures suited to the local environment.

CONSERVATION  
ET MISE EN VALEUR DU MILIEU

CONSERVATION  
AND BETTER USE OF THE ENVIRONMENT

EVALUATION  
DES RESSOURCES

---

RESOURCES  
APPRAISAL

Contract number :  
 Numéro de contrat :

**TS2-A-024**

- |   |   |
|---|---|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Geo-ecological maps within agricultural development projects in the mountain areas of Northern Thailand.</i></b>  |
| Titre :   | <i>Cartes géo-écologiques dans le contexte des projets de développement agricole dans les zones montagneuses du Nord de la Thaïlande.</i>   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | Norbert Stein   |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Johann Wolfgang Goethe-Universität,<br>Institut für Physische Geographie.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Senckenberganlage 36,<br>6000 Frankfurt/Main, Deutschland.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +49-69-798 38 21  |
| ▼ FAX :   | +49-69-798 83 82  |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | - Thailand : Chiangmai University, Department of Geography.<br>- Netherlands : International Institute for Aerospace Survey and Earth Sciences (ITC).   |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | mountain systems; national park; gis (ILWIS); landuse planning; map production; thailand.<br><i>système montagneux; parc national; sig (ILWIS); aménagement du territoire; production de cartes; thaïlande.</i> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 73p. English.   |



- 238 -

(WSC) by Wooldridge was a widely used operational vehicle in this conjunction. The research team intensively tested the frequently used WSC-regression equation (based on the parameters : slope, landform, elevation, soil, geology, forest cover) and found that there are remarkable discrepancies between the statistical significance of the variables (especially slope and elevation) and the real situation in Doi Inthanon National Park. Maps generated by the research team on the basis of the WSC-grid size method needed manual subjective adaptation in order to represent satisfactorily the heterogeneous terrain.

The landuse planning model (see figure) allowed a number of steps easily performed by the GIS-technology of ILWIS. The clear arrangement between the environmental and economic potential with concentration on real "key factors" within each domain resulted in the production of the corresponding maps e.g. maps of elevation, slope steepness, forest cover, distance from drainage, distance from infrastructure, distance from villages. These maps showing the environmental and economic potential represented the basis for map manipulations which made it possible to arrive at a delineation of suitable areas for further development. These areas identified with a high potential for further development account for nearly 22 percent of the national park area. The majority of the villages is situated in areas suitable for agricultural landuse, and these areas can be developed further to meet the demands of the growing population.

However, a careful examination of the location of the villages shows that at least two villages are situated in an area with many environmental limitations. Further development for these two villages should be directed towards possible resettlement within the park in a more suitable environment.

The potential landuse map generated by a number of map manipulations was compared with the actual WSC-

based landuse map used by the Park authorities for their planning purposes. This comparison revealed that in some areas with high agricultural potential, reforestations were planned and no area was available for agricultural use. With a view to the urgent need for sufficient land to support the population, the recommendation was revised to allocate the suitable land to the villages concerned and to upgrade the national park in other areas which could be defined as environmentally and economically unsuitable for agriculture. The comparison of the potential and actual land use map clearly

confirms that there is an uneven balance between the present landuse requirements, which is one of the main reasons for the current serious problems within the park.

The strength of the information provided is that it shows clearly the suitable areas, thus limiting the necessary further research and data collection to only less than 25% of the original area. The knowledge of these suitable areas allows comparatively fast data collection, and an appropriate landuse planning can be conducted. This holds particularly for areas in

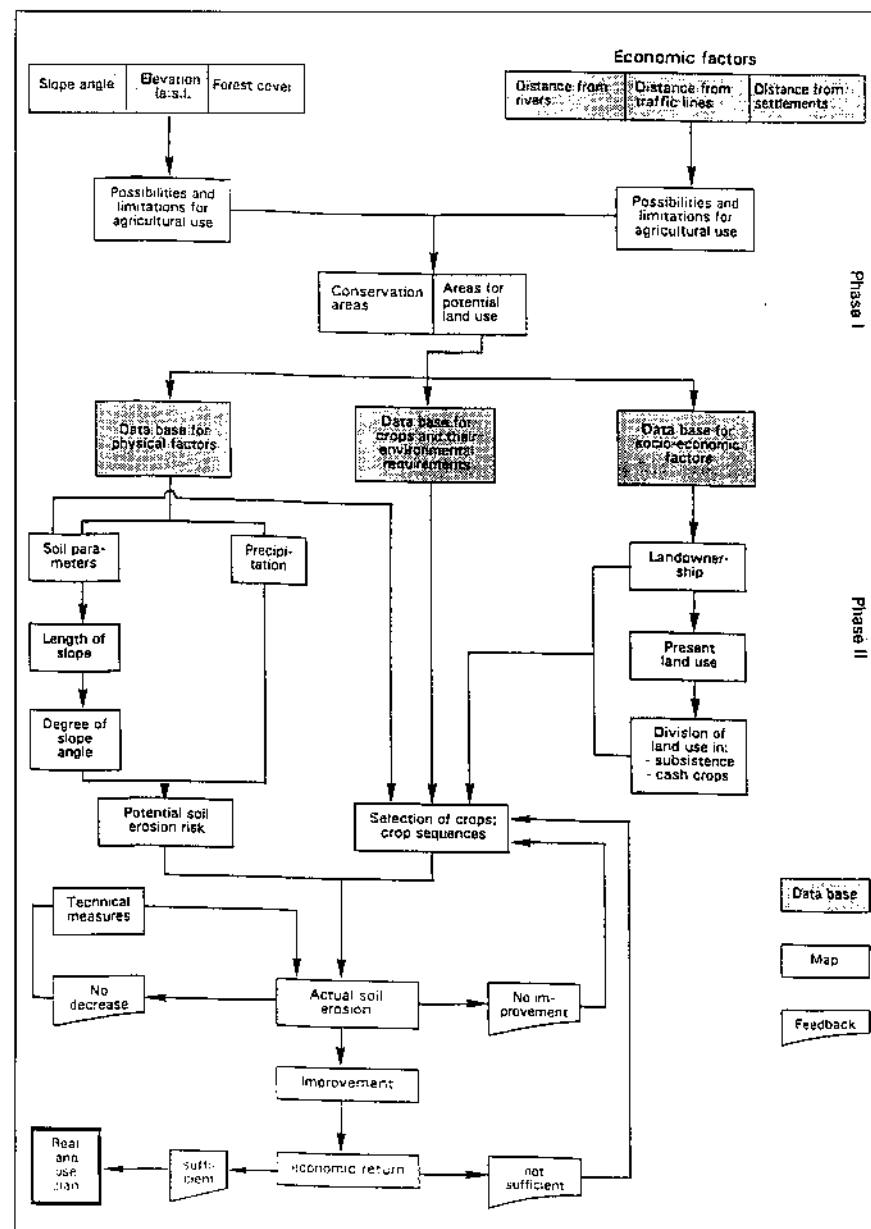


Figure 2 - Landuse planning model.

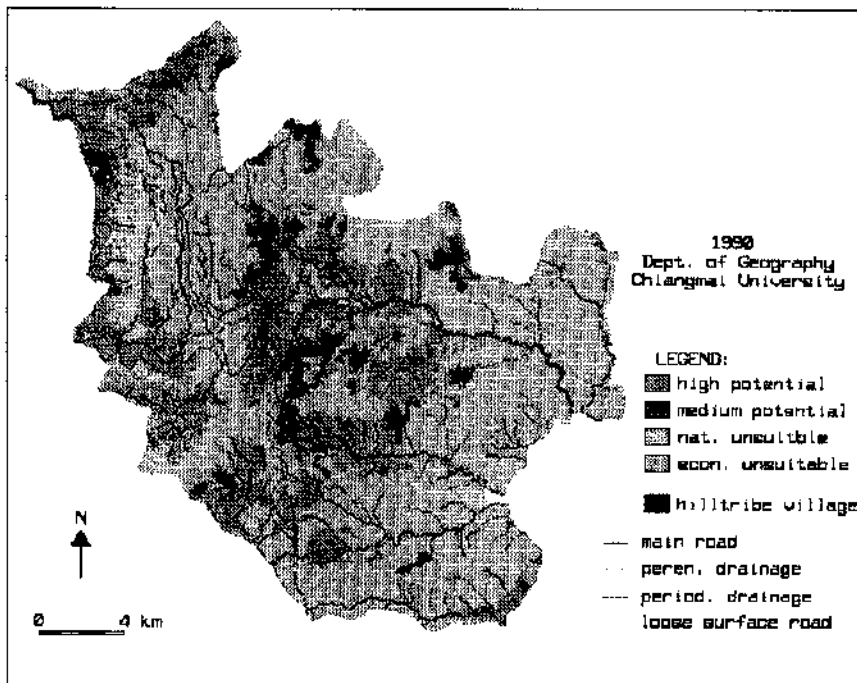


Figure 3 - Doi Inthanon National Park. Natural and economically suitable areas for further land use development.

which the present situation needs immediate action to prevent further environmental degradation.

The use of satellite data (Landsat TM) was an integral part of the project work. The main objectives were related to terrain recognition in terms of geomorphological units and to identification of land cover and vegetation. In obvious contrast to some previous experiences in rainforest areas by other authors, the research team encountered difficulties in employing TM-data for reliable terrain recognition.

The possibility of separating various land cover types in different site conditions was ascertained by using some spectral separability analysis techniques (feature space plots; pairwise divergence analysis). It was

found that the opening of forest canopy induces increased radiance in visible bands but it is not so significant in the near-infrared bands. Band 5 appears to be significantly less sensitive to differences between cover types than band 3. However, two edaphic forest types (closed forest and dense mixed bamboo forest) were distinguishable due to their distinct spectral response in the nearinfrared bands. But some important pairs of physiognomic units such as grassland and shifting cultivations, scrub and open forest, could not be reliably separated because of the similarity of the cover types.

## References

Aronoff S., 1990. Geographic information systems : a management perspective, WDL publications, Ottawa, Canada.

Burrough P.A., 1987. Principles of geographic information systems for land resources assessment, Clarendon press, Oxford.

Chunkao K. and Tangtham N., 1989. Methodology and application of the watershed classification in Thailand. Second expert group workshop on river/lake basin approaches to environmentally sound management of water resources. January, Bangkok and Hat Yai, Thailand.

Department of Land Development. 1991. Soil and survey of the Doi Inthanon National Park, Chiangwat Chiang Mai.

Environmental System Research Institute. 1990. Understanding GIS, ESRI, Inc., Redlands, California.

Faculty of Forestry, Kasetsart University. 1989. Master plan for the Doi Inthanon National Park Management, Amphoe Chom Tong Chiangwat Chiang Mai. (in Thai).

FAO. 1976. A framework for land evaluation, FAO Soils Bulletin, n°32, Rome.

Hastings P., Chatchawan Boonraksa, Amornwan Resanond, Surachai Chayawatanakijja and Jaraskwan Panthi, 1991. Integrated information for natural resources management, Thailand Development Research Institute, Bangkok.

Hutacharoen M., 1987. Application of GIS technology to the analysis of deforestation and associated environmental hazards in Northern Thailand, Second Annual International Conference, exhibits and workshops on GIS. October, San Francisco.

Prayad P., 1989. Identifying forest types by four bands imagery : methodological analysis, Chiang Mai University.

Sheng T.C., 1979. Watershed management and conservation farming in Northern Thailand. Mae Sa, Integrated Watershed And Forest Landuse Project. Chiang Mai, Thailand.

Star J. and Estes J., 1990. Geographic information systems : an introduction, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Stein N., 1992. Geoökologische Raumgliederung in Nordthailand. Methodische Ansätze und bisherige Ergebnisse. Geographische Rundschau 44, 48-56.

Tomlin C.D., 1990. Geographic information system and cartographic modelling. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Wooldridge D., 1986. Watershed classification project Thailand. International Union for conservation of Nature and Natural Resources. C.D.C.

Contract number : **TS2-A-240**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Dynamics and assessment of Kenyan mangrove ecosystems.***

Titre : *Dynamique et évaluation des écosystèmes de mangrove au Kenya.*

▼ PROJECT LEADER : Professor P. Polk  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Free University of Brussels, VUB,  
 Institution-hôte : Laboratorium of Ecology.

▼ ADDRESS : Pleinlaan 2,  
 Adresse : 1050 Brussels, Belgium.

▼ TELEPHONE : +32-2-641 34 09

▼ FAX : +32-2-641 34 03

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :

- Kenya : Kenya Marine and Fisheries Research Institute, Mombassa.
- Kenya : University of Nairobi.
- Netherlands : Catholic University of Nijmegen.
- Netherlands : Netherlands Institute of Ecology,  
 Centre for Estuarine and Coastal Research, Yerseke.
- Belgium : University of Gent.
- Italy : University of Florence.

▼ KEY WORDS : lagoon; mangroves; seagrasses; macroalgae; plankton; benthos;  
 crustaceans; fish; biodiversity; nutrients; productivity; mangrove litter  
 transformation; transfer of c and n; hydrography; numerical modelling.  
 Mots clés : *lagune; mangrove; herbe aquatique; macroalgue; plancton; benthos;  
 crustacé; poisson; biodiversité; élément nutritif; productivité;  
 transformation des débris de mangrove; transfert de c et n;  
 hydrographie; modèle numérique.*

▼ FINAL REPORT : 239p. English.  
 Rapport final :

# Dynamics and assessment of Kenyan mangrove ecosystems

## Objective of the research

The association of coastal lagoon and mangrove forests along the Kenyan coast constitutes unique environments sustaining enhanced biomass of several commercial fish, shellfish and crustacean species as compared to coastal and open sea environments. The lack of appraisal of the status of Kenyan mangrove forest has been a limitation on the formulation of an adequate management and conservation policy. Therefore this project was designed as an interdisciplinary scientific co-operation between Kenya, the Netherlands, Italy and Belgium, to gather basic information on the structure and functioning of a selected Kenyan mangrove ecosystem, Gazi Bay, situated 50 km south of Mombasa. The research work focused on the following :

- Assessment of the different components of the ecosystem, in terms of biodiversity, biomass and productivity;
- Estimation of nutrient and energy flows through the ecosystem, and mathematical modelling.

## Materials and methods

### ■ Species distribution of mangroves

A map of mangrove vegetation was drawn, based on aerial photographs and fieldtrip observations.

### ■ Biomass estimation of mangroves

Two fieldwork plots, representative of two vegetation types (*Ceriops tagal* and *Rhizophora mucronata*) commonly found in Gazi Bay, were selected for studies on biomass, pri-

mary production and litterfall. A biomass estimation method was developed. Sampling series of over 20 trees, varying in size, were selected. Several parameters were measured : circumference of trunk at different heights above ground, height of tree and diameter of the crown. The trees were cut down and the fresh weights of roots (above ground), trunk, branches and leaves were measured separately. For all parameters linear regressions on the logarithmically transformed data were calculated. The most accurate parameter was used to estimate the biomass of the vegetation per square meter.

### ■ Measurement of litterfall in the mangroves

Litterfall was determined in two different ways. In the case of *Ceriops tagal* the data were obtained indirectly from a phenological study on new formation and on losses of existing leaves in combination with results from biomass estimation and biometric data. In the case of *Rhizophora mucronata*, data on litterfall were obtained directly with the use of littertraps.

### ■ Seagrass and macro-algae

An adapted line intercept method was used. At fixed intervals transects were made, perpendicular to the creek. A cluster analysis (twinspan) was used to distinguish vegetation types using species composition and abundance. Aboveground biomass was used as a measure for the abundance of the species.

### ■ Phytoplankton primary productivity

Productivity was determined using the Winkler method for dissolved oxygen determination in dark and light incubation bottles.

### ■ Zooplankton studies

A 335µm mesh-size plankton net was towed in near surface water for 5 minutes. Samples were preserved in 5 % formaldehyde for laboratory analysis.

### ■ Ecological study of the benthos

Meiobenthos and macrobenthos were sampled from sediment cores taken with handcores. Major meiofauna and macrofauna taxa were identified and counted under a stereoscopic microscope. Densities, diversities and biomass data of the benthos have been calculated and mathematically processed.

### ■ Species composition and shuttle movement of fish

Catches were made with a beach seine net of 40 m long and 2 m high with a mesh size of 5 mm. Each catch was sorted out into species. Individuals were weighed and their total length and standard length were measured to the nearest mm. A subsample was preserved in 5 % formalin for analysis of the stomach contents when back in the laboratory.

### ■ Distribution of nutrients and particulate organic material

The determination of nutrients (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and SiO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) were done with a Technicon Autoanalyzer II system, using standard colorimetric techniques. Salinity determinations were performed using the Knudsen titration method.

Particulate organic matter (POM) samples were analysed for carbon, nitrogen composition and stable carbon isotope abundance (δ<sup>13</sup>C) using a C & N Analyzer and an Isotope Ratio Mass Spectrometer.

### ■ Mangrove litter as nutritive source in the mangrove ecosystem

The interspecific variability of organic C & N content and  $\delta^{13}\text{C}$  composition of fresh and senescent leaves was studied for all species of mangroves, using a C & N Analyzer and an Isotope Ratio Mass Spectrometer.

The *in situ* decomposition of mangrove leaves was studied using litter-bag experiments. The nitrogen enrichment of the decomposing leaves, due to biological nitrogen fixation, was studied during both rainy and dry season, using the acetylene reduction technique.

### ■ Removal of fallen litter by the epibenthic community

Senescent leaves were tied with a thin nylon fishing line of circa 100 cm. Leaves were left for the crabs and snails to eat (24 h). After collection of the leaves, the remaining leaf area was compared to its original area on the transparent paper and the difference recorded using an optical leaf area meter.

### ■ Transfer of C from primary to secondary and tertiary producers

Different organisms and sediments were collected in the mangrove ecosystem of Gazi Bay. Specimens were dried and ground into fine powder before analysis by Isotope Ratio Mass Spectrometer for carbon isotopic ratio ( $\delta^{13}\text{C}$ ).

### ■ Hydrography of Gazi Bay

The topography of the bay was recorded using an echo sounder and a levelling instrument. To determine the hydrography a tidal gauge and current meters were used. The flow velocity was recorded with propeller current meters.

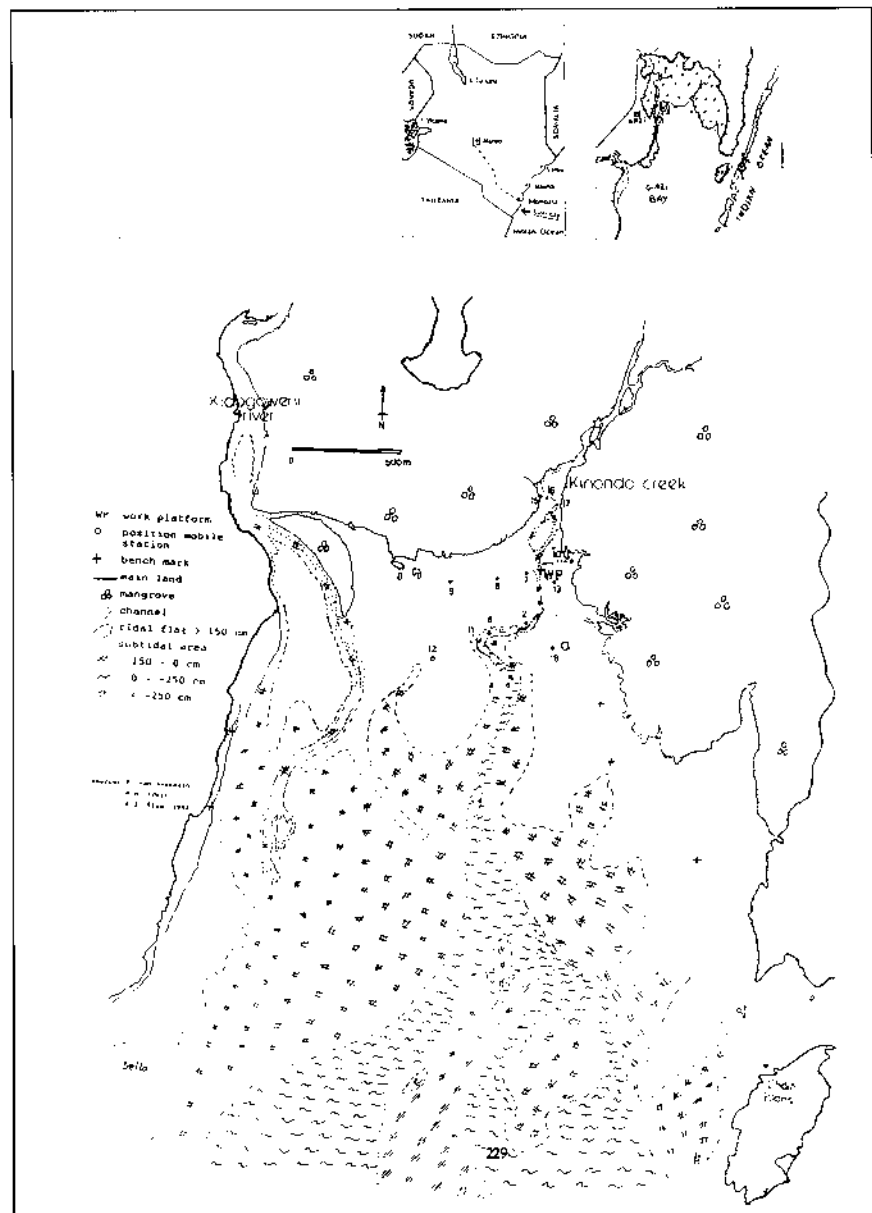


Figure 1 - Study area at Gazi Bay, Kenya and positions of measurements.

### ■ Numerical modelling of the mangrove ecosystem

The abstraction of the system is presented as a box and arrow diagram showing storages and flow of matter. Changes in each of the state variables are function of some input and output processes and are represented in the model equations as ordinary differential equations. The processes are variously formulated using published ecosystem models, field data and personal effort. Computer simulation of the system was done on an IBM compatible PC using a simulation package.

### Results

Gazi Bay covers an area of 15 km<sup>2</sup> and is protected from the open ocean by Chale peninsula to the west and by a coastal fringing coral reef to the south (Figure 1). The area is covered with seagrass beds and a mangrove swamp with an area of 6.61 km<sup>2</sup>. Two tidal creeks lead out of the mangrove swamp. The creek on the western side finds its landward continuation in the seasonal Kidogoweni river. The eastern creek is not fed by a river and carries only tidal water in and out of the mangrove swamp. This creek has

a luxuriant cover with seagrasses and seaweeds. On the seaward side, Mkurumuji river discharges into Gazi Bay lagoon. The mangrove swamp is drained only marginally by Mkurumuji river.

### ■ Species distribution of mangroves

The eight mangrove species described for East Africa : *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh, *Bruguiera gymnorrhiza* Lamarck, *Ceriops tagal* (Perr.) Rob., *Heritiera littoralis* Dryland, *Lumnitzera racemosa* Van Steenis, *Rhizophora mucronata* Lamarck, *Sonneratia alba* J. Smith and *Xylocarpus granatum* Koenig occur at Gazi Bay. Along the creeks, high (12-18 m) fringing forests of *Avicennia marina* are found, further away from the creeks, these are replaced by thick bushes (5-10 m high) of mainly *Rhizophora mucronata* and *Bruguiera gymnorrhiza*. This area is flooded daily by high tide. On higher areas inside the bush, *Ceriops tagal* appears in monospecific stands, reaching up to 3 meters in height. Most of these areas are only flooded during spring tides. The sediment is more solid and sandy. On the western mainland side especially, extensive stands of *Avicennia marina* (2-3 m high) are found, with *Lumnitzera racemosa* and *Xylocarpus granatum* on the higher sandy parts. In the transition zone between mainland and mangrove area *Heritiera littoralis* is frequently found. *Sonneratia alba* is commonly found along the borders of the mangrove swamp on the ocean side.

### ■ Biomass estimation of mangroves

For *C. tagal* trees a LN LN regression between trunk circumference at 30 cm and total fresh weight of the tree showed the best correlation. The regression equation : fresh weight in kg =  $48.8 \times 10^{-3} \times (\text{circumference in mm})^{2.31}$ . The linear regression between seedling length and total above ground fresh weight is : fresh weight (g) =  $2.55 \times 10^{-3} \times (\text{length in mm})^{1.49}$ . The estimation of the above ground

biomass is 3.95 kg dry weight (DW)/m<sup>2</sup>. For *R. mucronata* trees, a LN LN regression between trunk circumference at 150 cm and total fresh weight of the tree showed the best correlation. The regression equation is : fresh weight in kg =  $404.9 \times 10^{-3} \times (\text{circumference in mm})^{2.20}$ . The linear regression between seedling length and total above ground fresh weight is : fresh weight (g) =  $24.1 \times 10^{-3} \times (\text{length in mm})^{1.23}$ . The estimation of the above ground biomass is 25.6 kg DW/m<sup>2</sup>. This indicates that the *Rhizophora* plot is part of a full grown forest.

### ■ Measurement of litterfall in the mangrove

#### ■ Litterfall in the *Ceriops tagal* field plot

The calculated litterfall shows a seasonal pattern that coincides with rainfall. The litterfall shows a sudden drop from  $1.34 \pm 0.26$  g DW/m<sup>2</sup>/day in the dry season (August-April) to  $0.43 \pm 0.12$  g DW/m<sup>2</sup>/day in the wet season (April-June). A peak in litterfall occurs shortly after the rains.

#### ■ Litterfall in the *Rhizophora mucronata* field plot

Although not as obvious as in the *C. tagal* plot, a decrease in litterfall can be observed which coincides with rainfall. Total litterfall drops from 4.66 g DW/m<sup>2</sup>/day in October-November to 3.22 g DW/m<sup>2</sup>/day in December-March. This drop is followed by a short rise to previous levels. From early April onwards, a gradual decrease in the litterfall in the period April-June leads to minimum litterfall values in July-September of 1.42 g DW/m<sup>2</sup>/day.

### ■ Seagrasses and macro-algae

The two major creeks (western and eastern) within the mangrove ecosystem of Gazi Bay were studied for species composition, distribution patterns and biomass.

The vegetation of the eastern creek is better developed (83 % of creek surface is covered by seagrasses) than that

of the western creek (only 18 % is covered by seagrasses). The species composition of the eastern creek differs greatly from that of the western creek. The vegetation of the eastern creek is more diverse. Apart from a few seagrass species in common (*Cymodocea rotundata*, *Cymodocea serrulata*, *Halodule uninervis* and *Thalassia hemprichii*), some pioneers were found in the western creek which are absent in the eastern creek (*Halophila ovalis* and *Halophila stipulacea*). The eastern creek, in contrast, is dominated by *Thalassodendron ciliatum* and occasionally by *Enhalus acoroides*. *T. ciliatum* often contains epiphytic macro-algae such as *Gracilaria corticata* and *Dictyota spec.* In the eastern creek more epiphytic algae were also found (such as *Sargassum spec.* and *Hormophysa triquetra*).

*T. ciliatum* has the highest above-ground biomass in the eastern creek (mean value : 261 g DW/m<sup>2</sup>) and is the single most abundant species. Within its vegetation group *E. acoroides* also shows a high biomass (mean value : 28 g DW/m<sup>2</sup>). Together with *T. ciliatum*, *E. acoroides* forms the major part of the seagrass vegetation. Of the macro-algae, *G. corticata* shows the highest biomass (mean value : 25 g DW/m<sup>2</sup>).

The total biomass of the vegetation in the western creek is very small. Locally *T. hemprichii* shows the highest biomass (mean value : 33 g DW/m<sup>2</sup>), but over the whole area *C. rotundata* is the dominant species (mean value : 2 g DW/m<sup>2</sup>).

### ■ Epiphytic macroalgae on mangroves and seagrasses

The Bostrychium (epiphytic growth on mangrove pneumatophores and stems) was shown to consist of 36 "macro" algal species : 14 Chlorophyta, 2 Phacophyta and 18 Rhodophyta. Biomass values vary from 0 to 352 g/m<sup>2</sup>. The epiphytic algal component on seagrasses has only been studied on *Thalassodendron ciliatum* and consists of 23 algal species :

3 Chlorophyta, 3 Phaeophyta and 17 Rhodophyta.

### ■ Microphytobenthos

A preliminary inventorization of the microphytobenthic diatoms has been carried out in the mangrove, the seagrass beds and the tidal channel. A total of 279 diatom taxa have been identified : 66 of these could only be identified up to genus level. The majority (about 89 %) of the taxa belong to the Pennatae. The most abundant genera are : *Mastogloia* (13 %), *Navicula* (11.5 %), *Nitzschia* (10 %), *Amphora* (9 %) and *Achnanthes* (6.5 %). Among the Centricae (about 11 %) the most abundant were : *Coscinodiscus* (1.8 %), *Auliscus* (1.4 %), *Biddulphia* (1.4 %) and *Triceratium* (1.4 %).

### ■ Phytoplankton primary productivity

The highest gross productivity was recorded during the intermonsoon season July 1990-September 1990 characterized by south-easterly winds ( $150 \text{ mg C/m}^2/\text{hr}$ ) while the lowest was recorded during the S.E. monsoon period April 1991-June 1991 ( $101 \text{ mg C/m}^2/\text{hr}$ ). There was some indication of an inverse relationship between productivity and rainfall.

The highest net productivity was recorded during the month of June 1990 ( $97 \text{ mg C/m}^2/\text{hr}$ ) while the lowest was recorded during the month of April 1990 ( $4 \text{ mg C/m}^2/\text{hr}$ ).

### ■ Zooplankton studies

Gazi creek supports a diverse zooplankton community. About 40 different taxa have so far been recorded in Gazi. Monthly average abundance varied between 25-425 organisms/ $\text{m}^3$ . Copepoda were established as the single most important taxon forming up to 92 % of total zooplankton community. The copepoda group comprised Calanoids, Cyclopoids and Harpacticoids. The most dominant taxa were *Pseudodiaptomus* sp. and *Oithona* spp. Other calanoids

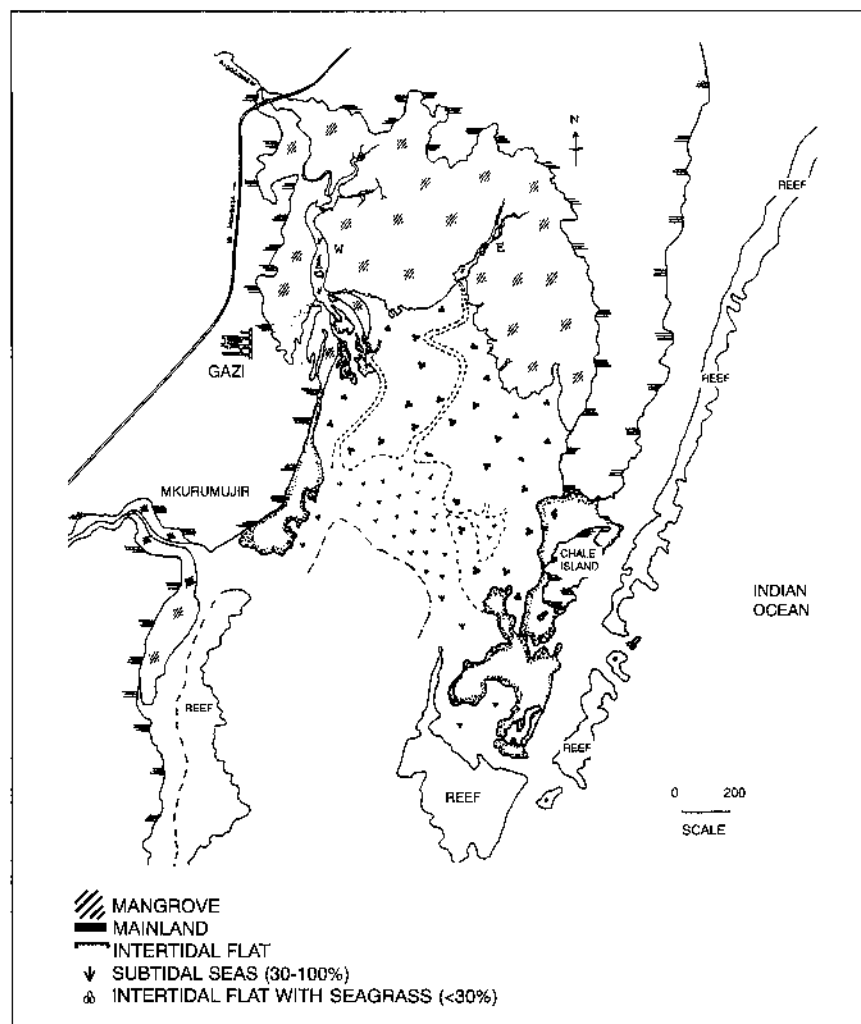


Figure 2 - Detailed map of Gazi Bay with the eastern creek (E) and the western creek (W).

were *Undinula*, *Tortanus*, *Labidocera*, *Acrocalanus* and *Acartia*. Important cyclopoid species were *Oithona*, *Corycaeus*, *Oncocera* and *Saphirella*. Harpacticoids were dominated by *Methis ignea* and *Setella* species. Other important groups included Chaetognaths, Amphipods, Branchyuan larvae, Isopods and Cumaceans.

Zooplankton population was seen to be highest in April (pre-monsoon) and to fall gradually with the approach of the S.E. monsoons. Zooplankton diversity on the Margalef Index ranged between 2.00 and 4.53 units. The oceanic region has a greater amount of zooplankton diversity but lesser amount of biomass as compared to the middle and inner creeks.

### ■ Ecological study of the benthos

**Meiobenthos :** Seventeen taxa are identified and the nematodes constitute the biggest part followed by copepods and turbellarians. The total meiobenthos densities vary from 3100 to 6101 ind./ $10 \text{ cm}^2$  and Nematoda have densities ranging from 1709 to 5640 ind./ $10 \text{ cm}^2$ .

**Macrobenthos :** the total macrobenthos densities vary between 265 and 6025 ind./ $\text{m}^2$ . Eighteen taxa are distinguished. The Mollusca are represented between 0 and 2250 ind./ $\text{m}^2$ , the Crustacea between 0 and 1125 ind./ $\text{m}^2$  and the Annelida show rather high values for all stations (1450 to 2300 ind./ $\text{m}^2$ ). Total biomass of macrobenthos varies from 20 to 2200  $\text{mg/m}^2$ .



## ■ Ecological research on mangrove crustaceans

The main research lines were :

- Decapods ecology : Migration and territorialism of the swimming crab, *Thalamita crenata* (Portunidae); Commensalism, population structure and behaviour of *Heteromysis harpax* (Mysidacea); *Sphaeroma terebrans* (Isopoda) population and family structure and *Sesarma leptosomum* (Grapsidae) vertical tree migration;
- Relationships between Decapoda and other mangrove macrofauna : predation and ecological role of the swimming crab, *Thalamita crenata* (Decapoda, Portunidae) and zonation, food chain position and stomach content of mangrove crabs (Decapoda, Brachyura);
- Relationships between macro-crustaceans and mangroves : ecological role of the wood borer *Sphaeroma terebrans* (Isopoda) and ecological role of the tree crab *Sesarma leptosomum* (Decapoda, Grapsidae);
- Taxonomic research and other accessory research : Hydrostatic pressure response of the crab *Thalamita crenata* in laboratory; new records of Anomurans in Kenya and new records of mangrove crabs in Kenya;
- *Uca* (fiddler crab) research : investigations on *Uca* handedness and estimation of the abundance of fiddler crabs.

## ■ The autecology of the mangrove oyster *Saccostrea cucullata*

This study has demonstrated the existence of a relationship between environmental parameters and the form and size of the oysters. The littoral oyster *S. cucullata* occurs between 1.05 and 3.35 m above chart datum, with the highest density occurring between 1.85 and 2.75 m. Oyster length was weakly correlated with the approximate density of the oysters. However, for densities equal to and higher than 65 % there was a fairly strong negative correlation. The calculated growth curves showed that the

growth rate decreased in an upward direction and that the growth was fastest before the age varying from 8 to 10 months, after which it slowed with increasing age. The form of the oyster is more irregular when growing higher in the intertidal zone.

Results from these studies have been used to start an oyster culture in Gazi Bay and economical feasibility is presently prospected.

## ■ Species composition and shuttle movement of fish

The family Gerreidae is outstandingly abundant followed by Antherinidae which in terms of numbers comprised about 31.47 % and 8.86 % respectively of the total. Other families that are significantly abundant include Teraponidae, Lutjanidae, Sillaginidae, Acropomidae, Clupeidae, Lethrinidae, Belonidae and Scaridae. The families Siganidae, Sphyracnidae, Fistulariidae, Apogonidae, Triodontidae and Pomacentridae each contribute between 1 and 2 % each, to the total community numerical abundance. The remaining 28 families encountered in the creek contributes less than 1 % each to the total community numerical abundance.

The fish caught were small averaging in length between 3.9 and 43.9 cm. When compared to the average and the maximum sizes reported for these species in the Indian Ocean, it is clear that the Gazi fish community is a mixture of adult and juveniles.

This study has shown the importance of Gazi creek as :

- a major nursery ground for the fish population that supports artisanal fishery in Kenya and for lesser species which do not feature in fishery but are of great importance in this creek's food webs, and;
- a spawning ground for some resident and shoaling migratory species.

## ■ Distribution of nutrients and particulate organic material

Mkurumuji river, situated at the mouth of the bay, and Kidogoweni river, situated in the western creek, contribute positively to the supply of dissolved inorganic nutrients into Gazi Bay during the rainy season. In the case of Mkurumuji river, phosphate concentrations changed from about 3.2 µg at-P/l to values below 1.0 µg at-P/l during the change from low tide to high tide. Nitrate concentrations changed from about 4.5 µg at-N/l to about 1.0 µg at-N/l while silicate changed from about 160 µg at-Si/l to 30 µg at-Si/l. However during the dry season, there was no significant contribution of dissolved inorganic nutrients by the rivers into the bay. Nitrate and phosphate concentrations were both below 1.0 µg at/l even during low tide.

The  $\delta^{13}\text{C}$  values for POM in Gazi creek during the dry season show progressively more negative values from the mouth of the bay to the entrance of Kidogoweni river. Since marine POC has been shown to have a characteristic value of -20.50 ‰ and mangrove POC has a value of -26.77 ‰, it is clear that there is a progressive influence of mangrove contribution as one moves deeper into the creek.

Though the supply of dissolved inorganic nutrients by the rivers into the bay was found to be very minimal during the dry season, time series studies both at Mkurumuji river entrance and in Gazi creek proper, indicated that mangrove particulate detritus is exported out of the system throughout the year. This therefore suggests that mangrove ecosystems export nutrients in particulate phase and not as inorganic dissolved species.

## ■ Mangrove litter as nutritive source in the mangrove ecosystem

Statistical analysis of the data has shown that the eight species of man-

groves differ significantly in C:N ratios. C:N atom ratios for fresh leaves vary from 78 for *Rhizophora mucronata* to 24 for *Heritiera littoralis*. Among the four more important species of mangroves of Gazi Bay (*A. marina*, *B. gymnorhiza*, *C. tagal* and *R. mucronata*), *A. marina* has the lowest C:N ratio (27) and thus the highest nutritive value while the three other species have smaller nutritive values. A change in mean C:N ratio for all the species, from 48 in fresh leaves, to 129 in senescent leaves, indicates that approximately 64 % of nitrogen is resorbed by the plants and shows that mangroves are efficient in conserving nitrogen.

The  $\delta^{13}\text{C}$  values for the mangrove leaves vary from -25.2 ‰ to -29.7 ‰ and are in the typical range of C-3 terrestrial plants.

Sediments below mangrove trees have  $\delta^{13}\text{C}$  values which are close (they are slightly more positive) to the  $\delta^{13}\text{C}$  values for the leaves. This indicates that mangrove leaves represent a main and probably the major source of organic carbon to the sediments. A ten-fold decrease in C:N ratio between senescent mangrove leaves and POM in sediments indicates that significant nitrogen enrichment occurs during decomposition.

This nitrogen enrichment was investigated and the results show that the rates of leaf decomposition and nitrogen fixation are higher during the rainy season compared to the dry season for both species of mangrove (*R. mucronata* and *C. tagal*). The rates of decomposition and nitrogen fixation are higher for *R. mucronata* leaves than for *C. tagal* ones during both seasons. Enrichment of nitrogen during decomposition is observed in both species during the rainy and the dry season but leaves of *R. mucronata* become more enriched in nitrogen than leaves of *C. tagal*. This is in agreement with the rates of measured nitrogen fixation. Nitrogen fixation can contribute significantly (5 to 80 %) to the nitrogen enrichment of

leaves during decomposition and the contribution of nitrogen fixation is more important during the rainy season than during the dry season.

#### ■ Removal of fallen litter by the epibenthic community

In the *C. tagal* plot the leaves were mainly attacked by the gastropod *Terebralia palustris*. This is also confirmed by similarities in  $\delta^{13}\text{C}$  values between *T. palustris* and mangrove leaves. During spring tides the fauna in the *C. tagal* plot is more active than during neap tides. Whereas during neap tides only 44 % of the fallen leaf area is eaten by the snails, this percentage increased to over 90 % at spring tides.

In the *R. mucronata* plot it was mainly the decapod *Sesarma guttatum* that was feeding on the fallen leaves. Due to the tidal flooding of the *R. mucronata* plot less than 50 % of the total litterfall reaches the sediment surface and is available for the benthic community to feed on. On a daily basis, between 12.5 % and 17 % of the total litter fall is consumed by crabs.

#### ■ Transfer of C from primary to secondary and tertiary producers

Two isotopically distinct sources of carbon were found in the mangrove ecosystem of Gazi Bay : mangroves with an average value of -27.3 ‰  $\pm$  1.4 and seagrasses with an average value of -18.57 ‰  $\pm$  4.2. The gastropod *Terebralia palustris* has an isotopic signature in the range of mangrove leaves. The fish we analysed, apparently derived their carbon source from the seagrasses. For the other organisms isotopic signatures indicate an assimilation of carbon from more than one source.

#### ■ Hydrography of Gazi Bay

At flood time the water flows steadily into the bay. At first the water flows through the channel. As the water level overtops the tidal flats the water flows straight into the direction of the

mangrove swamp. During the ebb period the mangrove swamp is drained by the creek. At ebb the discharge in the Kinondo Creek (eastern creek) is 2.6 times as much as the discharge at flood time. Because this part of the mangrove is a closed system (no influx of water by other systems, e.g. rivers) water is only imported via the tidal flats during flood time. In the mangrove area circulation takes place from the borders to the creek. Water is drained by the channel as well as by crossing the tidal flat. Eventually, water from the channel and from the tidal flat meet in the deeper part of the bay. Just before the tidal flats emerge at low tide, water from those flats is drained off sideways into the channel. The channel carries out the last amount of water with a strong current. Therefore, the ebb current is still going on although the water level is already rising.

#### ■ Numerical modelling of the mangrove ecosystem

The results show that nutrient contribution of the mangrove ecosystem to the contiguous zones is negative. The system exports carbon largely consisting of detritus poor in nitrogen. The flow of nitrogen through bacteria accounts for 72 % of the total system nitrogen throughflow (not including the import of nitrogen into the system). Mangrove trees can be harvested by adopting a cycle of management.

The mangrove ecosystem is critically dependent on incoming nitrogen. The dynamics of the organic nitrogen  $\text{N}_2$ -fixation and denitrification for sediments only, appear to have little impact on the model output. For  $\text{N}_2$ -fixation this is apparently not confirmed by the field data, and it is thus probable that the model requires further refinements.

### Conclusion

The different components of the ecosystem of Gazi Bay were assessed :

- Mangroves : species composition and distribution, biomass estimation and litterfall measurements;
- Seagrasses and macroalgae : species composition, distribution patterns and biomass estimation;
- Epiphytic macroalgae on mangroves and seagrasses : inventarization of the epiphytic macroalgal vegetation (*Bostrychium*) on the pneumatophores and rhizophores of the mangrove and the epiphytic algal component on the seagrass *Thalassodendron ciliatum*;
- Microphytobenthos : preliminary inventarization of microphytobenthic diatoms;
- Zooplankton : species composition and abundance, spatial distribution.
- Benthos : species densities, diversities and biomass estimation;
- Fish : species composition and shuttle movement; parasites.

Some ecological studies on mangrove crustaceans were done and the study of the autecology of the mangrove oyster (*Saccostrea cucullata*) did lead to the setting up of a commercial oyster culture in Gazi Bay.

Following the mangroves classification of Twilley (1986) based on tidal activity and litterfall data, the *Rhizophora mucronata* plot fits the description of a fringe and overwash mangrove. The *Ceriops tagal* plot fits the description of a monospecific basin

mangrove. A decrease in litterfall was observed in both plots, during rainfall.

Values of phytoplankton net primary productivity vary from 4 to 97 mg C/m<sup>2</sup>/hr and represent 4 to 65 % of the gross productivity.

Results on fish composition have shown the importance of Gazi creek as :

- a major nursery ground for the fish population that support the artisanal fishery in Kenya, and;
- a spawning ground for some resident and shoaling migratory species.

Mkurumuji river, situated at the mouth of the bay, and Kidogoweni river, situated in the western creek, contribute positively to the supply of dissolved inorganic nutrients into Gazi Bay during the rainy season but not during the dry season. Throughout the year the mangrove ecosystems, export nutrients in particulate phase and not as inorganic dissolved species.

Analysis of mangrove leaves decomposition have shown that enrichment of nitrogen occurred during decomposition. Nitrogen fixation can contribute significantly (5 to 80 %) to this nitrogen enrichment and the contribution of nitrogen fixation is more important during the rainy season than during the dry season. The rates of leaf decomposition and nitrogen fixation

are higher during the rainy season compared to the dry season.

Preliminary results obtained in the *C. tagal* plot, have shown that 44 % to 90 % of the fallen leaf is eaten by the snails. In the *R. mucronata* plot, between 12.5 % and 17 % of the total litter fall is consumed by crabs on a daily basis.

At flood time the water flows steadily into the bay. During the ebb period the mangrove swamp is drained by the creek. At ebb the discharge in the eastern creek is 2.6 times as much as the discharge at flood time.

The numerical modelling of the mangrove ecosystem has shown that nutrient contribution of the mangrove ecosystem to the contiguous zones is negative. The system exports carbon largely consisting of detritus poor in nitrogen. The mangrove ecosystem is critically dependent on incoming nitrogen.

Field data have shown that, hydrologically speaking, the mangrove is an export system and exports nutrients in particulate phase and not as inorganic dissolved species. In contradiction with the numerical modelling, field data have also shown that, before being exported, the detritus becomes enriched in nitrogen, partly through biological nitrogen fixation.

Contract number : TS2-A-254  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Agrometeorological data and agroecological classification for Sahel countries.***

Titre : *Données agrométéorologiques et classification agroécologique pour les pays sahéliens.*

▼ PROJECT LEADER : G. Maracchi  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Centro Studi per l'Applicazione dell'Informatica in Agricoltura.  
 Institution-hôte :

▼ ADDRESS : Logge degli Uffizi Corti 1,  
 Adresse : Firenze, Italia.

▼ TELEPHONE : +39-55-21 33 60

▼ FAX : +39-55-30 89 10

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :

- Netherlands : Department of Meteorology.
- Netherlands : Department of Theoretical Production Ecology, Wageningen.
- U.K. : Department of Meteorology, Reading.
- Federal Republic of Germany : Department of Meteorology, Berlin.
- Niger : Service Météorologique du Niger, Niamey.
- Italy : Institute of Environmental Analysis and Remote Sensing for Agriculture, CNR, Florence.

▼ KEY WORDS : millet; ecophysiology; agrometeorological data; agroecological classification; model for yield estimation; remote sensing.  
 Mots clés : *mil; écophysiologie; donnée agrométéorologique; classification agro-écologique; modèle d'estimation du rendement; télédétection.*

▼ FINAL REPORT : 94p. English.  
 Rapport final :

# Agrometeorological data and agroecological classification for Sahel countries

The aim of the project was the agroecological characterization of Niger from a viewpoint of millet production, the main cultivated species, and the development of an applicable methodology for the simulation of millet growth.

The agroecological classification is an important tool for land use planning and represents the grouping of homogeneous areas characterized by the same level of productivity (potential or actual) in which a similar strategy can be applied.

The studies carried out in the STD2 project concerned the development of different methodologies for the agroecological classification of Niger.

The project was organized in several modules concerning :

- the study of the potentiality of satellite image processing to supply information, such as meteorological data, for the agroecological classification;
- the study of the potentiality of satellite image processing to estimate crop yield or production in order to classify the actual productivity of the land;
- the applicability of a deterministic simulation model at territorial scale for an agroecological classification based on potential productivity;
- the development of a simple methodology to classify a land unit from a climatic viewpoint, also taking into account crop ecophysiology.

The availability of basic information, like meteorological data, is one of the main problems to be solved to apply a simulation model of crop growth or any other method to classify a land unit. The problem increases in Sahelian countries, which are characterized by a high variability that cannot be monitored by a network of meteorological stations.

To this end some studies were carried out concerning the estimation of rainfall amount and soil moisture by satellite image processing.

Good results were obtained by METEOSAT image processing that, through the Cold Cloud Duration determination, enabled estimation of precipitation levels with an error of  $\pm 10$  mm, with a better accuracy for lower rainfall (below 50 mm) i.e. when rainfall becomes the limiting factor for vegetation development.

The use of METEOSAT images to estimate soil moisture did not provide such good results because the moisture content of the upper 10-15 cm of denuded soils can be deduced from METEOSAT thermal infrared data if the sky is clear. Unfortunately during the growing season the ground is more often obscured or partially obscured by thin high clouds a fact which precludes the required continuity of data. Therefore, the application of this technique is confined to detection of early rains and the start of the growing season.

As a consequence a study concerning the contemporary use of METEOSAT images and MW data was carried out. In fact MW radiation is largely unaffected by atmospheric gas and to only

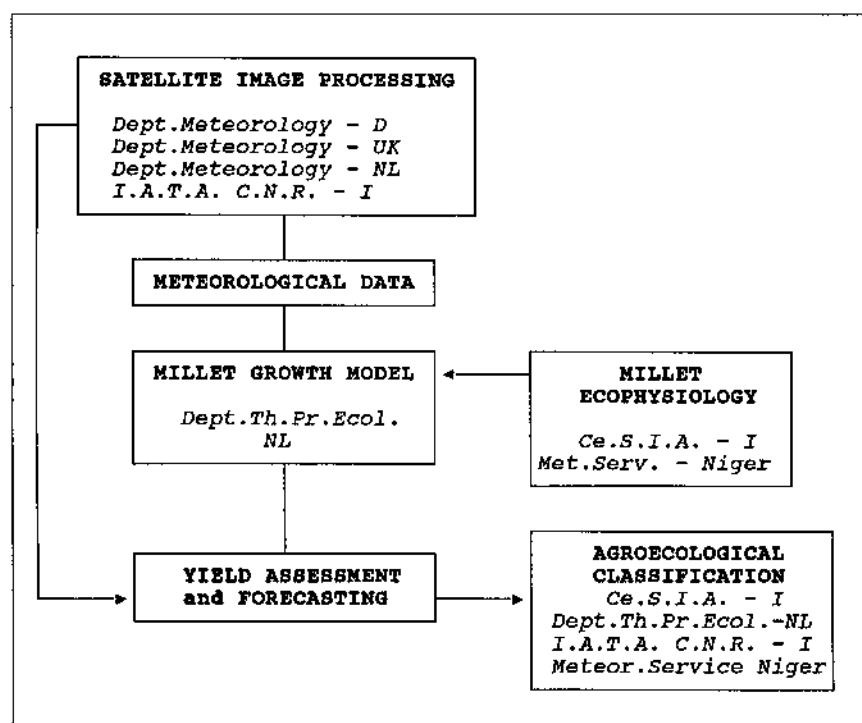


Figure 1 - Outline of the project and interconnections between partners.

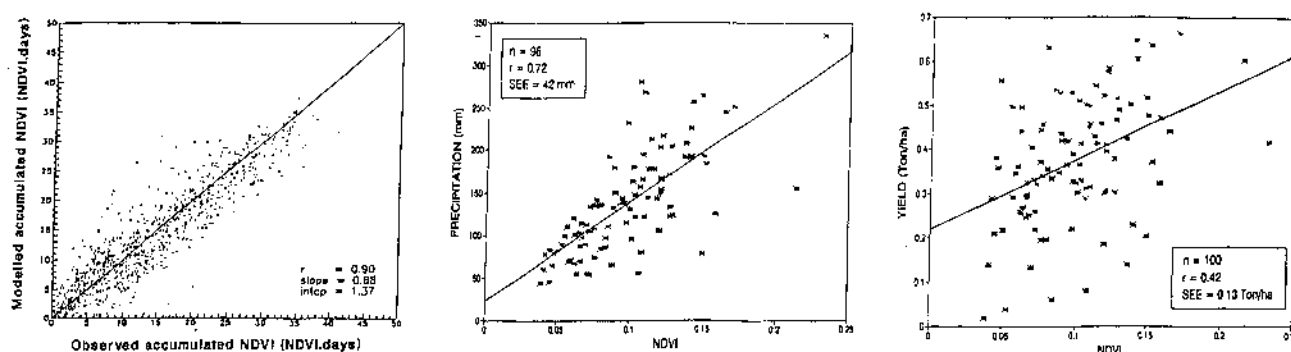


Figure 2 - Example of the results of the two methodologies devised to correlate NDVI, yield and rainfall.

a small extent by clouds and rain. The results showed that the effect of Cold Cloud Duration in the MW signal is pronounced and the variations in Tb (brightness temperature) become more and more negative with increasing CCD reflecting the drop in Tb due to the wetting of the ground by rainfall. Further research will be necessary to achieve an applicable methodology.

The methodology based on rainfall amount-crop yield relationship, through the use of NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) estimated by satellite image processing, was developed for both predictional purposes and agroecological classification. The advantages of the use of satellite images (METEOSAT and

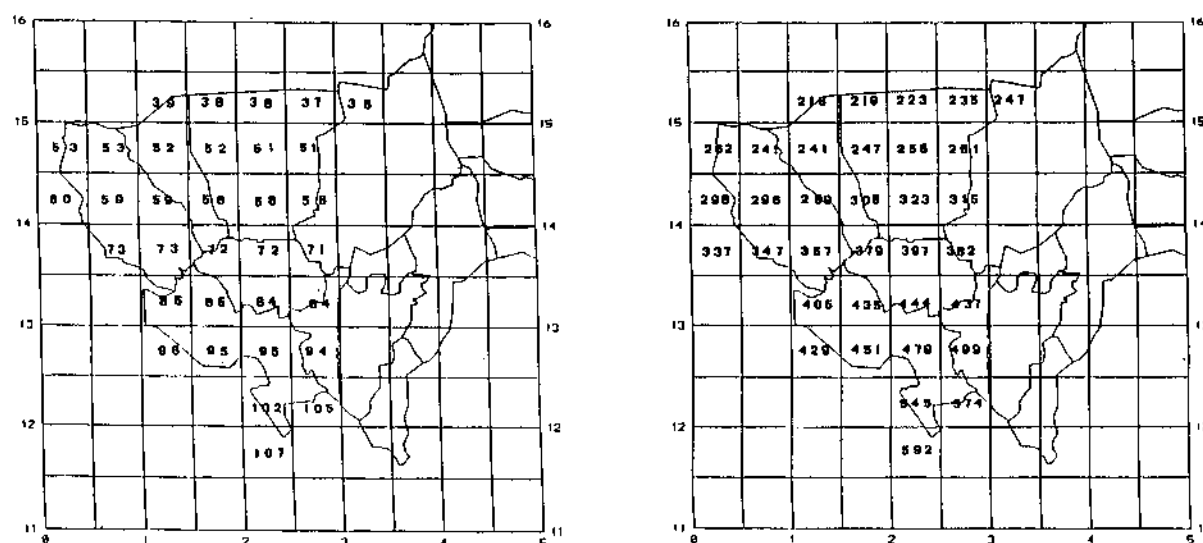
NOAA) concern the possibility to study wide regions and to spatially interpolate data, like rainfall amount or biomass production; the other methods are applicable only at local scale because they require ground measurements that are difficult to obtain. The disadvantages concern the low spatial resolution and accuracy.

Two methodologies were devised to correlate NDVI, yield (or production) and rainfall; they are characterized by a different degree of accuracy for the yield/production forecast and time resolution. In fact the first method is able to forecast the biomass production with good accuracy but only 20 days ahead while the second method has a lower accuracy but its

yield forecast is already available in midsummer. The transfer of resulting production values on a geographical map is being studied.

The relationship between yield or production and rainfall amount, through the NDVI, could be used to classify the land unit from an actual productivity viewpoint. In fact the analysis of the spatial distribution of precipitation over several years and the corresponding NDVI could make it possible to discriminate areas of different productivity.

Until now, a deterministic model to simulate crop growth has rarely been applied at land unit level. In this study a dynamic and explanatory model



a) length of growing season at the probability level of 75% (in days);  
b) water availability for millet during the growing season (in mm).

Figure 3 - Example of the results of the agroclimatic classification of a Niger area.

(WOFOST), was used to simulate only water-limited millet growth because water availability is the main factor that limits yield in Sahelian regions. The originality of this method was the introduction of a sowing strategy to adapt it to actual agricultural practices. However, the model supplied an agroecological classification based on potential productivity and further work has to be done to obtain actual production estimates. The method made possible a comparison between the potentiality of areas with different climatic conditions, mainly different amounts and distribution of precipitations, and evidenced temporal and spatial variability.

The application of WOFOST to the agroecological classification of Niger was preceded by a sensitivity analysis of the performance of the millet growth model in the conditions of Niger for different sowing dates. Furthermore, different methods to derive daily global radiation from sunshine hours were tested.

The simple method developed for an agroclimatic classification of the region represents an improvement of traditional methods because it takes into account not only meteorological data but also the ecophysiological characteristics of the main cultivated crop (millet) and allows the outline of different agrometeorological strategies according to the climatic potentiality of an area. An empirical formula to estimate the period of seedling survival, according to the rainfall amount after sowing, was developed and different rainfall thresholds for sowing were defined according to the

beginning of the rainy season : early, intermediate and late. This sowing strategy was also applied in the methodology described in Conese C., Maselli F. and Zipoli G. 1990.

On the basis of the start of the growing season, three different scenarios were considered : favorable, corresponding to 25 % of the years; intermediate, corresponding to 50 % of the years and emergency, including at least 25 % of the years.

Furthermore, the method provides the end of the rainy season (defined by the intersection of monthly precipitation curve with the curve of ETP/3), the length of the rainy season and the total amount of rainfall at different probability levels for each land unit.

The methods described above were characterized by differing levels of complexity and the choice of the method to be applied is determined by the availability of basic information and the degree of accuracy required.

Future work will be addressed to the comparison of the ground value of the agroecological classifications obtained by the different methods developed and to the study of how to introduce meteorological data, estimated by satellite image processing, in growth methods.

## Publications

Bonifacio R., Dugdale G. and Mildford J.R., 1991. Sahelian Rangeland production in relation to rainfall estimates from Meteosat. Accepted for publication in Int. J. Rem. Sens.

Bonifacio R., Dugdale G. and Mildford J.R., 1993. Combination of Meteosat data with

NOAA AVHRR VIS and NIR data and with SSM/I microwave data for studies of vegetation and soil moisture of Sahelian West Africa, Proc. 9th. Meteosat Sci. Users' Mtg., Locarno, Switzerland, 14-18 September 1992, EUMETSAT, 353-358.

Conese C., Maselli F. and Zipoli G., 1990. Use of NOAA-AVHRR data to monitor crop water status in Sahelian regions, Proc. of Inaugural Congress of the European Society of Agronomy, Paris, 5-7 December, session 2, 3pp.

Conese C., Maracchi G., Maselli F. and Bindi M., 1991. Influence of meteorological factors on primary production of Sahelian regions estimated by remote sensing techniques. Bulletin OEPP, 21 (3), 643-649.

Conese C., Maracchi G., Maselli F. and Bindi M., 1991. Environmental monitoring in the Sahel by means of advanced methods of NOAA-AVHRR data processing, Proc. of EARSEL, Graz, Austria, 3-5 July, 325-333.

Conese C., Maselli F., Di Vecchia A., Senni B. and Maracchi G., 1991. Crop yield estimation and forecasting in Niger using NOAA-AVHRR data, Proc. of Int. Seminary on Agroclimatic management of rainfall, Bamako, Mali, 9-13 December (in press).

Gilbert M.A., Maselli F. and Conese C., 1992. Ecological classification of Niger through the use of NOAA NDVI variations. Climate Research (in revision).

Maracchi G., Bacci L., Cantini C. and Haimanot M.T., 1991. Effects of water deficits in vegetative and in post-flowering phase of pearl millet grown in controlled environment. Accepted for publication in J. of Agricultura Mediterranea.

Maracchi G., Bacci L., Cantini C. and Medin T.G., 1992. Risposta del miglio (*Pennisetum americanum* (L.) Lecke) a condizioni di deficit idrico, XXVI Convegno S.I.A., Udine, Italy, 23-25 Sett. Rivista di Agronomia (in press).

Maselli F., Conese C., Petkov L. and Gilbert M.A., 1992. Use of NOAA NDVI data for environmental monitoring and crop forecasting in the Sahel : preliminary results, Int. J. Rem. Sens., 13(14), 2743-2749.

Maselli F., Conese C., Petkov L. and Gilbert M.A., 1993. Environmental monitoring and crop forecasting in the Sahel through the use of NOAA NDVI data. A case study : Niger 1986-89. Accepted for publication in Int. J. Rem. Sens.

GENIE AGRICOLE  
ET TECHNIQUES POST-RECOLTE

AGRICULTURAL ENGINEERING  
AND POST-HARVEST TECHNOLOGY

TECHNIQUES  
POST-RECOLTE

POST-HARVEST  
TECHNOLOGY



Contract number : TS2-A-160  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***The performance of tillage implements on farms and research stations and on different soil types in Morocco.***

Titre : *Le rendement des outils de travail du sol dans les fermes et stations de recherche et dans différents types de sol au Maroc.*

▼ PROJECT LEADER : Prof. Dr. H. Eichhorn  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Institut für Landtechnik der Justus-Liebig-Universität.  
 Institution-hôte :

▼ ADDRESS : Braugasse 7,  
 Adresse : 35390 Giessen, Deutschland.

▼ TELEPHONE : +49-641-702 84 30

▼ FAX : +49-641-702 84 27

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :  
 - Morocco : Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II.  
 - France : Centre d'Etudes et d'Expérimentation en Mécanisme Agricole et Technologie alimentaire, CEEMAT.

▼ KEY WORDS : reduced soil tillage; direct drilling; watersaving cultivation; soil profile; drawbar force; power requirement.  
 Mots clés : *réduction du travail du sol; localisation directe; pratique culturale économisant l'eau; profil du sol; puissance à la barre de traction; besoin de puissance.*

▼ FINAL REPORT : 116p. German.  
 Rapport final :

# The performance of tillage implements on farms and research stations and on different soil types in Morocco

## Objective of the research

Morocco has an average population growth of 2,4 % p.a. More than 50 % of the population is under 20. There is an intense rural exodus. From 1971 to 1985 the rural population decreased by 24 %, whereas the urban population increased by 80 %.

At the same time Morocco developed from a grain exporting to a grain importing country, despite the fact that there was an increase in production caused by higher yields and (especially through irrigation) an extension of cultivated land area. Despite a 1 million ha increase in grain growing surface over the past 40 years, food production was unable to keep up with population growth.

As the rural exodus is bound to continue, there is going to be a lack of labour in the agricultural sector. This means that in the long-run tillage systems have to be found, which require only a small labour force and which are run with high efficiency to provide the population with sufficient food from Morocco's own production.

Bearing in mind this main goal of contributing to food security, different objectives were put forward for this project :

- undertaking experiments in typical Moroccan regions on research stations and on farms;
- Determining the best possible soil tillage, with regard to the following points :
  - grain yield;
  - adaptability and transferability of proven technology for developing countries;

- best possible economic benefit for the farmer.

following tillage systems chosen for investigation. (Fig. 1)

## Material and methods

The investigation took place over three years on the experimental station of the «Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II» (Gharb) and on the other test plot situated in Aïn El Aouda (Zaër). Parallel to the work on the test farm an investigation was carried out on local farms to determine their structure, the kind of machinery local farmers possess and the kind of soil tillage they prefer. These findings are not discussed further in this rapport.

In order to compare traditional methods of soil tillage with advanced technology while taking into account local conditions and crop rotation, the

## Experimental stations

### ■ Gharb (Sidi Allal Tazi)

The test plot in the Gharb region consists of the alluvial soil type Vertisol («Tirs»). It is a deep soil with a wide A-horizon (up to 100 cm) over a C-horizon. B-horizons are absent. The clay content on the test plot varies between 67 and 81 %. The main clay mineral is the montmorillonite, with the attributes of extension and contraction. This mineral is responsible for the typical self-mulching effects of Vertisols. Because of high evaporation the Gharb region belongs to the semi-arid areas.

Test plot 'Gharb' (Sidi Allal Tazi)			
	primary tillage	seedbed preparation	abbr.
1.	disc harrow (heavy)	disc harrow (light)	DHh+DHl
2.	disc plough	rotary cultivator with tines	DP+RT
3.	chisel plough with rigid tines	rotary cultivator with tines	CH+RT
4.	rotary cultivator with tines winged shares with rotary cultivator (‘DUTZI’ type) direct drilling machine		RT
5.			DZ
6.			DD
test plot 'Zaër' (Aïn El Aouda)			
	primary tillage	seedbed preparation	abbr.
1.	disc harrow (heavy)	seedbed combination (spring tines with roller tiller)	DHh+SC
2.	chisel plough with rigid tines	seedbed combination	CH+SC
3.	rotary cultivator with tines direct drilling machine		RT
4.			DD

Figure 1 - Tillage systems on the test sites 'Gharb' and 'Zaër'.

The size of the test field was 150x162 m divided into four parts, each part being subdivided into six variants, so that there are four repetitions of each variant.

### ■ Zaër (Aïn El Aouda)

The test plot in Aïn El Aouda is characterized by greatly differing soil and climatic properties. The soil is a kind of Ferrusol (Moroccan typology) with concretions of hard iron and manganese oxides, that cause high wear rates to the implements. Another remarkable characteristic feature of this soil is the absence of the «self-mulching effect» which characterizes the Vertisols in the Gharb. This increases the danger of soil compaction.

The arrangement of the test plot was the same as in the Gharb region.

On both test plots the implements used on each variant were the same every year.

### Measuring equipment

In order to establish agricultural engineering parameters which remain reliable under developing countries conditions, the Institut für Landtechnik of the University of Giessen developed some adapted measuring equipment and fixed it on a tractor. This measuring equipment made it possible not only to measure forces between tractor and implement, fuel consumption, speed, implement depth, field performance, quality of work, etc., but also to store and evaluate the data.

Alongside the functional requirements of the measuring equipment, which are in general the same as in the industrialized countries, great importance must be attached to the security against operating errors, protection against environmental influences like dust and temperature and the quick availability of spare-parts in case of breakdown.

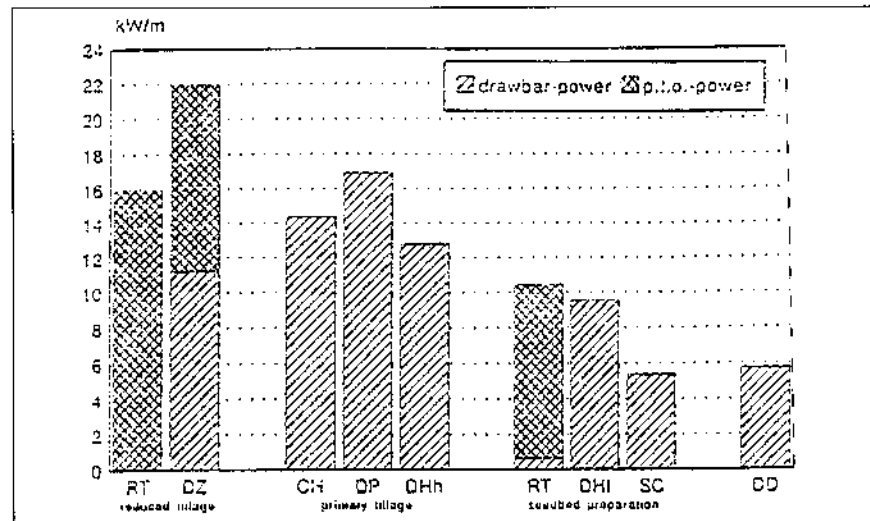


Figure 2 - Average specific power requirements of different implements for varying operations.

### Selected results

Some of the most important results are presented in the example in Figure 2, which shows the average specific power requirement for varying tillage operations.

In the group of drawn implements used for primary tillage, the disc plough has the highest power requirement. Chisel and heavy disc harrow show approximately the same value. Among the implements used for seedbed preparation, the drawn seedbed combination has the lowest power requirement, followed by the light disc harrow; the

rotary cultivator has the highest power requirement, but nearly 100 % of the energy is needed as p.t.o.-power. The winged shares and rotary cultivator system has a power requirement of 22 kW/m, of which half is used for drawbar and half for p.t.o.-power. The rotary cultivator used for reduced tillage needs approximately 16 kW/m, all of which is used as p.t.o.-power. The direct drilling system clearly has the lowest power requirement with about 6 kW/m.

It must also to be mentioned that the required power of nearly all implements depended to a significant extent

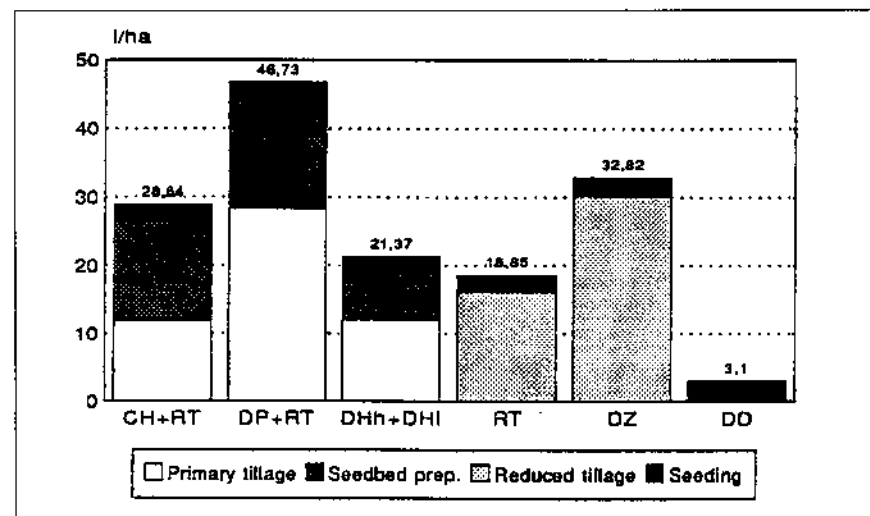


Figure 3 - Average fuel consumption per hectare of different soil tillage systems (Sidi Allal Tazi).

on the degree of soil moisture. High soil moisture content led to an increase in required energy up to two times the power needed under dry conditions.

Figure 3 shows the fuel consumption per hectare and therefore gives an overview of the total energy requirements of the different tillage systems.

The CD+RT system has the highest fuel consumption of any investigated system, followed by the DZ and CH+RT systems. Contrary to the CH+RT system, the combination of winged shares with a rotary cultivator (DZ) loosens the ground and prepares the seedbed in one process, whereas the chisel, due to its lower weight, moves less soil and works at a lower depth.

The RT and DHh + DHI system has the lowest fuel consumption, the energy requirement of the rotary cultivator being more than 50% higher than that of the DHh + DHI system. This clearly shows the greater efficiency of the p.t.o.-driven implement in comparison to pure drawbar power. The same experiments were made in Ain El Aouda and had similar results.

The absolute lowest fuel consumption and energy requirement was measured on both sites for the direct drilling system.

The performance was evaluated by measuring the roughness of the soil surface with a profile meter. As expected, on both sites the p.t.o.-driven implements deliver good performances in creating a fine crumb formation. At the Sidi Allal Tazi site, both under dry and moist conditions, the light disc harrow is unable to create a satisfying surface structure. On farm investigations show that, even after multiple passages, result are poor, as is often the case with local farmers.

At the Ain El Aouda site the seedbed preparation with spring tines and rollertiller obtains an acceptable soil structure for subsequent drilling.

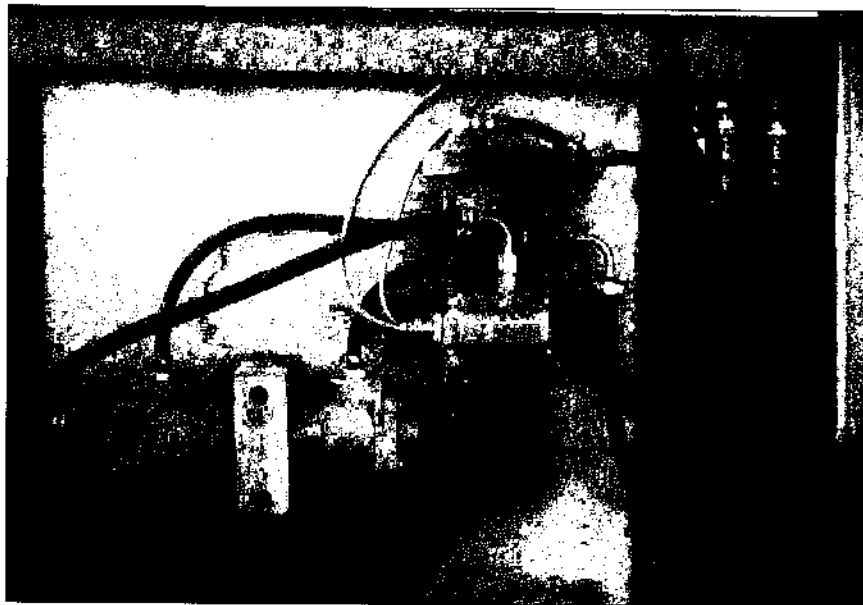


Figure 4 - Built-in fuel consumption meter.



Figure 5 - Rotary cultivator with tines.

The completion of the traditional implements by p.t.o.-driven implements improves the quality of the work, but can not be recommended because of the high costs and the low field performance.

There is not enough tractive power in Morocco for the use of combined tillage machinery and the processing costs of these systems cannot compete with the traditional system.

Under very dry conditions, the sole use of the rotary cultivator shows very good results, especially from the point of view of the soil structure it produces. There should be no problem in running light models of the rotary cultivator within the range of the presently available tractive power in Morocco.

The implement depth of the rotary cultivator should not be deeper than seeding depth, or rather the seed must



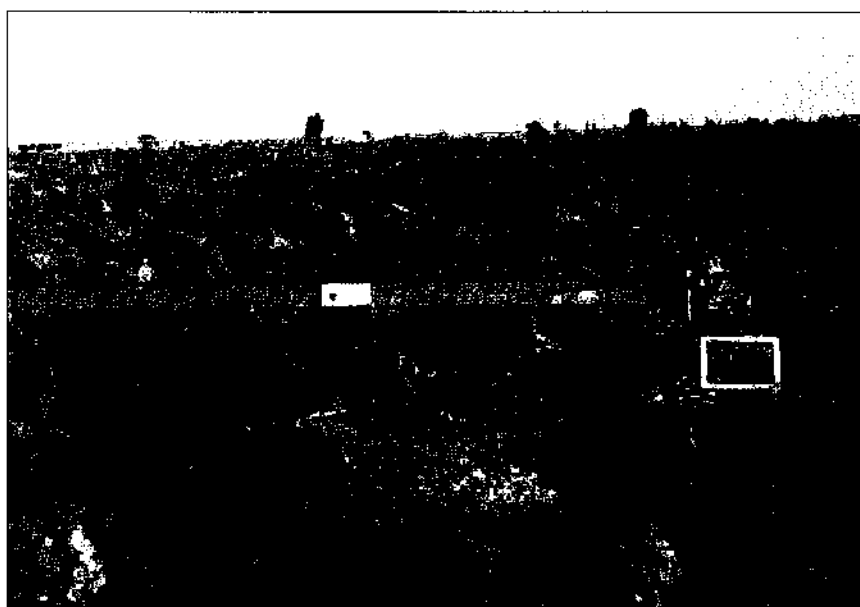
*Figure 6 - A disc plough in action.*

be laid on the horizon created by the implement to secure sufficient availability of water.

At the Sidi Allal Tazi test site the grain yield of the direct drilling variant was significantly higher in all three years. For all other variants no significant yield differences could be found. The winged shares with rotary cultivator obtained continuously declining yields, probably due to agglomerated soil layers caused by winged shares, which hamper water transfer to the plant.

Another striking figure is the high 1992 yield for field beans when using the rotary cultivator. In this case the beans were drilled at implement depth, which means they were lying on the moist horizon and were able to develop well, whereas when the soil was tilled at greater depth there was a lack of water in the seedbed horizon. These differences could not be found in Aïn El Aouda.

The use of p.t.o.-driven implements for seedbed preparation and the use of



*Figure 7 - Soil profile meter ready for use.*

combined tillage machinery is very expensive, because of the high purchase costs for this kind of machinery which has to be imported.

### *Summary and recommendations*

The results from the Vertisol (Sidi Allal Tazi) demonstrate clearly the advantages of a direct drilling system. Throughout all the test years it obtained the highest yields, mainly due to a better availability of water from the ground. There is no unnecessary loss of water through loosening or turning the soil. Beyond a minimum size of 25 to 30 ha the processing costs are lower than those for the traditional systems with DH or DP. The field performance is significantly higher and the energy requirement lower, so that the direct drilling system seems to be suitable for cooperative use.

The situation at the Aïn El Aouda site with its Ferrusol is a little different. There are no significant differences in the grain yield between different variants. As the high content of iron and manganese concretions leads to a high wear, the use of the implement in the soil should be reduced to a minimum. For this reason the direct drilling system is also recommended under these conditions. As the soil tends to compaction it may be reasonable to loosen the ground periodically. In the three years under investigation no such compaction was found to have taken place.

If soil tillage cannot be avoided, a chisel should be used for loosening the soil and a seedbed preparation with spring tines and rollertiller should be affected. The seedbed combination achieves a soil structure fine enough, so that there is no need for the use of p.t.o.-driven implements.

GENIE AGRICOLE  
ET TECHNIQUES POST-RECOLTE

AGRICULTURAL ENGINEERING  
AND POST-HARVEST TECHNOLOGY

GENIE AGRICOLE  
ET MECANISATION

AGRICULTURAL ENGINEERING  
AND MECHANIZATION

Numéro de contrat : TS2-A-176  
Contract number :

▼ TITRE : **Amélioration des techniques de stockage et de conditionnement de certains produits horticoles au Maroc.**

Title : *Improvement of storage and packaging techniques for some horticultural productions in Morocco.*

▼ CHEF DE PROJET : Dr. Ahmed Ait-Oubahou  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Campus d'Agadir.  
Host institution :

▼ ADRESSE : BP 18/S,  
Address : 80.001 Agadir, Maroc.

▼ TELEPHONE : +212-8-24 10 06  
+212-8-24 01 55

▼ FAX : +212-8-24 22 43  
+212-8-84 39 77

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES : - France : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Toulouse.  
Associated Institutions : - Pays-Bas : Université de Wageningen.

▼ MOTS CLES : amélioration de la qualité; atmosphère modifiée; emballage; semper-fresh; calcium; station de conditionnement; champignon; fongicide; piégeage.  
Key words : *quality improvement; modified atmosphere; packing; semperfresh; calcium; packaging station; fungus; fungicides; trapping.*

▼ RAPPORT FINAL : 140p. Français.  
Final report :

# Amélioration des techniques de stockage et de conditionnement de certains produits horticoles au Maroc

## *L'atmosphère modifiée des fruits*

Les changements physiologiques et biochimiques accompagnant la maturation et se terminant par la sénescence du produit sont fonction de plusieurs facteurs, entre autres la nature et le degré de périssabilité du produit, son stade physiologique, la nature de la protection et les conditions de stockage. Les pertes des produits en post-récolte sont très importantes et varient d'un produit à un autre et d'une région à une autre. Si la technique de réfrigération demeure la méthode la plus utilisée pour ralentir l'évolution rapide du produit récolté, son association avec la modification de l'atmosphère entourant le fruit est plus efficace pour la préservation de la qualité du produit stocké. Cependant, l'handicap majeur pour la généralisation de la technique pour les autres produits ou pour sa mise en oeuvre dans les pays en développement repose sur le fait qu'il nécessite une infrastructure très chère et demeure une technologie onéreuse pour l'installation et la maintenance. La modification de l'atmosphère par la raréfaction de l'oxygène et l'enrichissement en dioxyde de carbone a été décrite comme une alternative pour le stockage des produits sans le froid. Le fait de remplacer la conservation en atmosphère contrôlée par un simple emballage semblerait être un grand potentiel économique dans la manutention après récolte des produits. L'un des objectifs de notre travail est de développer une méthode qui permet l'optimisation de l'emballage de certains produits horticoles frais et d'évaluer l'effet des conditions créées sur la qualité du produit conservé.

La méthode empirique d'emballage des fruits dans un film en polyéthylène de basse densité et la variation soit du poids des fruits ou de la surface du sachet plastique nous a permis de développer des équations mathématiques caractérisant l'intensité de la respiration des fruits emballés et conservés à une température donnée. Les résultats des différents essais réalisés sur deux fruits climactériques (pomme et tomate) et un fruit non climactérique (clémentine) montrent que la méthode constitue une approche valable pour optimiser un modèle d'emballage pour les fruits en question. Cette méthode donne aussi une grande marge de sécurité pour le choix des différents paramètres, à savoir, d'une part, la constante du film qui regroupe l'épaisseur, la surface et la perméabilité au gaz et, d'autre part, le poids des fruits à emballer et les concentrations en gaz à l'équilibre à la température donnée. Avec le développement croissant de la technologie, il serait possible de produire industriellement des films plastiques qui correspondraient à la respiration du fruit à emballer.

L'emballage des fruits dans un film plastique en polyéthylène à basse densité a permis un maintien de la fermeté, de l'acidité et de la couleur des fruits. Les conditions atmosphériques obtenues par l'emballage ont permis d'augmenter la longévité des fruits de clémentine, dans certains cas, à plus de 2 mois contre quelques semaines, voire quelques jours pour des fruits non emballés. Dans certains cas, la durée de conservation est de plus de 80 jours à la température de 16 à 20 °C et ceci pour plusieurs essais et durant 3 saisons. La meilleure composition se situe entre 3 à 5 % d'oxygène

et de 3 à 5 % de dioxyde de carbone. Il est à noter que certains fruits, après une longue période de stockage, tendent à développer une odeur de fermentation. Cette odeur tend à disparaître si les fruits sont maintenus à la température ambiante pendant 3 à 4 jours. Dans le cas où la fermentation est déjà installée, les fruits stockés deviennent inconsommables. L'odeur de l'éthanol est ressentie surtout au niveau des sachets ayant un nombre de fruits élevé ou de sachets contenant un fruit attaqué par des pathogènes. La perte de poids est généralement très faible chez les fruits emballés par rapport aux fruits témoins. Pour les fruits climactériques, la tomate et la pomme, l'approche suivie pour la clémentine a donné des résultats très encourageants. La tomate a pu être conservée à température ambiante au laboratoire pour des périodes allant jusqu'à 50 jours. Cependant la durée moyenne où le fruit ne présente aucune altération de sa couleur ou de sa qualité se situe entre 3 et 4 semaines. Les sachets contenant un nombre de fruits élevé entraînant la teneur en oxygène à l'intérieur du sachet inférieure à 2 % ou celle de dioxyde de carbone supérieure à 5 % présentent des tomates d'une coloration hétérogène et d'une qualité médiocre. Les conditions favorables pour la tomate varient de 3 à 5 % d'oxygène et de 2 à 5 % de CO<sub>2</sub>. L'introduction des scrubbers (MgO) ou CaCl<sub>2</sub> à l'intérieur des sachets tend à maintenir la teneur en dioxyde de carbone à des niveaux plus bas. La quantité de scrubbers à utiliser pour contrôler le CO<sub>2</sub> est fonction de la perméabilité du film plastique, de la respiration du produit et du niveau du gaz escompté à l'intérieur du sachet. L'effet de l'atmosphère modifiée sur l'importance des pourritures dues aux



agents pathogènes est complexe. D'une part, l'emballage en atmosphère modifiée inhibe la sporulation des champignons et limite la propagation des pathogènes grâce à la barrière que constitue le film. D'autre part, l'atmosphère modifiée a tendance à favoriser le développement des maladies à l'intérieur du sachet grâce aux conditions créées à l'intérieur du sachet, à savoir une humidité relative élevée et des concentrations en dioxyde de carbone qui rendent vulnérables les tissus des produits. L'approche décrite dans les différents rapports de ce contrat permet le choix du film à utiliser et l'optimisation du rapport caractéristique du film et du poids des fruits par sachet. Les abaques développées permettent la prédiction pour le fruit et le film donnés, la composition de l'atmosphère modifiée en fonction des caractéristiques du film et du poids des fruits par sachet.

### *L'enrobage des fruits par le semperfresh*

L'enrobage des fruits par le semperfresh (produit non toxique à base d'esters de polysaccharides) tend à modifier directement la composition de l'atmosphère à l'intérieur du fruit. En effet, l'enrobage crée une mince couche ou barrière autour du produit traité, ce qui modifie les échanges gazeux de ce dernier avec l'atmosphère environnante. L'application du semperfresh par trempage des fruits d'agrumes, en particulier la clémentine et la pomme "Golden delicious" a pour conséquence :

- un maintien de la coloration du fruit. La disparition des pigments chlorophylliens et la synthèse des caroténoïdes sont ralenties;
- un maintien de la fermeté des fruits et la préservation de la qualité des fruits; et
- une réduction de la perte en poids des fruits.

En effet, le semperfresh à des concentrations allant de 1 à 4 % permet la modification de l'atmosphère à l'intérieur des fruits et la barrière semi-



*Figure 1 - Le transport de la récolte.*

perméable formée sur la peau a pour conséquence un ralentissement des réactions biochimiques associées à la respiration et à la transpiration. Le maintien de la fraîcheur et de la fermeté des fruits est corrélé positivement avec la concentration du produit utilisé. Cependant, les résultats de certains essais montrent que les concentrations de semperfresh supérieures à 5 % tendent à augmenter la perte en poids des fruits et, dans certains cas, l'attaque des pathogènes est favorisée par le milieu nutritif constitué par le traitement. Dans ce dernier cas, l'addition d'un produit anti-fongique permet de réduire ce problème.

### *L'utilisation du calcium en post-récolte*

La date de cueillette des pommes demeure l'une des préoccupations des producteurs de pommes au Maroc. En effet, vu les surfaces importantes à récolter dans certaines régions, il est souvent difficile de respecter la date optimale de la cueillette d'une variété. Pour pallier ce problème, on procède à l'échelonnement de la date de cueillette. La récolte précoce a pour inconvénients l'apparition de nombreuses anomalies physiologiques comme les taches amères et l'échaudure sur les fruits. Alors que les fruits récoltés tardivement entrent directe-

ment dans la phase de sénescence. Ces fruits sont moins fermes, moins acides et plus vulnérables aux différents agents pathogènes.

Dans les régions montagneuses du Maroc, surtout à Oulmès, le problème de la nutrition minérale, en particulier celle du calcium pour les arbres fruitiers, se pose aux producteurs. L'apport du calcium en pré- ou post-récolte a pour conséquence une augmentation de la teneur en calcium au niveau du fruit et réduit par ailleurs les différentes anomalies liées à sa déficience. Il est bien élucidé que le calcium participe à, ou contrôle directement ou indirectement, plus de 20 réactions biochimiques au niveau du tissu végétal. L'étude de la répartition du calcium au niveau du fruit révèle une répartition inégale. En effet, le cortex externe est le moins riche par rapport à la peau, au cortex interne et au cœur du fruit. Ces gradients indiquent l'existence de mouvements continus de cet élément au niveau du fruit et la direction du mouvement est fonction du stade de maturité. La teneur faible en calcium du cortex externe est souvent la cause de l'apparition des taches amères à ce niveau. L'amélioration du niveau du calcium au niveau du cortex externe aura pour conséquence la réduction de cette anomalie physiologique.

L'apport du calcium par trempage des pommes dans des solutions contenant de 1 à 8 % de Ca a amélioré sensiblement la teneur en calcium des fruits traités par rapport aux fruits non traités. L'augmentation de la teneur en calcium au niveau du tissu est proportionnelle à la dose de traitement et à la durée de conservation. Les taux d'augmentation les plus élevés ont été obtenus avec les doses de 3 à 8 %. Le calcium retenu au niveau de la cuticule pénètre lentement à l'intérieur du fruit. La stabilisation de la teneur n'est atteinte qu'après 120 jours de conservation. Ceci indique que le calcium nécessaire au niveau du cortex externe durant les deux premiers mois de stockage (période d'apparition des taches amères) provient directement de la peau. Parallèlement à l'amélioration de la teneur en calcium du fruit, une nette diminution des rapports K/Ca, Mg/Ca et (K+Mg)/Ca a été observée.

Les fruits traités au calcium retiennent leur fermeté plus que les fruits non traités. Après 120 jours de stockage, le traitement avec 5 % de calcium procure une fermeté égale à celle des fruits non traités après seulement 60 jours de conservation. De même, l'incidence des troubles physiologiques, notamment les taches amères et l'échaudure est moindre avec le traitement au chlorure de calcium. La réponse au traitement est fonction de la variété et de la sensibilité de celle-ci aux attaques précitées.

### La protection phytosanitaire au niveau des stations d'emballage

La protection des fruits destinés à la conservation et/ou à l'exportation constitue l'une des techniques les plus importantes pour réduire l'incidence des pourritures. La lutte contre ces agents de pourriture est basée surtout sur l'emploi des pesticides. Cependant, à cause de la méfiance du consommateur vis-à-vis des résidus de ces pesticides au niveau du fruit et dans l'environnement et afin de réduire le



Figure 2 - Clémentine conservée -  
durée 60 jours, t° de stockage jour 23°C, nuit 16°C.

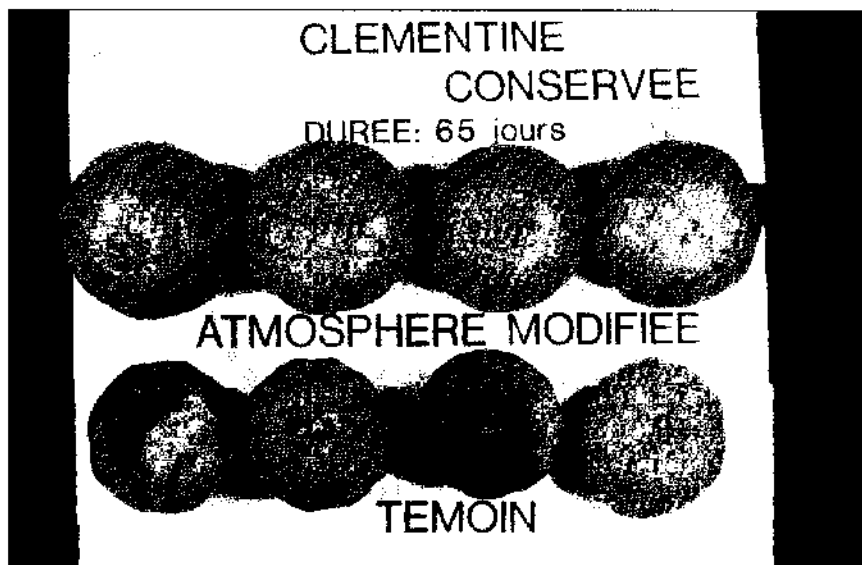


Figure 3 - Clémentine conservée -  
durée 65 jours, atmosphère modifiée, témoin t° ambiante.

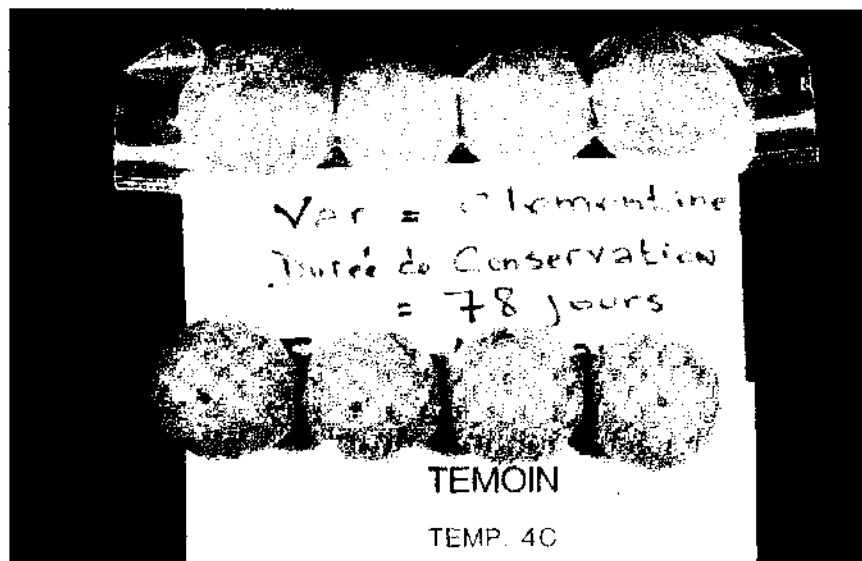


Figure 4 - Clémentine conservée -  
durée 78 jours, témoin 4°C.

risque de résidus au niveau des fruits d'agrumes, l'objectif est de faire diminuer la quantité et la dose des produits utilisés. L'étude de l'efficacité de certains produits (Benomyl, thiabendazole et imazalil) homologués pour l'utilisation en post-récolte a montré que l'imazalil a une activité contre le *Penicillium digitatum* supérieure à celle des deux autres fongicides. Cette supériorité se manifeste, d'une part, par l'inhibition de la croissance et l'empêchement de la sporulation du pathogène et, d'autre part, par la protection des fruits contre les infections ultérieures (traitement préventif réalisé 12 heures avant inoculation) et l'éradication totale des infections déjà installées (traitement curatif réalisé 24 heures après inoculation). Les résultats de cette recherche nous amènent à recommander l'utilisation de 250 ppm de l'imazalil en poste séparé dans les stations de conditionnement au lieu de plus de 2000 ppm utilisés avec la cire actuellement. L'utilisation de l'imazalil aura pour conséquence de briser voire de réduire le nombre de souches de *P. digitatum* et de *P. italicum* dites résistantes au TBZ. A côté de l'amélioration des techniques d'application des traitements, le contrôle sévère des conditions d'hygiène des stations de conditionnement et la recherche des antagonistes des pathogènes s'imposent.

## Publications

### ■ Publications scientifiques

Ait-Oubahou A., 1989. Récolte et mûrissement de la banane au Maroc. Colloque sur la situation actuelle et les perspectives d'avenir de la banane sous serre au Maroc. Ait Melloul, Agadir, 22-24 février.

Ait-Oubahou A., 1990. La conservation et le conditionnement des fruits et légumes au Maroc. Séminaire sur la post-récolte en Afrique. Abidjan, Côte d'Ivoire (communication orale), 27 janvier-2 février 1990.

Ait-Oubahou A., 1993. Postharvest losses of citrus and tomato fruits. Annual report of the collaborative research network. MAICH, Chania, Crete, Greece (in press).

Ait-Oubahou A., El-Otmani M. and Ndiaye A.M., 1990. Use of semperfresh (a polysaccharide ester) on Valencia orange. 23rd International Congress of Horticulture. Firenze, Italy. August 27-Sept. 1, 1990 (abstract).

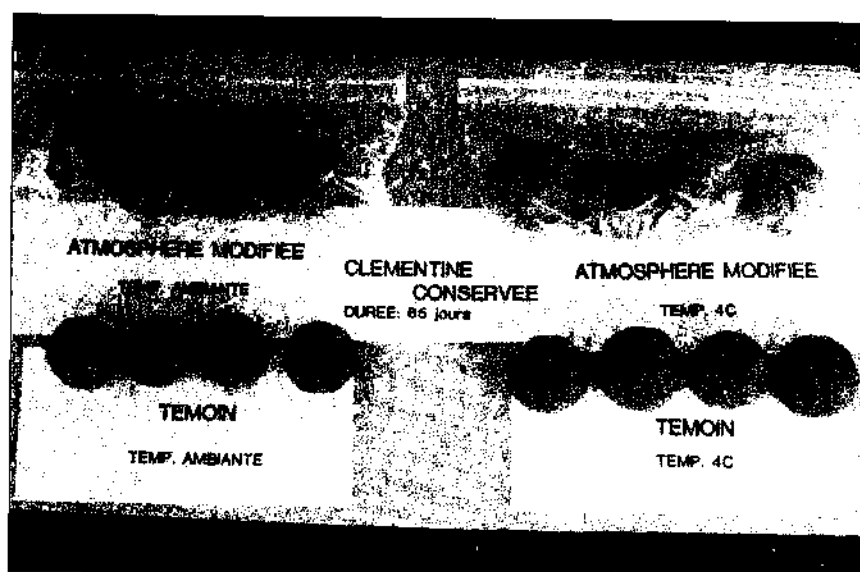


Figure 5 - Conditions de stockage des clémentines.

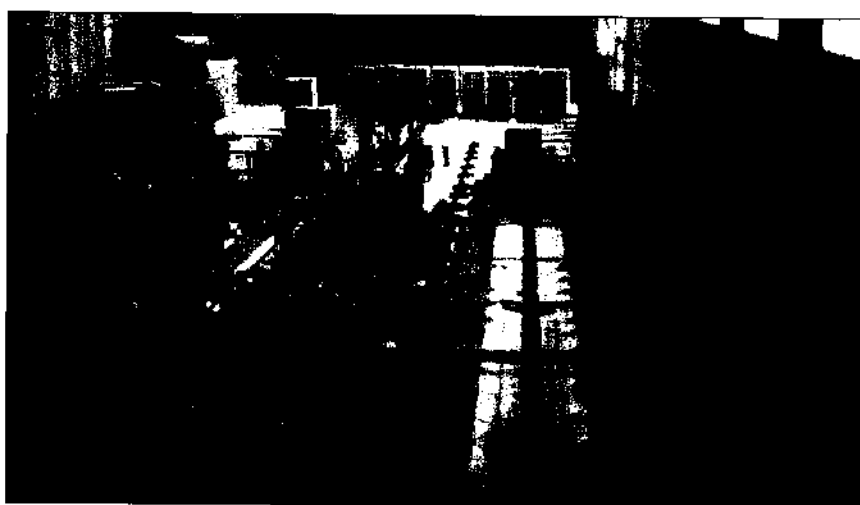


Figure 6 - Station d'emballage.

El-Otmani M., Ait-Oubahou A. and Ndiaye A.M., 1990. Postharvest use of polysaccharide coatings on Clementine orange fruits. 23rd International Congress of Horticulture. Firenze, Italy, August 27-Sept. 1, 1990 (abstract).

Ait-Oubahou A., Dilley D.R. and Cameron A., 1991. Modified atmosphere packaging of Empire and McIntosh apple fruit. ASHS abstracts. Penn. State, PA, USA, July 19-July 23.

Ait-Oubahou A., El-Otmani M. and Lahjouji K., 1991. Modified atmosphere packaging techniques for Clementine orange fruit. ASHS abstracts, Penn. State, PA, USA, July 19-July 23.

Ait-Oubahou A., El-Otmani M. and Ndiaye A.M., 1991. Semperfresh coating on lemon orange fruit. ASHS abstracts, Penn. State, PA, USA, July 19-July 23.

Ait-Oubahou A., El-Otmani M. and Lahjouji K., 1992. Modified atmosphere packaging of clementine mandarin fruit. Proceedings of the

VII International Citrus Congress, Acireale (Italy), March 8-13, 1992.

Ait-Oubahou A., El-Otmani M., Charhabaili Y., Fethi J. et Bendada M., 1994. Effet de la date de cueillette et du traitement au calcium en post-récolte sur la qualité des pommes en conservation. Proceedings of the International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities. Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

Ait-Oubahou A., El-Otmani M., Charhabaili Y. et Laamini M., 1994. Utilisation d'un enrobage à base de polysaccharides pour la conservation des pommes et du concombre. Proceedings of the International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities. Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

El-Otmani M., Ait-Oubahou A. et Naim Z., 1994. Effet du stade de récolte et d'un enrobage

à base de polysaccharides pour la conservation de la clémentine. Proceedings of the International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities". Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

Imani Y. and Ait-Oubahou A., 1994. Caractérisation et méthodes de contrôle des dégâts de froid chez le concombre. Proceedings of the International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities". Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

Achouri M. and Ait-Oubahou A., 1994. Application de l'imazalil en traitement séparé du cirage dans le conditionnement des agrumes.

Proceedings of the International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities". Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

Achouri M., Ait-Oubahou A. et Laville E., 1994. Evolution des populations de *P. digitatum* et de *P. italicum* dans les stations de conditionnement d'agrumes du Sud marocain. Proceedings of the International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities". Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

Zouggarh E., Achouri M., Ait-Oubahou A., El-Otmani et Sebbata A., 1994. Dégradation de deux insecticides, déltaméthrine et fenthion dans les fruits d'agrumes. Proceedings of the

International symposium on "Postharvest Physiology, Pathology and Technologies for Horticultural Commodities". Agadir, Morocco, January 16-22 1994.

Numéro de contrat : TS2-A-245  
Contract number :

▼ TITRE : **Les cotonniers glandless, source d'huile et de protéines de grande valeur pour l'alimentation humaine et animale. \***

Title : *Glandless cotton plants, a valuable source of oil and proteins for human and animal consumption.*

▼ CHEF DE PROJET : Catherine Marquie  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD.  
Host institution :

▼ ADRESSE : BP 5035,  
Address : 34032 Montpellier Cedex 1, France.

▼ TELEPHONE : +33-67-61 71 10

▼ FAX : +33-67-61 56 67 - Tx : 480762F

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated institutions :

- Côte d'Ivoire : Institut National de Santé Publique, Laboratoire Central de Nutrition Animale.
- Burkina Faso : Institut National d'Etudes et de Recherches Agricoles, Ministère de la Santé et de l'Action Sociale.
- Bénin : Direction de la Recherche Coton et Fibre.
- Togo : Les Nouvelles Industries Oléagineuses du Togo.
- Royaume-Uni : Université de Saint Andrews.

▼ MOTS CLES : coton glandless; graine; amande; nutrition; technologie; acceptabilité; transformation artisanale.  
Key words : *glandless cotton; seed; kernel; nutrition; technology; acceptability; traditional processing.*

▼ RAPPORT FINAL : 102p. Français.  
Final report :

\* voir aussi Publication STD1, 1989; projet TSD-078, p. 685

# Les cotonniers glandless, source d'huile et de protéines de grande valeur pour l'alimentation humaine et animale

L'objectif de ce projet était de susciter la production et l'utilisation des dérivés des graines de cotonnier glandless, riches en huile et en protéines, dans l'alimentation de l'homme et des animaux monogastriques.

Les recherches, dont la coordination a été assurée par le Laboratoire de Technologie Cotonnière du CIRAD (France), ont principalement été conduites en Côte d'Ivoire, au Burkina-Faso, au Bénin, au Togo et en Grande Bretagne. Elles ont porté sur des études socio-économiques, d'acceptabilité, technologiques et nutritionnelles.

Les principaux résultats obtenus dans le cadre de ce programme sont les suivants.

## *Enquêtes socio-économiques et études d'acceptabilité*

Une enquête socio-économique réalisée par l'Institut national d'études et de recherches agricoles (INERA), au Burkina-Faso, durant la campagne 1989-1990 a mis en évidence une faible consommation de graines de cotonnier classiques dans les régions cotonnières. Les effets néfastes du gossypol sont neutralisés par l'utilisation de potasse. D'une façon générale, les besoins exprimés par la population ne sont pas satisfaits du fait qu'il n'existe pas de circuit de commercialisation de graines ou de farine pour l'alimentation humaine. Les populations situées dans la région cotonnière se procurent les graines auprès des éleveurs, des paysans qui ont un surplus de semences ou auprès des employés de la SOFITEX. Les graines

sont décortiquées manuellement ou mécaniquement avec un moulin à céréales et les amandes sont broyées en farine. La farine de coton est incorporée dans de nombreux plats de la cuisine traditionnelle qui sont consommés par l'ensemble de la famille. D'une manière générale, ces mets sont très appréciés. Compte tenu des difficultés pour se procurer des graines de coton, le niveau de consommation de la farine de coton (d'après une estimation portant sur l'utilisation de la farine dans la préparation de sauces) ne serait que de 850 g par an et par famille.

De même que pour l'alimentation humaine, les besoins des éleveurs burkinabés en aliments pour le bétail, ne sont satisfaits qu'à moitié car les graines qui ne sont pas utilisées comme semences sont triturées pour produire de l'huile de table et des tourteaux qui sont en grande partie exportés. C'est l'Office national d'approvisionnement et de distribution en intrants zootechniques et vétérinaires (ONAVET) qui est chargé d'assurer la distribution et la commercialisation des aliments pour les animaux (graines, tourteaux ou aliment du bétail).

Beaucoup d'éleveurs sont intéressés par les aliments à base de coton mais ne les utilisent pas, soit parce qu'ils ont des difficultés pour s'en procurer, soit parce que leur coût est trop élevé (17 à 36 FCFA/kg).

L'huile de coton, produite par la Société de fabrication industrielle (SOFIB) et la Société des huiles et savonnerie du Burkina-Faso (CITEC), est commercialisée par l'intermédiaire de grossistes dans tout le pays. L'en-

quête révèle cependant que les petits marchés de brousse éloignés de la zone de production ne sont pas approvisionnés. L'huile de coton, dont le prix se situe entre celui de l'arachide et celui du beurre de karité, est surtout consommée par les citadins. Les populations rurales ayant des revenus plus faibles utilisent de préférence le beurre de karité.

*Le Burkina-Faso cultive aujourd'hui 63 000 ha de cotonniers glandless. Compte tenu du savoir faire de sa population en matière de transformation des graines de coton, il serait souhaitable de voir se développer un circuit de commercialisation des graines pour répondre aux besoins qui sont exprimés par la population.*

Le Ministre de la Santé a conduit une étude d'acceptabilité d'une farine de coton glandless délipidée, produite industriellement par TRITURAF (Côte d'Ivoire), dans la cuisine traditionnelle au Burkina-Faso.

La farine de coton est mélangée à des légumineuses et à des céréales dans cinq aliments caractéristiques de la cuisine burkinabée tels que des beignets de blé ou de haricot, la sauce à l'oscille, des boulettes de haricot et de mil. Son taux varie de 25 à 100 % (exprimé par rapport à l'ensemble des farines de la formulation).

Les dégustations ont eu lieu dans 4 provinces de la zone cotonnière et une province non productrice de coton. Elles portent sur la comparaison de 3 à 4 mets qui sont préparés avec ou sans farine de coton. Les critères d'appréciation concernent les caractéristiques organoleptiques : couleur, consistance et goût.

La population interrogée (plus de 3 000 personnes) appartient aux milieux ruraux, semi-urbains et urbains. Elle regroupe des individus d'origines ethnique et socio-professionnelle différentes.

Malgré une présentation peu favorable (couleur), les résultats montrent une excellente acceptabilité de la farine de coton dans tous les mets testés. En particulier, elle confère à l'aliment une consistance et un goût qui sont très appréciés. Bien que la farine de coton modifie la couleur des aliments en les rendant plus sombres, l'aspect reste acceptable (les notes sont toujours supérieures à la moyenne).

Le commerce de produits alimentaires à base de graines de coton peut être rentable et suscite un vif intérêt tant au niveau des transformatrices qu'au niveau des consommateurs. C'est ce que montrent, au Bénin, la Recherche coton et fibre (RCF) et le Centre d'action régional pour le développement rural (CARDER), avec une enquête économique sur les activités des groupements féminins de la région de l'Atacora.

Depuis 1991, le CARDER de l'Atacora se consacre à la valorisation alimentaire des graines de cotonnier glandless. L'objectif recherché est de former des groupements féminins sur la manière de transformer les graines de coton et de les utiliser dans la cuisine traditionnelle à la place d'arachide durant la saison où cette légumineuse devient rare et onéreuse.

Les graines de coton sont fournies gratuitement par la Société nationale pour la promotion agricole (SONAPRA) au CARDER qui en assure la distribution auprès des groupements qui les sollicitent. Il existe actuellement environ un millier de femmes qui assurent la transformation des graines de cotonnier en produits divers : beignets, gâteaux, bouillies, nougats, condiment, lait, pain, farine pour la sauce ...



Figure 1 - Transformation artisanale des graines de coton (Bénin).

Ces produits sont vendus sur les marchés avec beaucoup de succès. Des activités de transformation et de vente d'aliments "coton" commencent à se développer en Côte d'Ivoire à l'image de ce qui se pratique de façon courante dans la région de l'Atacora au Bénin.

Une analyse économique sur la filière de transformation des graines en amandes grillées, en farine pour la sauce, en dakoua (boulette à base d'amandes de coton et de céréales), en «petits cailloux» (gâteaux), en nougats, en atchomon (gâteau), en cokada (gâteau d'amandes), en condiment (afinti), montre que le commerce de ces produits est rentable. Par exemple, les gains réalisés sur la vente d'1 kg de nougats est de l'ordre de 400 FCFA.

Toutefois, les prix de revient et de vente des produits sont très variables d'une ville à l'autre.

Nous avons constaté que pour les aliments qui sont frits, les gains réalisés peuvent être faibles si l'on tient compte du prix de l'huile à friture.

La production de farine est plus rentable que celle des amandes torréfiées.

La marge brute entre la vente de farine et celle des produits qui en sont issus

est faible sinon inexistante. Toutefois, nous pensons qu'une production diversifiée permet d'écouler les produits plus rapidement.

La transformation des graines de coton glandless est en expansion. L'utilisation de farine et d'amandes, dans l'Atacora, est entrée dans les habitudes alimentaires. Malgré cela, pour optimiser encore cette filière de transformation, il reste quelques problèmes à résoudre :

- Le décorticage des graines est réalisé par concassage avec un moulin à céréales dont la location est chère (1 000 à 1 500 FCFA pour un sac de 50 kg). De plus, les meuniers sont souvent réticents car ils sont obligés de modifier les réglages de leur matériel et d'assurer un nettoyage rigoureux après chaque utilisation. De ce fait, la décortiqueuse mise au point par l'INERA, au Burkina-Faso dans le cadre de ce projet STD 2, intéresse vivement les groupements villageois de l'Atacora;
- L'extraction de l'huile, telle qu'elle est pratiquée traditionnellement au Bénin, n'est pas rentable et demande un travail pénible. Le CARDER étudie actuellement la possibilité d'utiliser une petite presse à piston conçue par un artisan de Natitingou;
- La conservation des graines doit faire l'objet d'une attention particulière.

Les activités de valorisation alimentaires des graines de coton glandless constituent une première dans les actions de développement du Bénin. Elles sont un exemple à suivre par d'autres pays producteurs de coton glandless comme le Burkina-Faso et la Côte d'Ivoire.

L'expérience béninoise en matière d'utilisation des graines de cotonnier glandless dans l'alimentation traditionnelle a fait l'objet d'une brochure éditée par le CIRAD en 1994 et destinée aux sociétés de développement, aux industries agro-alimentaires, aux groupements villageois et aux services pédiatriques. Ce document suscite actuellement une demande importante de la part d'organismes béninois, burkinabés et tchadiens.

### Les études technologiques

L'Institut national d'études et de recherches agricoles (INERA), au Burkina-Faso, a mis au point une machine mécanique pour décortiquer les graines de coton. Ce matériel présente un grand intérêt pour les groupements féminins qui assurent la transformation artisanale des graines de coton et qui, jusqu'à présent, avaient recours au moulin du village pour concasser les graines à un prix élevé (Bénin et Burkina-Faso). La décortiqueuse, qui est munie d'un système de tri des amandes entières, des brisures, des fines et des coques, peut être fabriquée et réparée dans les pays africains.

Le Centre national de la recherche scientifique et technologique (CNRST) au Burkina-Faso a consacré ses études à l'optimisation d'un procédé artisanal de fabrication de lait à partir d'amandes de coton. Deux procédés ont été retenus. Toutefois, les recherches devraient se poursuivre pour déterminer la valeur nutritionnelle du produit. Les résultats intéressent particulièrement le CARDER au Bénin qui rencontre actuellement des

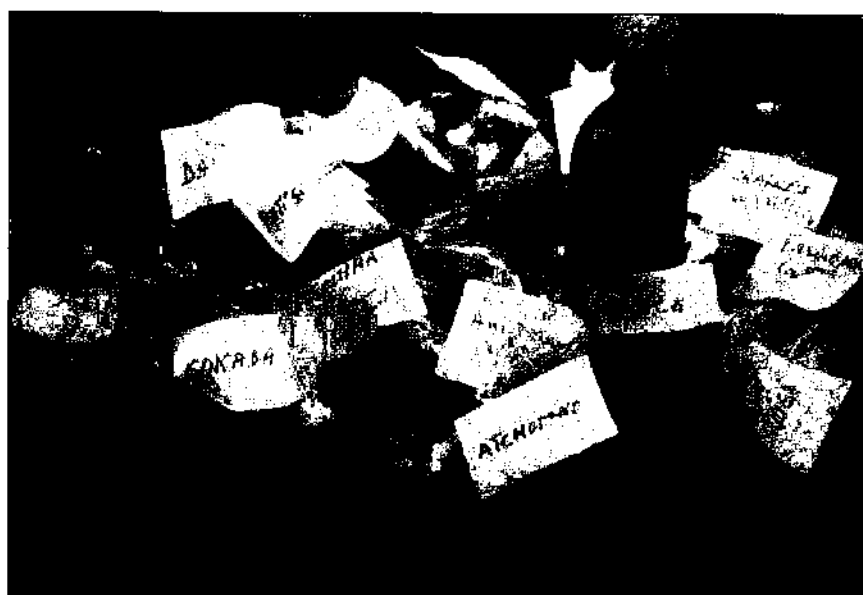


Figure 2 - Produits traditionnels de consommation incluant la graine de coton transformée.

difficultés pour conserver le lait de coton.

La conservation des amandes de coton, broyées ou non, dans les conditions habituellement rencontrées en Afrique, a fait l'objet d'un suivi chimique et microbiologique, sur une période de 6 semaines. Plusieurs types d'emballages ont été utilisés (matières plastiques, verre).

Les résultats montrent que les emballages en verre sont plus efficaces pour assurer une conservation convenable sur la période considérée. Toutefois au bout de 40 jours de conservation, une microflore composée principalement de levures et de quelques moisissures commence à se développer. Les moisissures identifiées sont des *Aspergillus flavus*.

Le risque de contamination des farines par de l'aflatoxine B1 au bout de 40 jours existe donc. Pour cette raison, les transformatrices de graines de coton auront intérêt à écouler rapidement leurs marchandises (ce qui est d'ailleurs certainement le cas).

Les Nouvelles industries oléagineuses du Togo (NIOTO) ont étudié deux procédés de trituration industrielle des graines de coton (pré-pression solvant

et expandeur-solvant) pour fabriquer des farines riches en protéines et pauvres en cellulose. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un arrangement de presse permettant la trituration des amandes sans addition de coque.

### Les études nutritionnelles

#### ■ Alimentation humaine

L'Institut national de santé publique (INSP), à Abidjan, montre que les farines de coton délipidées à l'hexane assurent un apport protéique comparable à celui des farines utilisées habituellement dans l'alimentation de sevrage des enfants. Ces farines sont également utilisables pour remplacer une part importante du lait dans une formulation adaptée au traitement de la malnutrition protéino-énergétique sévère.

Le Ministère de la Santé au Burkina-Faso a conduit, dans des conditions différentes et très difficiles, une étude similaire. La farine de coton est utilisée durant la première phase de la réhabilitation en mélange avec du lait, du sucre et de l'huile. Elle entre dans le régime administré en deuxième phase de réhabilitation, en mélange avec du mil, du sucre et de l'huile.



Dans ce dernier cas, elle assure l'essentiel de l'apport protéique de la formulation.

Les résultats ont montré que, dans le cas d'une malnutrition très grave (marasme du 3<sup>e</sup> degré), il n'est pas envisageable d'utiliser la farine de coton dans les conditions fixées par l'étude. Il serait préférable, si nous nous référons aux résultats obtenus par l'INSP (Côte d'Ivoire), d'utiliser la farine de coton en mélange avec du lait.

Cette étude a pour originalité d'être la première de ce genre menée au Burkina-Faso dans deux Centres de récupération nutritionnelle (CREN). Elle a demandé un travail de préparation important. Elle aura permis, entre autres, de mettre en place les protocoles de traitement et d'assurer une formation du personnel sur la bonne conduite d'une réhabilitation nutritionnelle.

## ■ Alimentation animale

Le Laboratoire central de nutrition animale (Abidjan) a montré la possibilité de remplacer le tourteau de soja par du tourteau de coton glandless, à raison de 20 %, dans l'alimentation du porc charcutier à condition de compléter la ration en lysine. Un accroissement de la proportion de tourteau glandless, à raison de 30 %, n'améliore pas les qualités nutritionnelles du régime.

Le projet STD 2 a permis de sensibiliser fortement les populations et les industriels à l'utilisation alimentaire des dérivés des graines de cotonnier glandless. Il a donné lieu à des recherches pluridisciplinaires et complémentaires dont les résultats sont facilement transposables d'un pays producteur de coton glandless à un autre. Déjà, des échanges entre la Compagnie Ivoirienne pour le Développement des Textiles (CIDT) et le Centre d'action régionale pour le développement rural (CARDER) au Bénin se sont concrétisés par la mise

en place d'activités de transformation des graines de coton en Côte d'Ivoire.

*Afin de faire connaître les résultats obtenus dans le cadre de ce projet STD 2, nous envisageons d'organiser, en fin d'année 1995, un colloque international à Ouagadougou. Ce colloque auquel participeront, entre autres, des industries agro-alimentaires, devrait permettre de trouver de nouveaux débouchés alimentaires pour les dérivés des graines de cotonnier glandless et d'assurer une continuité aux actions de valorisation engagées.*

## Publications

Marquie C. et Bourelly J., 1991. Dosage du gossypol par chromatographie en phase liquide à haute performance, dans les dérivés des graines de cotonnier. *Cot. Fib. Trop.*, 46, 1, 33-55.

Marquie C., 1994. La graine de cotonnier dans l'alimentation traditionnelle au Bénin. Montpellier, France, CIRAD, 42pp.

Marquie C., Segueilha L., Moulin G., Vialettes V. et Galzy P., 1993. Analyse des phytates d'une farine de graines de cotonnier par chromatographie en phase liquide. *Cot. Fib. Trop.*, 48, 2, 87-97.

Marquie C. et Tessier A.M., 1994. Détermination du taux d'huile des graines de cotonnier par spectrophotométrie dans le proche infra-rouge. *Cot. Fib. Trop.*, (en cours de publication).

Marquie C. et Vialettes V. Evolution de la teneur en acides cyclopropéniques des dérivés des graines de coton au cours de la trituration. *J.A.O.C.S.*, (en cours de préparation).

Roy C., Tebi A. et Marquie C. Utilisation de la farine de coton glandless dans la réhabilitation nutritionnelle d'enfants souffrant de malnutrition protéino-énergétique sévère (en projet).

Somda J.C. et Marquie C. Etude d'acceptabilité d'une farine de coton délipidée dans l'alimentation traditionnelle au Burkina-Faso. *Sciences des aliments* (en préparation).

Son G., Pologne J., Marquie C. et Diawara B. Conception et fabrication artisanale d'une décortiqueuse de graines de coton, *SPORE*, Revue du CTA, (en cours de préparation).

Tebi A. et Marquie C. Utilisation d'une farine de coton glandless dans l'alimentation du jeune enfant sain au moment du sevrage (en projet).

## Communications orales

Marquie C., 1992. Valorisation des sous-produits, huile et tourteaux, des cotonniers sans gossypol pour l'alimentation animale et humaine. Colloque A.T.A. au Club des techniciens du SIMA, Villepinte, Paris.

Marquie C. et Hau B., 1992. Le cotonnier sans gossypol, nouvelle ressource alimentaire. Journées d'information de l'Association française pour l'Etude des Corps Gras sur la sélection et le génie génétique pour l'amélioration des oléagineux, Hôtel Pullman, Paris.

Marquie C., 1993. Valorisation alimentaire des dérivés des graines de cotonnier sans gossypol, MJC, Clapiers.

## Rapports de fin d'études

Diawara B., février 1994. Rapport d'activité sur l'étude de conservation des amandes de coton et la fabrication du lait de coton, CNRST, Burkina-Faso, 20pp.

Djogbede J. et Adjagba G., septembre 1993. Mini-projet (STD2) de transformation traditionnelle des graines de coton sans gossypol dans l'Atacora, République du Bénin. *Recherche Coton et Fibres*, 26pp.

Marquie C., 1991. Caractérisation et dosage des acides cyclopropéniques, rapport de stage en Ecosse. Université de St Andrews, Ecosse.

Moura R. et Monthebert J.P., décembre 1993. Les graines de coton glandless : une source de protéines de haute valeur pour l'alimentation humaine et animale. NIOTO, Togo, 11pp.

Romani F. et Thiamobiga J., 1990. Consommation des sous-produits du coton au Burkina-Faso. INERA, Burkina-Faso, 88pp.

Roy C., Schoepfer M., Adou C., N'Gbo M., Kone S., Kone A., Houdier R., Darraq R. et Raffier G., décembre 1990. Utilisation de la farine de coton glandless dans la réhabilitation nutritionnelle d'enfants souffrant de malnutrition protéino-énergétique sévère, INSP, Côte d'Ivoire, 33pp.

Somda J.C., août 1993. Utilisation de la farine de coton glandless pour la récupération nutritionnelle d'enfants gravement malnourris ; étude cas-témoin dans les CREN de Gourcy et Ouahigouya (province de Yatenga). Ministère de la Santé, Burkina-Faso, 78pp.

Somda J.C., avril 1994. Etude d'acceptabilité de la farine de coton glandless dans l'alimentation traditionnelle au Burkina-Faso. Ministère de la Santé, Burkina-Faso, 67pp.

Son G., février 1994. Rapport sur l'étude d'une décortiqueuse artisanale de graines de coton, INERA, Burkina-Faso, 36pp.

Tebi A., novembre 1993. Utilisation de la farine de coton glandless dans l'alimentation du jeune enfant sain. INSP, Côte d'Ivoire, 39pp.

Zongo D. et Coulibaly M., juin 1992. Essai de substitution du tourteau de coton glandless au tourteau de soja dans l'alimentation du porc à l'engrais, LACENA, Côte d'Ivoire, 6pp.

Contract number : **TS2-A-247**  
 Numéro de contrat :

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Gasification of rubberwood for electrical power generation in a downdraft gasifier.</i></b>  |
| Titre :   | <i>Gazification du bois d'hévéa pour la production d'énergie électrique au moyen d'un gazogène à courant d'air descendant.</i>   |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | Dr. A.V. Bridgwater (Aston University),<br>Dr. Hoi Why Kong (FRIM)   |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Forest Research Institute Malaysia.  |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Kepong 52109,<br>Kuala Lumpur, Malaysia.   |
| ▼ TELEPHONE :   | +60-3-634 633  |
| ▼ FAX :   | +60-3-636 7753   |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | - U.K. : Aston University Energy Research Group, Aston University, Birmingham.<br>- Netherlands : Biomass Technology Group, University of Twente, Enschede.  |
| ▼ KEY WORDS :<br>Mots clés :                            | rubberwood; gasification; downdraft gasifier; electricity; malaysia; economics; waste.<br><i>bois d'hévéa; gazification; gazogène à courant d'air descendant; électricité; malaisie; économie; déchet.</i> |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 160p. English (+ appendices).  |

# Gasification of rubberwood for electrical power generation in a downdraft gasifier

## *Introduction*

In 1988, Malaysia's natural rubber exports accounted for 33.1 % of the total world natural rubber production, and natural rubber was the third largest revenue earner for the country in 1988. The economic lifetime of rubber trees is 25-30 years, at the end of which they are felled to make way for replanting. The average annual production of rubberwood is estimated to be about 33 million tonnes in Peninsular Malaysia, of which only 4 million tonnes are used in:

- fuel for kiln drying of timber, rubber smoking, tobacco curing and brick making;
- charcoal production for the steel industry;
- production of other value added products such as particleboard, cement board and furniture.

The increasing quantities of rubberwood residues and the growing global concern about pollution and the environment offer incentives for a solution to more efficient disposal or utilisation of these residues. The conversion of rubberwood into a more economically sound heat production and power generation system through gasification answers to the need for energy and environmental conservation.

## *Gasifier system design*

The main objective was to design and operate a simple downdraft gasifier for electricity generation using rubberwood as feedstock from which basic research data will be gathered to assist in the future implementation and dissemination of the technology in Malaysia. The design and subsequent

fabrication of the whole system as well as the experimental procedures used in procuring data for analysis are described in the references.

The gas leaves the gasifier at a temperature of between 250°C and 300°C and is loaded with dust, pyrolytic products and water vapours. It was necessary to cool and clean the gas in order to remove as much water vapour, dust and pyrolytic products as possible from the gas before it entered the engine. The gas cleaning and cooling system consists of a drum cooler, a cyclone dust collector, a box filter and a gas cooler. The engine used for the trials was an unmodified 2-cylinder 2-l Lister dual fuel diesel engine with a maximum output of 40 kWe.

## *Results*

A set of results from a typical test run is included as in fig. 1.

## *Performance evaluation of the gasifier*

The cold gas efficiency decreases as moisture in the feed increases from a maximum of 65 % efficiency of cold clean gas at 10 % moisture to a minimum of 50 % efficiency at 50 % moisture. Contrary to most cited literature, it was found possible to gasify wood with moistures of up to 52 % (wet basis), although the economics of using wood with such a high moisture content is questionable. Igniting the wood becomes increasingly difficult and the gas heating value becomes low.

Up to the design capacity of the system or about 65 % of the maximum gasifier capacity, the gas heating value and cold gas efficiency increased with an increase in dry wood capacity for all sizes of wood. Above the design capacity, the gasifier became increasingly unstable as gas flows could not be maintained resulting in gradually deteriorating performance.

The thermal efficiency of the engine was constant at around 17-18 % up to a dry wood capacity of about 65 % for all the three wood sizes. As the dry wood capacity increases beyond 65 %, the thermal efficiency of the engine was observed to fall significantly due to overload.

In dual fuel operation, a certain amount of diesel is needed to promote ignition of the fuel in the cylinder. The amount of diesel replaced by producer gas is known as the diesel displacement. Up to a dry wood capacity of about 70 %, the diesel displacement was found to improve from 65 % to 70 % as dry wood capacity increased to the maximum. This is typical for systems of this size. Beyond this capacity, the diesel displacement was found to decrease for the same reasons discussed above.

## *Economic evaluation*

In order to study the economic potential of rubberwood gasification in Malaysia, both the capital cost and the operating cost must be estimated to arrive at a production cost. The assumptions made are listed in fig. 2.

The results are summarized in Figures 3 and 4. Figure 2 shows that the cost of electricity from the gasifier

Feedstock	
Moisture content of rubberwood	10.3 % wet basis
Dry ash free wood flow rate	29.60 kg/h
Dry mass ash flow rate	0.45 kg/h
Mass flow of water in rubberwood	3.45 kg/h
Air for gasification	
Air moisture content	2.69 % by weight
Dry nitrogen content in air	74.42 % by weight
Dry oxygen content in air	22.89 % by weight
Dry air mass flow	57.71 kg/h
Dry volumetric air flow at STP	44.67 Nm <sup>3</sup> /h
Mass flow of water in air	1.55 kg/h
Product gas	
Molecular weight of dry gas	25.11
Molecular weight of wet gas	24.39
Wet volumetric flow rate	89.30 Nm <sup>3</sup> /h
Dry volumetric gas flow rate at STP	66.75 Nm <sup>3</sup> /h
Mass flow rate of wet gas	83.23 kg/h
Mass flow rate of dry gas	74.83 kg/h
Mass flow rate of water in gas	8.40 kg/h
Other products	
Dry mass flow of tar	0.98 kg/h
Dry mass flow of char	1.07 kg/h
Dry mass flow of ash	0.35 kg/h
Mass flow of water in condensate	1.68 kg/h
Balances	
Mass balance analysis	95.74 %
Energy balance analysis	96.61 %
Carbon balance	90.19 %
Oxygen balance	96.32 %
Hydrogen balance	107.94 %
Nitrogen balance	100.00 %
Water balance	201.49 %
Other indicators	
Air fuel ratio	1.95 kg/kg
Specific gasification rate	2125.7 Nm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> h
Turndown ratio	1.28
Equivalence ratio	0.37
Hot gas efficiency	64.53 %
Cold gas efficiency	60.84 %
Raw gas efficiency	70.95 %
Diesel displacement	69.09 %

Figure 1 - Summary of typical gasifier test run.

system is cheaper than the diesel system for diesel prices above MR\$35/litre. This figure assumes that all remaining factors used in the baseline assumptions remained un-

changed. The same conclusion can be drawn from Figure 4 which shows that gasification is more attractive than diesel only if the price of wood is less than MR\$120/t.

## Discussion and conclusions

There were no major problems in operating the gasifier and the instrumentation employed proved to be satisfactory. Very valuable data was acquired on the gasification of rubberwood under different operating conditions. The gasifier is considered to be adequately designed for rubberwood as feedstock. Valuable experience was gained in the design and operation of the gasifier. Although there were no major problems in operating the gasifier, a number of operational problems and possible areas for improvement were identified.

### ■ Gasifier

During the experimental programme, there was no major breakdown of the gasifier, apart from simple and occasional problems caused by air leakage and occasional careless handling of the gasifier. The inner parts of the air injector nozzles were found to have eroded and had to be replaced after 500 hours of operation.

### ■ Gas cleaning

The combination of the cyclone dust separator and the box filter was adequate as a gas cleaning system as there was no problem in operating the product gas on dual fuel. However, the presence of carbon and slag on top of the pistons indicates that carbon and tar particles were not completely removed.

It was also found that the wood and charcoal filter medium needed to be replaced every day due to large quantities of tars deposited on them. However, from the serviceability point of view, the design is very good as the filter trays can be replaced within a few minutes.

### ■ Air-gas cooler

During the experimental programme, it was difficult to obtain a gas temperature of less than 40 °C. The capacity of the cooler was probably not suffi-

Cost components, MR\$	Gasifier	Diesel
Annualised capital cost	1678	1808
Annual operating cost		
diesel fuel	7795 #	25133
wood fuel	4939	
labour	3600	1800
maintenance	1050	525
lubricants	1260	840
Total annual production cost	20322	30106
Cost per kWh at 2400 h/y	M\$ 0.242	M\$ 0.358

Figure 2 - Electricity generation costs at 35 kW<sub>e</sub>.

cient to cool the gas before introduction into the engine. Tars condensed on the vertical pipes of the air-cooled condenser were difficult to remove and the tar deposit reduced the efficiency of the cooler.

#### ■ Air-gas mixer

Control of the air-gas mixer was manual and it was found that this simple system worked very well. However, a certain degree of experience is needed to ensure that the correct mixing ratio is achieved. Automatic carburation is recommended.

#### ■ Flanges

Occurrence of air leakage through connecting flanges of the piping system. Although the leaks could be stopped by tightening the bolts, it is difficult to carry this out during operation due to concern over possible leakage of toxic gases.

#### ■ Starting fan

During start-up, large quantities of tars were found to have condensed on the fan blade and the rotor motor of the fan. The fan therefore has to be cleaned regularly otherwise the condensed tar will cause problems to the rotor motor. During the experimental programme, two fans were replaced due to problems associated with high tar levels during start-up.

#### ■ Engine

The maximum output achieved by the gasifier-engine generating system on

dual fuel was 33.5 kW<sub>e</sub> corresponding to 82 % of capacity on full diesel fuelling and close to the maximum expected capacity of 35 kW<sub>e</sub>. The average diesel displacement was 60 %. The major repair on the engine was a broken piston ring which occurred in one of the runs. After about 550 hours of operating the engine on dual fuel, there were no visible effect of producer gas on the engine valves, valve seats and guides and the injector nozzles. In view of the large number of start-ups and shut-downs, which subjected the engine to severe test, the result is therefore encouraging although the long term effects of operating the diesel engine on producer gas could not be established. There was also an increase in trace metals in the engine oil indicating a higher degree of engine wear.

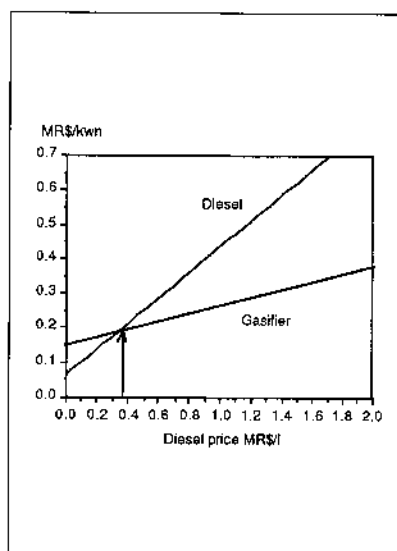


Figure 3 - Effect of different diesel prices on production cost.

#### ■ Pollution

The quantity of tar and condensate yields from the gasifier was found to be 0.35-5.97 kg/h and 0.90-8.90 kg/h respectively. For large-scale application of gasification in Malaysia the disposal of high quantities of tars and condensate would pose a major problem. So far the Department of Environment of Malaysia have only recommended incineration as the best way of disposal. However, incineration may be an expensive process and more practical solutions would have to be found such as reinjection of tars into the gasifier.

#### ■ Economics

The total cost of generating electricity from the rubberwood gasifier was found to be MR\$0.242/kWh and from the diesel system MR\$0.358/kWh under typical operating conditions in Malaysia. The gasification system/engine system for generating electricity will only be cheaper than diesel if the wood price is less than MR\$120/tonne and the diesel price is greater than MR\$35/l. The gasifier will also have to be operated for at least 3000 hours per year. The States that may have the biggest opportunity for implementing gasification technology are Johore, Negri Sembilan and Perak.

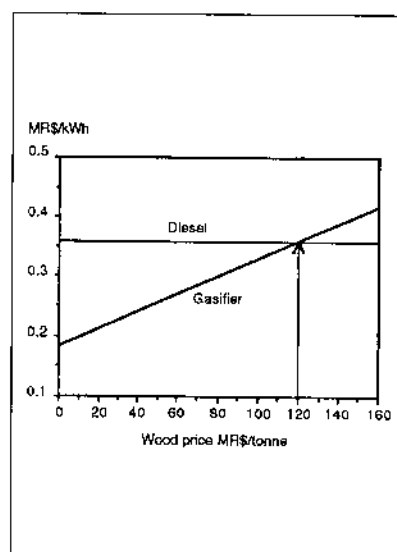


Figure 4 - Effect of different wood prices on electricity production cost.

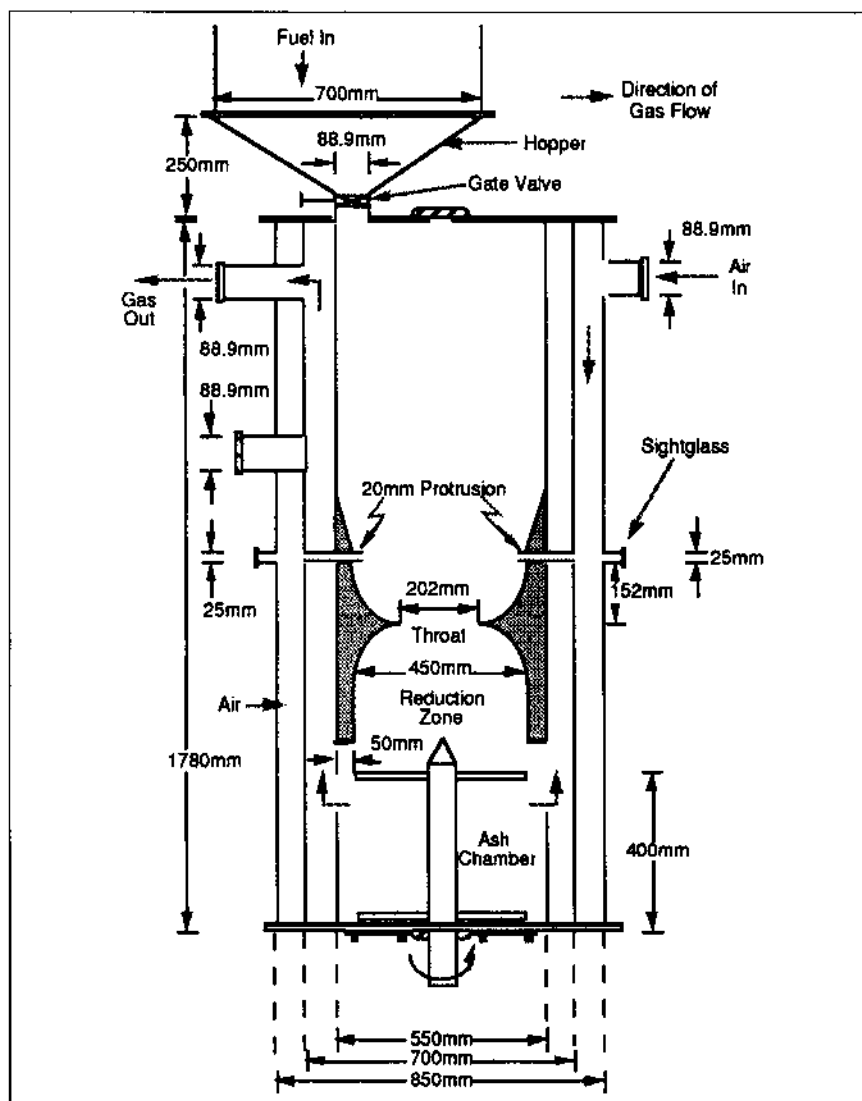


Figure 5 - Gasifier design.

## Publications

Hoi W.K. and Bridgwater A.V. Rubberwood residues for power generation. Paper presented in Regional Conference of Utilisation of Agricultural and Industrial Wastes. University Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia, March 1990.

Hoi W.K. and Bridgwater A.V. Gasification of charcoal in Malaysia. In: Pyrolysis and gasification, Eds. G.L. Ferrero, K. Maniatis,

A. Buckens and A.V. Bridgwater (Elsevier Applied Science 1989), 598-602.

Hoi W.K. and Bridgwater A.V. The use of wood as fuel in Malaysia. In: Pyrolysis and gasification, Eds. G.L. Ferrero, K. Maniatis, A. Buckens and A.V. Bridgwater (Elsevier Applied Science 1989), 411-416.

Hoi W.K. and Bridgwater A.V. Development of a rubberwood gasifier. In: 5th EC Conference on biomass for energy and industry (Elsevier Applied Science 1990).

Hoi W.K. and Bridgwater A.V. Biomass resources for energy in Malaysia. In: 5th EEC Conference on biomass for energy and industry (Elsevier Applied Science 1990).

Razak M.A., Hoi W.K., Bridgwater A.V. and Smith E.L. Biomass energy utilisation systems in Malaysia. In: 6th EEC Conference on biomass energy, industry and the environment, Eds. G. Gassi, A. Collina and H. Zibetta (Elsevier 1992), 934-938.

Hoi W.K., Razak M.A., Bridgwater A.V. and Smith E.L. Development of a rubberwood gasifier. In: 6th EEC Conference on biomass energy, industry and the environment, Eds. G. Gassi, A. Collina and H. Zibetta (Elsevier 1992), 1138-1142.

Bridgwater A.V. and Hoi W.K. Production of electricity from rubberwood by gasification. Final report, CEC (February 1993).

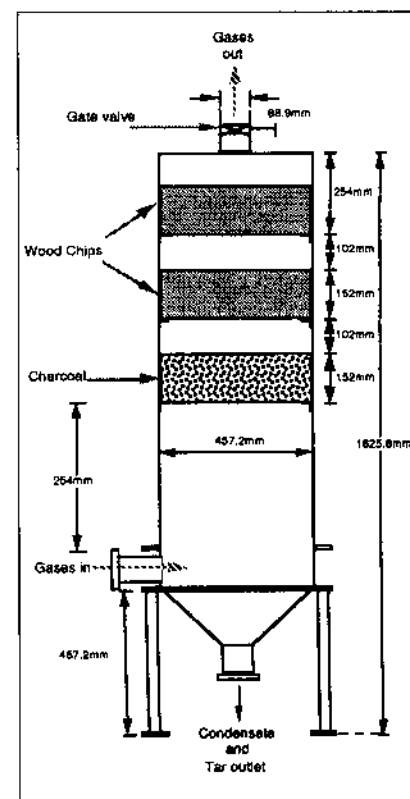


Figure 6 - Filter.

Contract number :  
 Numéro de contrat :

**TS2-A-267**

- |   |  |
|---|--|
| ▼ TITLE :   | <b><i>Evaluation and improvement of traditionally fermented cereals and legumes in Ghana.</i></b>  |
| Titre :   | <i>Evaluation et amélioration des céréales et des légumineuses alimentaires à fermentation traditionnelle au Ghana.</i>  |
| ▼ PROJECT LEADER :<br>Chef de projet :                  | P.J.A. Reilly  |
| ▼ HOST INSTITUTION :<br>Institution-hôte :              | Natural Resources Institute.   |
| ▼ ADDRESS :<br>Adresse :                                | Central Avenue, Chatham Maritime,<br>Kent, U.K.  |
| ▼ TELEPHONE :   | +44-634-88 00 88   |
| ▼ FAX :   | +44-634-88 00 66 / 77  |
| ▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :<br>Institutions associées : | <ul style="list-style-type: none"> <li>- The Netherlands : Department of Food Science, Agricultural University, Wageningen.</li> <li>- Deutschland : Institute of Hygiene and Toxicology, Federal Research Centre for Nutrition, Karlsruhe.</li> <li>- Ghana : Department of Nutrition and Food Science, University of Ghana, Legon, Accra.</li> </ul> |
| ▼ KEY WORDS :<br><br>Mots clés :                        | <p>ghana; legumes; cereals; maize; millet; cowpea; weaning foods; nutritional improvement; anti-nutritional factors; food safety; fermentation; kenkey.</p> <p><i>ghana; légumineuse; céréale; maïs; mil; niébé; aliment de sevrage; amélioration nutritionnelle; facteur anti-nutritionnel; sécurité alimentaire; fermentation; kenkey.</i></p>       |
| ▼ FINAL REPORT :<br>Rapport final :                     | 123p. English (+ annex of publications).   |

# Evaluation and improvement of traditional fermented cereals and legumes in Ghana

## Objectives of the research

---

The overall project objectives were : to review and evaluate current methods of traditional processing of fermented cereals and legumes; to determine the role of microorganisms in flavour development, nutritional properties and reduction in mycotoxins; and to determine the optimum conditions for fermentation and the suitability of starter cultures of dominant strains of microorganisms isolated for traditional products. Particular attention was to be given to increasing protein content and nutritional value of cereal-based foods by fortification with cereal/legume mixes and fermented legumes for use as weaning foods.

The work programme was focussed on four areas :

- survey work;
- evaluation and improvement of traditional cereal processing with emphasis on *kenkey*;
- evaluation and improvement of processing options for legumes (specifically cowpea);
- development and evaluation of cereal/legume based foods.

## Materials and methods

---

A wide range of materials and methods were used.

## Results

---

### ■ Survey work

Survey work was carried out in both Northern and Southern Ghana. The

data provided valuable background information on which the project could build. In addition to providing a basic characterization of the processing of the different products, the important quality characteristics, important processing stages and problems encountered by processors were determined.

### ■ Evaluation and improvement of traditional cereal processing with emphasis on *kenkey*

*Kenkey* is one of the most important maize foods in Ghana. It is manufactured mainly by women and is a basic food for low income groups (Sefa-Dedeh 1993a). A laboratory scale *kenkey* manufacturing process was developed (Nche *et al.* 1993a; Nche 1993). This was used to characterize the fermentation and determine the important product quality characteristics. These were taste, sourness, colour and consistency (Nche *et al.* 1993a). Representative microorganisms from the fermentation were isolated and characterized; to some extent this involved the development of new or improved microbiological culture media (Kohler and Holzapfel 1993a; Kohler 1994). The growth kinetics of isolates in pure and mixed cultures were determined with a view to establishing their potential as starter cultures (Kohler 1994).

Unit operations in *kenkey* processing were investigated with a view to optimizing the process. Under the optimized conditions, soaking and fermentation could be reduced from 72-144 hours to 48 hours. The conditions were : soaking temperature 29 °C (room temperature), soaking time 17 hours, moisture content at start of

fermentation 55 % and fermentation time 31 hours. Other techniques such as crushing maize and pre-gelatinizing the starch by steam injection also caused the maize to ferment to a greater extent in a shorter amount of time (Sefa-Dedeh 1993b). The effects of fermentation on digestibility were determined (Nche 1993; Nche *et al.* 1993b) and it was found that the greatest improvement in digestibility was caused by steeping. The possibility for manufacture of products with higher economic value may result from interest expressed by Lever Brothers, Ghana and Unilever Research, The Netherlands in the development of novel industrial processes for *kenkey*. A dehydrated product was developed which provides the consumer with an immediate convenience product avoiding the time consuming and laborious activities of steeping, fermentation and aflatoxins cooking. Some of these convenience type products have been tested with consumers in Ghana. During this work, the effects of water activity and pH on the growth of lactic acid bacteria were determined (Aarntzen 1992; Nout 1992).

Safety aspects of the maize fermentation were investigated because of the potential risks posed to human health by traditionally processed foods. From the point of view of toxic microbial metabolites, i.e. biogenic amines and ethyl carbamate, all-maize *kenkey* can be considered quite safe (Ruikes 1992; Nout *et al.* 1993). Aflatoxin formation during maize harvesting and handling and storage is possible. In an investigation of the effects of *kenkey* processing on the aflatoxin content of naturally contaminated maize, it was shown that boiling is the key step in removing aflatoxins (Westby *et al.*



1993). The ability of lactic acid bacteria from fermented foods to inhibit the growth of pathogenic bacteria was investigated (Kohler and Holzapfel 1993b). In most cases acids were responsible for the inhibitory effects observed, but in a small number of cases bacteriocin-like compounds may have been involved. It was also demonstrated that lactic acid bacteria isolated from fermented foods could degrade the mycotoxins alternariol and alternariol monoethylether by more than 50 %.

The processing of other traditionally processed cereal foods in Ghana such as baked aboloo (Van Haaster 1992; Rutten 1993; Sefa-Dedeh 1993c), koko (Nyako 1992) and *fula* was also investigated to a lesser extent (Nyako 1993).

#### ■ Evaluation and improvement of processing options for legumes (specifically cowpea)

Food legumes are extensively produced in all agro-ecological zones of Ghana and provide a low cost source of high protein foods, particularly for low income groups. Results of survey work show that various processing options exist for legumes in Ghana.

The effects of roasting, steaming, boiling, lactic fermentation, mould fermentation and germination were investigated for their effects on nutritional and anti-nutritional factors (Brinkman 1992; De Cock 1992; Sonnemans 1991; Willems 1990). Boiling, steaming and germination were optimized using response surface methodology (Wang *et al.* 1993a, b). The effects of roasting and lactic fermentation on microbiological stability were also determined.

The production of *tempe*, a mould fermentation product traditionally produced from soybean in Indonesia, from cowpea, the most common legume in Ghana, was investigated. A number of starter cultures were evaluated and the most appropriate selected (Westby 1989; Graffham *et al.* 1991; Graffham 1993). Studies in pure cul-

ture in defined culture media were correlated with the ability of the isolates to produce *tempe* (Graffham 1993; Graffham *et al.* 1993c, d). Two groups of organisms were identified based on their fermentation and biochemical properties. Changes in some nutritional and anti-nutritional factors were determined during the *tempe* fermentation (Graffham 1993).

The safety of cowpea *tempe* was also evaluated using two starter cultures; one which could hydrolyze starch and produce acid and the other that was non-amylolytic. Results indicated that acidic soak conditions combined with partial cooking can prevent the growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* during the *tempe* fermentation (Graffham *et al.* 1993a; Graffham *et al.* 1993b). Neither of the *tempe* moulds was able to prevent growth of the pathogens during fermentation despite the ability of one of them to produce acid.

Now that the basic characteristics of *tempe* are known and problems involved in processing it have been evaluated, the acceptability of the product can be tested.

The processing of *koose*, a traditional snack food made from cowpea, was investigated, the socio-economics of processing were evaluated and processing steps optimized (Dijkhuis 1992; Van Dijk *et al.* 1992). Various cowpea varieties were evaluated for their ability to produce *koose* and one variety, Bengpla, proved to have all desirable characteristics valued by consumers (Zuidhoff 1993; Nyako and Nout 1993).

#### ■ Development and evaluation of cereal/legume based foods

The protein content of maize foods is generally accepted to be low. In some situations it would be advantageous to supplement traditional maize foods with legumes to increase the protein content. The fermentation of maize supplemented with cowpea was investigated and it was found that in general the

fermentation of maize/cowpea mixtures was slow because buffering capacity was higher (Nche *et al.* 1993a). The addition of cowpea to maize caused a significant increase in the levels of biogenic amines. It may be necessary to combine the introduction of cowpea with starter cultures of lactic acid bacteria that do not produce, or are able to degrade biogenic amines (Ruikes 1992; Nout *et al.* 1993).

The effects of unit operations on nutritional and anti-nutritional factors in maize, cowpea and their mixtures were determined. The effects of simple processing operations on trypsin inhibitor and phytic acid were determined. Lactic fermentation showed some potential for reducing these factors because single isolates were generally able to degrade them to some degree in media developed for this study (Kohler and Holzapfel 1993c,d,e,f).

The effects of processing options on nutritive factors of cereal/cowpea mixtures were evaluated. Work focused on the effects of roasting, germination and lactic fermentation on nutritional properties and microbiological safety of weaning porridges made from these mixtures. Work included a literature survey (Nout 1993; Van Genuchten *et al.* 1992) and laboratory studies (Sonnemans 1991; Willems 1990; Brinkman 1992; Nche *et al.* 1993b; Wanink *et al.* 1993). Methods for assessing the digestibility of cereal/legume products were developed and evaluated (Nche *et al.* 1993c; Maessen 1992; Tewarie 1991; Van der Sluis 1993; Erdelmann 1991).

Acceptability trials on cereal/legume mixtures were carried out by Ghanaians (Nche *et al.* 1993) and in a medical research institute in Ghana (Brinkman 1993). Kenkey prepared from maize and cowpea mixtures was generally acceptable with the exception of kenkey containing wholegrain red cowpea, which was rejected on account of its brown colour. Infants in Accra accepted koko prepared from cereals and legumes. However, their mothers preferred traditional *koko*.

## Conclusions

The project succeeded in reviewing and evaluating current methods of traditional processing of fermented cereals and legumes through survey work and laboratory studies. The roles of microorganisms in food safety, changes in nutritional properties, reduction in anti-nutritional factors and reduction in mycotoxins have been determined. Changes occurring during natural fermentation of maize such as during the *kenkey* fermentation were determined and compared to those occurring when cowpea was added to improve the protein content.

There is industrial interest in producing a more convenient form of *kenkey*. Studies were undertaken with respect to this and it is likely that an industrial process will be realized during 1993. The *kenkey* process has been reviewed with respect to safety aspects and any future commercial operations will have a firm basis from which to maintain or improve quality.

A wide range of processing options for legumes have been investigated and a number of simple village operations have been optimized to reduce anti-nutritional factors and to maximize nutritional value. *Tempe* processing has been evaluated from cowpea, and with the correct starter cultures there are prospects for its adaptive transfer to Ghana.

Legume supplemented cereal foods have been evaluated. The prospects for use of such foods for feeding infants look promising.

In addition to the scientific objectives achieved, the project assisted in strengthening the research capacity of the two institutions in Ghana and in developing institutional links between the three European organizations and partners in Ghana. The project provided an opportunity for exchange of research staff between all organizations involved and for joint publication and dissemination of research results

at a Workshop in Tanzania on Traditional African Foods - Quality and Nutrition, that was organized by project staff.

## Publications

Aarntzen M., 1992. Melkzuurbacteriën uit de *kenkey* fermentatie en hun groei snelheid bij verschillende pH's (Effect of pH on specific growth rate of lactic acid bacteria isolated from the *kenkey* fermentation). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.

Brinkman C., 1992. Ontwikkeling van gefermenteerde kindervoeding op basis van soja en sorghum (Development of fermented weaning food based on soya beans and sorghum). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.

Brinkman C., 1993. Feeding during acute diarrhoea - a study using lactic acid fermented weaning food in Ghana. Internal report of research done at Noguchi Memorial Institute for Medical Research, Legon, Ghana and Agricultural University Wageningen.

De Cock E., 1992. De invloed van roosteren op de afdoening van micro-organismen (Effects of roasting on the thermal destruction of micro-organisms). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.

Dijkhuis M., 1992. Traditional processing of koose, a fermented cowpea cake. Internal report of research done at Department of Biological Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, Ghana and Agricultural University Wageningen.

Erdelmann F., 1991. Een in vitro methode om de (on)-verteerbaarheid van koolhydraten te meten (An in vitro method to measure the (in)-digestibility of carbohydrates). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.

Graffham A.J., 1993. Effect of tempe moulds on the nutritional quality of cowpea during solid substrate fermentation. Ph.D. thesis in presentation.

Graffham A.J., Owens J.D., Gordon M.H. and Westby A., 1993c. Nutrition of tempe moulds. Manuscript in preparation.

Graffham A.J., Owens J.D., Gordon M.H. and Westby A., 1993d. Distinguishing tempe moulds from the tempe fermentation using APIzyme. Manuscript in preparation.

Graffham A.J., Owens J.D., Gordon M.H. and Westby A., 1991. Nutrition of mucoraceous moulds associated with tempe. Poster to be presented at the Annual Meeting of the Society for Applied Bacteriology, University of Bristol, July 1991.

Graffham A.J., Owens J.D., Gordon M.H. and Westby A., 1993b. Growth and toxin formation by *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* during the processing of tempe from cowpea and soybean by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 and *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. Manuscript in preparation.

Graffham A.J., Owens J.D., Gordon M.H. and Westby A., 1993a. Microbiological safety of cowpea and soybean tempe. 124th Meeting of the Society for General Microbiology at University of Kent, Canterbury, 5-7 January 1993.

Kohler E. and Holzapfel W.H., 1993a. Improvement of microbiological media for studying metabolic activities of lactic acid bacteria. Food Microbiology. In preparation.

Kohler E. and Holzapfel W.H., 1993b. Influence of lactic acid bacteria from traditional fermented food from Ghana on pathogenic bacteria in vitro and in situ. In preparation.

Kohler E. and Holzapfel W.H., 1993c. Antinutritive factors and their fermentative degradation by lactic acid bacteria in maize and cowpeas from Ghana. To be presented at Food Micro 1993 in Bingen, Germany, 31 August-9 September 1993.

Kohler E. and Holzapfel W.H., 1993d. Fermentative degradation of antinutritive factors by lactic acid bacteria. To be presented at the 4th Symposium on Lactic acid Bacteria, Noordwijkerhout, The Netherlands, 5-9 September 1993.

Kohler E. and Holzapfel W.H., 1993e. Fermentative Verringerung antinutritiver Faktoren durch Milchsäurebakterien in Mais und Cowpeas aus Ghana. To be presented at 45. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Karlsruhe, Germany, 27-30 September 1993.

Kohler E. and Holzapfel W.H., 1993f. Fermentative Verringerung antinutritiver Faktoren durch Milchsäurebakterien. To be published in BFE Jahrsbericht 1992.

Kohler E., 1994. Charakterisierung von Milchsäurebakterien aus traditionell fermentierten Lebensmitteln aus Ghana sowie deren antimikrobielle Aktivität und Einfluss auf antinutritive Faktoren. Ph.D. thesis in preparation.

Maessen C., 1992. Development of an improved method for measuring gas production of *Clostridium perfringens*. M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.

Nche P.F. Effect of processing on *kenkey* characteristics. Ph.D. thesis in preparation, Agricultural University Wageningen.

Nche P.F., Nout M.J.R. and Rombouts F.M., 1993a. Effect of cowpea supplementation on the quality of *kenkey*, a Ghanaian traditional fermented maize food. Journal of Cereal Science, manuscript accepted.

Nche P.F., Nout M.J.R. and Rombouts F.M., 1993b. Effect of processing on the dietary fibre content and in vitro digestibility of *kenkey*, a Ghanaian fermented maize product. Poster, presented at "Bioavailability 93" congress, organized by the Federal Centre for Nutrition, Karlsruhe, Ettlingen, Germany, May 9-12.

Nche P.F., Nout M.J.R. and Rombouts F.M., 1993c. Gas production by *Clostridium perfringens* as a measure of the fermentability of carbohydrates and processed cereal-legume foods. Food Microbiology. Manuscript submitted.

- Nout M.J.R., 1992. Accelerated natural lactic fermentation of cereal-based formulas at reduced water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 313-322.
- Nout M.J.R., 1993. Processed weaning foods for tropical climates. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43, 213-221.
- Nout M.J.R., Nche P.F. and Hollman P.C.H., 1993. Effect of process conditions and choice of ingredients on the accumulation of biogenic amines and ethyl carbamate in kenkey made with maize and maize/cowpea mixtures. *Food Additives and Contaminants*. Manuscript submitted.
- Nyako K.O. and Nout M.J.R., 1993. Evaluation of high-yielding cowpea cultivars for their suitability to prepare koose, a Ghanaian cowpea fritter. Manuscript in preparation.
- Nyako K.O., 1992. Fermented millet foods of Ghana - Part 1 Ayuo koko - millet porridge. Internal report, University of Science and Technology, Kumasi.
- Nyako K.O., 1993. Fermented millet foods of Ghana - Part 2 Fula - mashed millet drink. Internal report, University of Science and Technology, Kumasi.
- Ruikes M.M.W., 1992. Biogene aminen en ethylcarbamaat in gefermenteerde produkten (Biogenic amines and ethyl carbamate in fermented foods). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.
- Rutten A., 1993. Aboloo processing (II). Internal report of research done at Department of Nutrition and Food Science, University of Ghana, Legon, Ghana and Agricultural University Wageningen.
- Sefa-Dedeh S., 1993a. Studies on komi. Internal report but for submission to Tropical Science.
- Sefa-Dedeh S., 1993b. Optimization of the fermentation conditions of maize dough and the development of a dehydrated fermented dough meal. Internal report but potentially for submission to Tropical Science.
- Sefa-Dedeh S., 1993c. Studies on baked aboloo. Internal report but potentially for submission to Tropical Science.
- Sonnemans L., 1991. Het effect van fermentatie op het fytienezuurgehalte in granen en peulvruchten (Effect of fermentation on the phytic acid content of cereals and legumes). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.
- Tewarie A.R., 1991. De invloed van fermentatie op de gasproductie in een *Clostridium perfringens* model voor statusvorming (Effect of fermentation on gas production in a *Clostridium perfringens* model for flatulence capacity). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.
- Van der Sluis A., 1993. An in vitro model for the human digestion of carbohydrates : absorption of monosaccharides by *Pichia etchellsii*. M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.
- Van Dijk M.A.W., Duivenvoorden J., Fritse E.M.F., Van Gennip H.A.M., Van Hal M.J.C.L., Kok M.T.C., Krick M., Nout M.J.R. and Bouwmeester H.M., 1992. Ontwikkeling van een "koose"-proces (Development of a "koose" manufacturing process). Internal research report, Agricultural University Wageningen.
- Van Genuchten L., De Greef E., Hoogland A., Schellekens E., De Vries P. and Van den Wijngaart A., 1992. De introductie van mouten als nieuwe technologie bij de bereiding van speenvoeding in Ghana (Introduction of germination in the manufacture of weaning foods in Ghana). Internal research report, Agricultural University Wageningen.
- Van Haaster J., 1992. Aboloo processing. Internal report of research done at Department of Nutrition and Food Science, University of Ghana, Legon, Ghana and Agricultural University Wageningen.
- Wang N., Lewis M. and Westby A., 1993a. Optimization of germination process of cowpea by response surface methodology. Manuscript in preparation.
- Wang N., Lewis M. and Westby A., 1993b. Effects of processing methods on nutritive and anti-nutritional factors in cowpea. Manuscript in preparation.
- Wanink J.F., Van Vliet T. and Nout M.J.R., 1993. Effect of roasting and fermentation on viscosity of cereal- legume based food formulas. *Plant Foods for Human Nutrition*. Manuscript submitted.
- Westby A., 1989. Report on a visit to The Netherlands to investigate tempe processing. NRI internal report.
- Westby A., John A.E., Reilly P.J.A. and Gibbs J.A., 1993. Fate of aflatoxins during the processing of kenkey using naturally contaminated maize. *Tropical Science*, to be submitted.
- Willems T., 1990. De invloed van fermentatie op de oligosaccharidegehalten in peulvruchten (Effect of fermentation of oligosaccharide levels in legumes). M.Sc. Thesis, Agricultural University Wageningen.
- Zuidhoff H., 1993. Evaluation of high yielding cowpea cultivars for their koose making suitability. Internal report of research done at Department of Biological Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, Ghana and Agricultural University Wageningen.

# IV

## SYSTEMES DE PRODUCTION

## PRODUCTION SYSTEMS

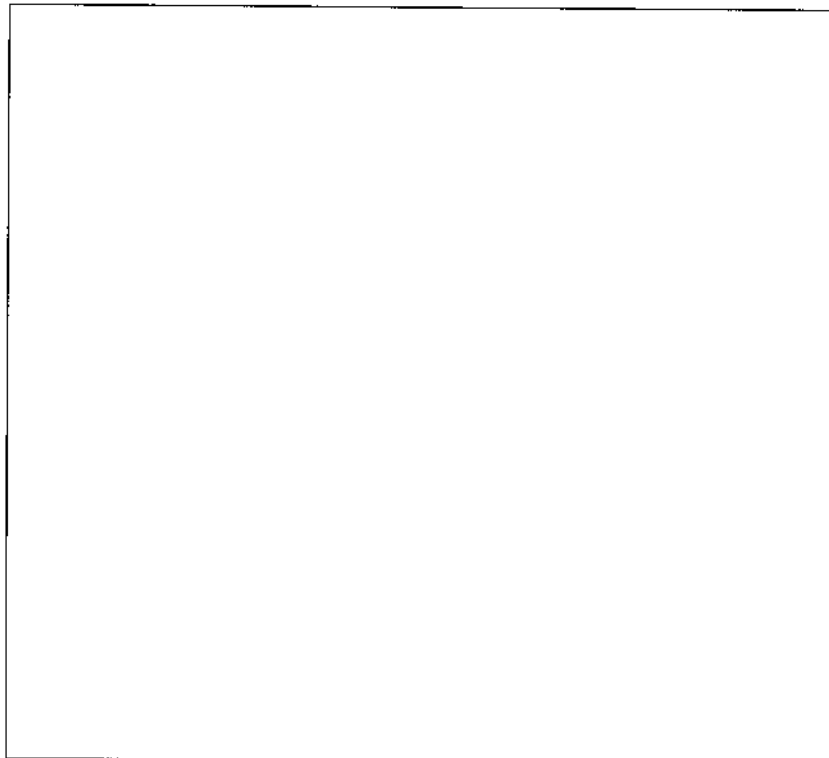


Figure 1.1: A diagram illustrating the production system. The diagram shows a large rectangular box, likely representing a production system, with a smaller box inside it. The smaller box is labeled 'Production System' and contains the text 'Production System'.

Contract number : **TS2-A-281**  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Agricultural price policy and its impact on export  
 and food crop production in Cameroon.  
 A farming systems based analysis of pricing policies.***

Titre : *La politique des prix agricoles et son impact sur la production des  
 cultures d'exportation et des cultures vivrières au Cameroun.  
 Une analyse des politiques des prix agricoles basée sur les systèmes  
 d'exploitation agricole.*

▼ PROJECT LEADER : Prof. Dr. Franz Heidhues  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : Universität Hohenheim,  
 Institution-hôte : Institut für Agrar- und Sozialökonomie in den Tropen und Subtropen.

▼ ADDRESS : Universität Hohenheim, Institut 490,  
 Adresse : 70593 Stuttgart, Deutschland.

▼ TELEPHONE : +49-711-459 25 81

▼ FAX : +49-711-459 25 82 - Tx : 7-22959 uniho-d

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :  
 - France : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD, URPA, Paris.  
 - France : Institut National de la Recherche Agronomique, Station d'Economie et de Sociologie Rurales, Montpellier.  
 - Cameroon : University Center of Dschang, Department of Agricultural Economics.

▼ KEY WORDS : agricultural price policy; economics; farming systems; export crops;  
 food crops; coffee; cocoa; cotton; cameroon; typology of farms.  
 Mots clés : *politique des prix agricoles; économie; système d'exploitation agricole;  
 culture d'exportation; culture vivrière; café; cacao; coton; cameroun;  
 typologie des exploitations.*

▼ FINAL REPORT : 154p. English & French.  
 Rapport final :

# Agricultural price policy and its impact on export and food crop production in Cameroon. A farming systems based analysis of pricing policies

## Objective of the research

The main objective of the study is to analyse the economic impact of agricultural price policy on the production of traditional export crops and food crops at the micro level. The study especially attempts :

- to describe and model the typical cocoa, coffee and cotton based farming systems;
- to analyse the factors determining the production of cocoa, coffee, cotton and food crops;
- to evaluate the effect of the introduction of improvements and innovations on the production of coffee, cocoa, cotton and food crops, on farm income, farm resource management and risk behaviour;
- to identify under which conditions agricultural price policy can in the long run encourage farmers to increase traditional export crop production without reducing the supply of food crop production.

## Materials and methods

To analyse the effects of price policy measures the project is doing research on interdependency of traditional export crops and food crops at the farm level for different regions and crops. The research, based on data from individual farms, establishes models of the traditional export and food crops systems used, in order to deduce the effects of price policy measures on production and income. In Cameroon farming systems research is still at its initial stage. In co-operation with the University Center of Dschang the

project also tries to encourage farming systems research in Cameroon. On the basis of field surveys, the proposed research establishes farm models typical for the main traditional export-oriented food crop production systems. Typical farming systems to be analysed are cotton/livestock based farming systems in the Extreme North province, coffee-based farming systems in the West, Littoral, East and North-West provinces, and cocoa-

based farming systems in the South-West province.

In the first phase a pre-survey was carried out to establish typologies of the respective farming systems based on the traditional export crops. The second phase is divided into two parts:

- detailed farm/household data collection, and;
- analysis of data and farm modelling.

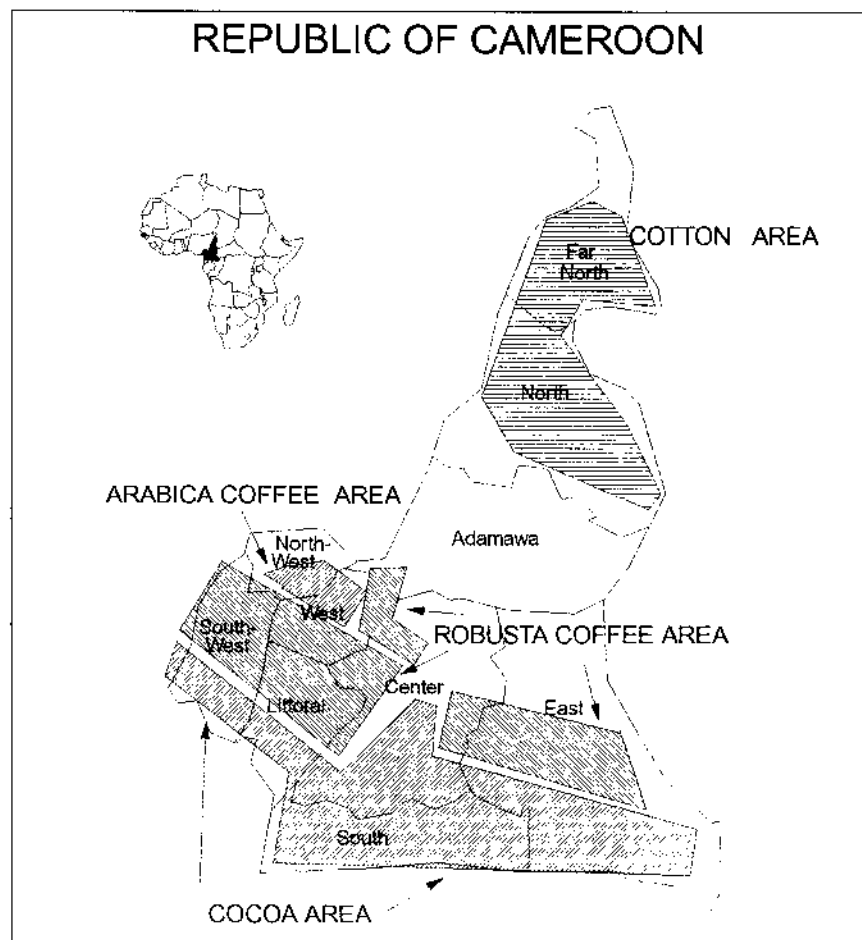


Figure 1 - Map of Cameroon with focal areas.

The data collection for each farming system was based on a field survey of about 90 farms in each survey region, randomly selected. The survey included a onetime collection of structural data, such as farm size, family size, factor endowment, socio-cultural constraints, etc.; and production related data, such as labour requirements, inputs, yields, prices, etc. The latter were collected by continuous surveying over one year. The University of Dschang guided the survey work in all regions.

In Cameroon agricultural production is based on a diversity of small-scale family farm units. The analysis of the agricultural supply response at the micro level needs an understanding of farm structures, farm activities, and farmer's objectives. The concept of farm typologies is used to classify this diversity of farms in homogenous groups, called farm types. In the respective survey areas farm typologies were established with detailed analysis of farm-household structure, farm activities and farm constraints. The linear programming models will integrate this information to simulate farmer's reaction on price changes.

## Results

### ■ Cotton area

The farm typology for cotton-based farming systems shows a grouping of farms based on their factor endowment and their level of input use. Four groups of cotton-based farms were identified:

- group of farmers using manual cultivation;
- group of farmers using animal traction but without personal plough;
- farms using animal traction and personal plough, and;
- motorized cotton production.

Part of the group of farmers using manual cultivation had settled recently (under 20 years) and part had settled a long time ago (over 40 years). Four active members cultivate 2.1 hectares. The major part of cash revenue comes

from cotton production and is invested in livestock activities. When the herd size grows and starts to produce cattle for animal traction, the farmers try to rent a plough. These farmers then constitute the second group (farmers using animal traction but without personal plough). The number of active members is significantly higher (4.5 members) than in the first group, and the cultivated area covers an average of 3 hectares. Cash income becomes increasingly important. As household size and herd size increase, the farmers purchase agricultural equipment, such as ploughs, in order to increase the cultivated area. This represents the third group of farms (farms using animal traction and personal ploughs). The cultivated area is 5 hectares with an average of 7 active persons per farm. The herd averages 9.6 TLSU (Tropical Livestock Unit), which is very large. In the southern zone, motorized cotton production (the fourth group of farmers) is possible because of low population density and a good extension service. Such farmers also have a good technical knowledge. Here the cultivated area is significantly larger (7.5 hectares) with a predominance of cotton production (3 to 4 hectares).

In Cameroon agricultural price policy was for a long time based on the setting of producer prices for the major export crops such as cotton. With the decline in world market price for cotton the producer price was reduced by 30% in 1989 (from 130 FCFA/kg to 95 FCFA/kg) and again reduced in 1992 (from 95 FCFA/kg to 85 FCFA/kg). At the same time the subsidies for inputs were progressively abandoned and today farmers pay SODECOTON a real market price, except for those farmers who still get inputs on a credit basis. In this connection it has been noted that the farming system is constantly adjusting its production strategies and its structure. It was observed that cotton-based farms using animal traction, but without a personal plough, tended to disappear and the number of manually working farmers increased. Diversification and

intensification by irrigation have become increasingly important. There has also been a marked increase in food crop production in the group of manual farmers (cow pea and maize production) together with an increase in the off-farm revenue (around 32% of total cash revenue). Cotton generates around 50% of cash revenue. With a total household cash revenue of 141,600 FCFA, cotton produces 71,500 FCFA and off-farm activities 45,750 FCFA. The fact that it is increasingly difficult to rent a plough reinforces the use of motor-pumps for onion cultivation where there is access to river water or shallow ground water. The farmers that engage in irrigation observe a significant improvement of their farm revenue. The annual cash revenue reaches 825,000 FCFA among the group of cotton farms with specialized onion production, i.e. 60% of total household cash revenue. Furthermore, livestock rearing is becoming increasingly important, mainly as a saving and anti-risk strategy. The group of motorized cotton farmers is not dealt with because of its weak representation in the survey (less than 7% of the surveyed farms and around 8% of farm area) and present working difficulties.

### ■ Coffee area

In the southern part of Cameroon ecoclimatic zones range from tropical rain forests to tropical highlands. Six major coffee production areas have been identified due to natural, demographic and socio-cultural conditions. From a total of 455 individual farm interviews, farm typologies were established for Arabica and Robusta coffee-based farms. The typology of Arabica coffee farms is based on diversification of farm activities. The typology of Robusta coffee farms is based on two elements :

- the impact of different ethnic groups on the farm organization and agricultural production in the Mounjo basin, and;
- the competition between coffee and cocoa production at farm level in the East province.

Analysis shows that there is a cash income for the majority of Arabica and Robusta coffee-based farms. Integration of modern livestock, modern vegetable production or off-farm activities reduce the importance of coffee production for the farm-household income. Productivity of Arabica coffee plots is relatively low and amounts to only 190 kg of green coffee per hectare. On average productivity of Robusta coffee plots amounts to 506 kg per hectare. In the Mounjo basin Robusta coffee production is strongly related to immigration. Analysis shows that on average immigrants obtain a coffee yield that is almost double that of the autochthonous farmers. Analysis shows that productivity of Robusta coffee and cocoa in the East province is relatively low. This is a result of the low level of modern input use. Fertilizer use has been abandoned since 1986. Farm organization is mainly determined by seasonal demand for family labour and its availability.

The economic impact of agricultural price policy on coffee-based farms in Cameroon is mainly visible at two levels :

- the impact on the use of agricultural inputs, and;
- the impact on farm production.

Analysis shows that farmers reacted to fertilizer and pesticide price increase by a significant reduction in the quantities used and some farmers stopped using them altogether. The reduction in the price paid to the coffee producer reduced the total amount of hired labour and was accompanied by a reduction in remuneration. The wages for hired labour declined between 10 and 50% due to insufficient inter-regional mobility. As a result of the cut in producer price in 1989, there was a drop in coffee production at farm level. Analysis shows a significant impact of the drop in producer prices on coffee production. In Arabica-based farms total coffee production declined by 38.6 %, and in Robusta-based farms by 47.3 %, between 1986 and 1991. Other farm and off-farm

activities have substantially gained in importance. Analysis shows that especially in the densely populated Arabica region off-farm employment enables households to meet basic needs. In the sparsely populated Robusta region off-farm activities are less important as main income source.

## ■ Cocoa area

The analysis of the impact of price policy on the economic adjustment at the farm level in the South-West province shows four main reactions :

- an increase in food crop production: some food crops (plantain and cocoyam) are complementary to cocoa production. Unused local forest resources have recently been cultivated by farmers. The labour productivity of food crop plots is very high because of the use of the initially high natural fertility of the forest land. Part of the food crop production is determined by the dynamics of the extension of the cocoa plantations. In the family farms the decline of cocoa production strengthens the search for a new regular revenue to assure fundamental needs (household consumption, health). These constraints lead to an increase in food crop production on the plantations and increased commercialization of food crop surpluses. The global increase in food crop supply (cocoyam, plantain, cassava, and maize) can partly be explained by the decline in food crop price which has taken place since 1985.
- a decline in cocoa production: the increase in food crop production within the cocoa plot leads to extensification of cocoa production by abandoning the homogenous plantation areas. This homogeneity is linked to the potential reaction of yields to the use of chemical inputs (fungicides and insecticides). The reform of co-operative law has affected the distribution of inputs and has been responsible for the recent scarcity of inputs in some areas and the disparity in prices for different types of farmers. The

reduction in the use of chemical fertilizer is the second factor that explains the decline of cocoa yields on family farms. For "enterprise-farms", increased share cropping means an increase in the cocoa area per active household member which leads to an extensification of the use of family labour.

- a change in the dynamics of pioneer farmers: in the South-West province the cocoa plantations result from the dynamics of pioneer farms induced by migrations from the West and North-West province and Nigeria. Three periods can be distinguished: a first period in the 50s and 60s with an extension of the cocoa area by the means of share cropping (Mémé Department). A second phase during the 70s and 80s when the pioneers arrived in the Fako Department where they introduced the successful "enterprise-farm" units and mobilized cheap Nigerian labour. Finally, the present period, since 1985, when the extension of enterprise farm units stopped.
- a reorientation of the farm/household objectives: the decline of revenues from cocoa production aggravated the constraint of capital liquidity and led to the search for a new regular revenue by diversification within food crop production. This growth is limited by the size of the local market. Finally the decline of revenues in the rural areas is related to the level of household and social expenditure (school fees, health, ceremonies).

## Conclusions

In Cameroon traditional export crops were of crucial importance to the integration of rural areas into a market oriented economy. Coffee, cocoa and cotton are the main income source for more than 700,000 rural households in Cameroon. These farms are facing high income losses due to the drastic decline of world market prices for the export commodities coffee, cocoa and cotton. There is much evidence that Cameroon still needs the traditional



export crops as motor in the development process.

This study draws attention to the potential conflict between the adjustment of policies in the export crop sector and its impact on coffee, cocoa and cotton based farms. At farm level, traditional agricultural export production is determined by exogenous and endogenous factors that reduce the impact of price changes. The present situation, in which the Cameroonian government reduced guaranteed producer prices and input subsidies, will

lead to a significant decline of export crop production as a result of reduced use of modern inputs and farm diversification.

### *Publications*

Kamajou F. Une analyse des principes et des programmes de l'ajustement structurel en Afrique. International Seminar of the European Association of Agricultural Economists (EAAE) on «Food and agricultural policies under structural adjustment» organized by University Hohenheim and its Center for Tropical Agriculture from September 21 to 25, 1992, Hohenheim-Stuttgart, Germany.

Fadani A. and Foko E. Economic effects of the fertilizer sub-sector reform program on coffee-based farming systems in Cameroon. International Seminar of the European Association of Agricultural Economists (EAAE) on «Food and agricultural policies under structural adjustment» organized by University Hohenheim and its Center for Tropical Agriculture from September 21 to 25, 1992, Hohenheim-Stuttgart, Germany.

Gautier D. and Fadani A. Le raphia face à la crise : production négligeable ou élément d'ajustement économique? Atelier international sur la 'Crise et ajustement dans le Cameroun rural : confrontation du local et du national', 27-29 avril 1992. Dschang, Cameroun, organisé par OCSICA, Dschang, et ORSTOM, Yaoundé.

Contract number : TS2-A-304  
 Numéro de contrat :

▼ TITLE : ***Coping with uncertainty in Africa's drylands.***

Titre : *Faire face à la précarité dans les régions sèches de l'Afrique.*

▼ PROJECT LEADER : Dr. Camilla Toulmin  
 Chef de projet :

▼ HOST INSTITUTION : International Institute for Environment and Development, London.  
 Institution-hôte :

▼ ADDRESS : Endsleigh Street 3,  
 Adresse : London WC1 HODD, U.K.

▼ TELEPHONE : +44-71-388 21 17

▼ FAX : +44-71-388 28 26

▼ ASSOCIATED INSTITUTIONS :  
 Institutions associées :

- Kenya : University of Nairobi, Institute of Development Studies.
- Zimbabwe : Farming Systems Research Unit, Department of Research and Specialist Services, Harare.
- Denmark : Centre for Development Research, Copenhagen.
- U.K. : Renewable Resources Assessment Group, Imperial College, London.
- U.K. : University College London.
- U.K. : University of East Anglia.
- U.K. : University of Oxford.

▼ KEY WORDS : dryland farming; pastoralism; drought; risk; uncertainty; farmer decision-making; zimbabwe; kenya; africa.  
 Mots clés : *culture en sec; pastoralisme; sécheresse; risque; précarité; prise de décision de l'agriculteur; zimbabwe; kenya; afrique.*

▼ FINAL REPORT : 264p. English.  
 Rapport final :

# Coping with uncertainty in Africa's drylands

## Introduction

---

The dominating influence on the farming and herding strategies of agropastoralists in African dryland areas is the low and unpredictable rainfall that characterizes such regions. These farming systems have to be highly adapted to cope with the fluctuations in crop yields, herd growth and terms of trade that are associated with environmental variability.

This research project (1990-1993) investigated the strategies used by farmers and herders in the semi-arid areas of Kenya and Zimbabwe. In each case study area, a combination of livestock and cropping enterprises was used to secure food and income needs in circumstances where rainfall is unpredictable in quantity, timing and location. Decisions about crop/varietal choice, agronomic management practice, herd composition and stocking strategies are affected by the returns to different strategies under variable conditions, the level of farmers' or herders' asset holdings and income levels, as well as the forms of social and economic networks available to them.

## Objectives

---

- To explore the way farmers and herders respond to the risks and uncertainties of dryland areas through detailed empirical case study research in Zimbabwe and Kenya.
- To examine decision-making under risk through a stochastic dynamic modelling approach and relate the model findings to empirical observation.
- To draw out the policy implications of the research findings and feed

these back to agricultural and pastoral policy-makers in Africa.

## Materials and methods

---

Case studies in Chivi communal areas, Zimbabwe, and Marsabit district, Kenya, explored agricultural and pastoral practices through extended fieldwork over 2-3 seasons. Fieldwork involved the use of a combination of participatory rural appraisal and more conventional survey and monitoring methodologies. Farmers and herders participating in the study were also involved in regular feedback and discussion meetings to appraise the research findings. Drought conditions struck both study areas during the research period, allowing contrasts to be made with the patterns in more "normal" years. Detailed monitoring of herds and flocks in both sites and analysis of cropping strategies in the Zimbabwe study area allowed a picture of agroecological dynamics to be built up. Interdisciplinary analysis allowed insights from livestock population dynamics and crop agronomy to be related to economic and social processes ongoing at local and wider levels.

In parallel to the fieldwork, mathematical models of farmer/herder decision-making were constructed using stochastic dynamic programming techniques. These models explored how different farmer objectives and constraints lead to different predicted farming or herding strategies. The model outputs were related to the detailed empirical material to assess the explanatory power of the models. The fieldwork material was then in turn used to improve the effectiveness of the models.

## Results

---

The research results can be summarised in two sections: fieldwork case studies and modelling. These activities occurred in parallel, with insights from each informing the other.

### ■ Fieldwork case studies

Fieldwork was carried out between 1990 and 1993 in both Zimbabwe and Kenya, although the Kenya fieldwork was abandoned for a period due to the security situation. The following section summarises some of the key findings of the fieldwork, drawing mainly on the Zimbabwe study.

- Activity monitoring: detailed monitoring of farming and livestock management activities revealed the importance of risk factors in sequential decision-making of farmers and herders. Data from several seasons was analysed on a plot by plot basis in Zimbabwe to reveal the differences in "agricultural performance" between sample farmers of different age, wealth status and gender.
- Crop choice, output and sales patterns: changes over 3-5 years were examined for sample households to explore trends in crop choice, output levels and sales patterns. The way these trends were related to risk patterns was explored.
- Drought coping strategies: regular discussions with farmers during the drought focused on how people and animals coped. Quantitative data on changes in livestock herds/flocks and patterns of livestock management complemented the qualitative insights. The study revealed the wide range of local coping strategies and the importance of providing support to these in drought relief programmes.
- Thematic studies: rapid rural appraisal exercises were carried out in

Zimbabwe to investigate key themes identified by other research activities. These included: the impacts of structural adjustment, soil fertility management and indigenous chicken management.

## ■ Modelling

Five models were developed during project research. Each used the stochastic dynamic programming framework to examine decision-trade-offs under risk. The first three models (below) were developed in parallel with the Zimbabwe fieldwork. A number of key trade-offs are examined. These are the trade-offs between maize and millet, cattle and goats and mixed farming. The second two models were developed in parallel with the Kenya fieldwork. One model presents a general examination of the trade-offs involved in the movement between pastoral and agricultural production strategies, the other examines trade-offs involved in livestock breeding strategies employed by pastoralists in northern Kenya. Summaries of each of the models are outlined below:

- A dynamic model is developed focusing on the choice of maize (high potential yield, but drought susceptible) and millet (low potential yield, but drought tolerant). The model illustrates that crop choice decisions aimed at ensuring long-term survival are affected by wealth levels. A discussion of both dynamically optimal and suboptimal choices illustrates how different crop mixes can be expected at different levels of wealth.
- A similar model is developed that examines the trade-off between cattle and goats, assuming an economy reliant on livestock. The optimal solution is the livestock species combination which ensures maximum household viability over time. The model suggests that keeping goats is the optimal solution at all wealth levels, as individual cattle are more vulnerable to drought impacts.
- One of the main values of cattle is for draft power. This provides the

link between the cropping and livestock sub-systems described in the previous two models. The agropastoral model examines decision trade-offs in an integrated agropastoral system.

- A general model of herding and farming as long term survival strategies is developed. The model can be used to predict which modes of subsistence we would expect to be associated with different ecological and economic conditions; and therefore to examine under what circumstances they can be expected to shift from pastoralism to cultivation or vice versa. It predicts that the shift into pastoralism is associated principally with increasing wealth.
- Nomadic pastoralists in northern Kenya sometimes reduce breeding rates in their sheep. Flocks where the breeding rate has been slowed, by restricting ewes' access to males have greater female longevity and faster growing offspring, but have fewer total offspring than the faster breeding, unmanipulated flocks. Models of profit-maximisation predict that breeding rate should never be slowed. Models of short term survival predict that breeding rate should always be slowed. Models of long term survival predict that breeding rate should be slowed only by relatively wealthy households. This is the behaviour observed, demonstrating the long-term objectives of a subsistence oriented economy.

## Conclusions

The combination of detailed empirical description from extended fieldwork and simple heuristic dynamic computer models provided a useful set of insights for explaining the temporal and spatial aspects of risk-coping strategies in dryland areas. The research results are being used to inform specific policy questions at the national level in Kenya and Zimbabwe, as well as providing wider insights into appropriate policies for coping with risk and uncertainty in dryland Africa.

## Major meetings and workshops held

Research planning meeting held in London for all research participants, plus invited resource persons, June 1990.

Workshop held in Zimbabwe to define the field research agenda attended by Zimbabwe research team, IIED plus resource persons from government departments, University of Zimbabwe and NGOs, April 1991.

Policy workshop held in Zimbabwe to feed back field results to policy makers, November 1993.

## Training support

Training in participatory and rapid rural appraisal for Zimbabwe field team.

Training in computer data entry and analysis for Zimbabwe research officers.

Training at MSc level in agricultural development and extension at Reading University for Kenyan researcher.

## Dissemination and publication

Dissemination of the research results has occurred at various levels. Farmer meetings allowed local level feedback; national workshops and seminars provided occasions for reflection on national policy issues; summaries of key issues were distributed through the IIED Drylands network, *Haramata*; formal presentation of material has occurred and is planned through international conferences and publication in academic journals; the final reports from each case are being completed and will subsequently be published.

## Project bibliography

Each of the following pieces of work has emerged as a result of the project. All have been submitted to the STD programme as part

of six-monthly reports or as part of the final technical report.

Chibudu C., 1991. Crop choices : the trade-offs between maize and millet. Paper prepared for the workshop Coping with Uncertainty : Agricultural Decision-making in the Communal Areas of Zimbabwe. FSRU/IIED, Harare.

Chikura S. and Mavedzenge B., 1991. Livestock and food security. Paper prepared for the workshop Coping with Uncertainty : Agricultural Decision-making in the Communal Areas of Zimbabwe. FSRU/IIED, Harare.

Chikura S., 1992. Impact of on-farm research on technology adoption : a case study in Mangwende. Paper presented at the Impacts of On-farm Research workshop, CYMMIT, Harare.

FSRU, 1991. Coping with Uncertainty : Agricultural Decision-making in the Communal Areas of Zimbabwe. FSRU/IIED, Harare.

FSRU, 1993. Soil fertility management by small holder farmers : a participatory rapid rural appraisal in Chivi and Mangwende communal areas. FSRU/IIED, Harare.

FSRU, 1991. Structural adjustment and communal area agriculture. Case studies from Mangwende and Chivi Communal Areas. FSRU/IIED, Harare.

Jeranyama P., 1992. Crop management research for low external input cereal production in a dry communal area of Zimbabwe. Farm-

ing Systems Research Newsletter. CIMMYT, Nairobi.

Mace R., 1993. Transitions between pastoralism and cultivation in sub-Saharan Africa. *Current Anthropology*.

Mace R., (ed.), 1994. Managing risk : pastoral strategies in northern Kenya, Part III. Coping with Uncertainty in Africa's Drylands : Report of a collaborative research programme. Final Technical Report submitted to STD, European Commission, IIED, London.

Mace R., 1993. Nomadic pastoralists reduce livestock breeding rate to promote long-term household survival. *Behavioural Ecology and Sociobiology*.

Medley P., 1992. The Analysis of Risk. Unpublished paper, RRAG, London.

Milner-Gulland E., 1994. Models of Household Decision-making under Risk : Case studies from Zimbabwe, Part II. Coping with Uncertainty in Africa's Drylands : Report of a collaborative research programme. Final Technical Report submitted to STD, European Commission, IIED, London.

Mudhara M., 1992. Characterizing the risk coping strategies of smallholder farmers in Zimbabwe's low potential environments and the implications for policy. Paper presented at the Farmer Systems Analysis for Policy Design Workshop, Arusha. FAO, Rome.

Mudhara M., 1991. The economics of input management : fertilisers. Paper prepared for the workshop Coping with Uncertainty : Agricultural Decision-making in the Communal Areas of Zimbabwe. FSRU/IIED, Harare.

Scoones I. (ed.), 1994. A hazardous existence : farming livelihoods in Dryland Zimbabwe, Part I. Coping with Uncertainty in Africa's Drylands : Report of a collaborative research programme. Final Technical Report submitted to STD, European Commission, IIED, London.

Toulmin C., 1991. Natural resource management at the local level : will this bring food security to the Sahel ? *IDS Bulletin*, 22, 22-30.

Toulmin C., 1992. Bridging the gap between top-down and bottom-up in natural resource management. In Baxter P. (ed.), *When the Grass is Gone. Development Intervention in African Arid Lands*. SIAS, Uppsala.

Toulmin C., Scoones I. and Bishop J., 1992. The future of Africa's drylands : is local resource management the answer ? In Holmberg J. (ed.), *Policies for a Small Planet*. Earthscan, London.

Toulmin C., 1993. Combating desertification : setting the agenda for a global convention. *Dryland Network Programme Issues Paper*, 42, IIED, London.

Numéro de contrat : TS2-A-321  
Contract number :

▼ TITRE : **Amélioration de la productivité des agro-systèmes à l'aide de techniques de simulation et d'optimisation.**

Title : *Improvement of agro-systems productivity through the use of simulation and optimization techniques.*

▼ CHEF DE PROJET : M. Installé  
Project leader :

▼ INSTITUTION-HOTE : Université Catholique de Louvain,  
Host institution : Laboratoire d'Automatique, de Dynamique et d'Analyse des Systèmes.

▼ ADRESSE : Avenue G. Lemaitre 4-6,  
Address : 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

▼ TELEPHONE : +32-10-47 25 94

▼ FAX : +32-10-47 21 80

▼ INSTITUTIONS ASSOCIEES :  
Associated Institutions :  
- Algérie : Institut National de la Recherche Agronomique, INRA.  
- Burundi : Université du Burundi, Faculté des Sciences Agronomiques, Bujumbura.  
- France : Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire d'Etudes Comparées des Systèmes Agraires, Montpellier.

▼ MOTS CLES : agro-système; système de production; aide à la décision; planification rurale; développement rural; optimisation; simulation; modélisation.  
Key words : *agro-systems; production systems; decision support systems; rural planning; rural development; optimization; simulation; modelling.*

▼ RAPPORT FINAL : 25p. Français.  
Final report :

# Amélioration de la productivité des agro-systèmes à l'aide de techniques de simulation et d'optimisation

## Objectifs de la recherche

Les objectifs du présent programme de recherche étaient les suivants :

- étendre les outils existants d'aide à la gestion et à la planification des exploitations d'agro-élevage dans les PVD de manière à prendre en compte les relations qui existent entre l'exploitation et les réalités socio-économiques et écologiques de la région dans laquelle elle est située;
  - concevoir et traiter un exemple d'application des outils développés à deux études de cas bien distinctes à plusieurs niveaux (réalités socio-économiques, climat, ...) : l'une en Algérie et l'autre au Burundi;
  - renforcer la collaboration scientifique et l'appréciation mutuelle entre des chercheurs appartenant à la Communauté Européenne (Belgique, France) et leurs collègues des pays en voie de développement technologique (Algérie, Burundi).
- des variables de décision consistant en des niveaux d'affectation de facteurs de production par les différents acteurs (essentiellement : sol, capital, main-d'oeuvre);
  - des contraintes sur les disponibilités en facteurs de production;
  - des relations liant les critères aux variables de décision et liant les contraintes aux variables de décision comme dans toute approche basée sur la programmation mathématique.

Cette méthode est opérationnalisée par un logiciel qui est au stade de prototype. Ce logiciel peut être exécuté sur des ordinateurs de type PC-compatible. Elle a fait l'objet de deux communications publiées dans des conférences scientifiques internationales (Pologne, Australie).

*Développement d'une méthode d'analyse multi-paramétrique des typologies comportementales des exploitants ruraux.* Cette méthode permet d'identifier des «zones de variations» de plusieurs paramètres d'un problème à l'intérieur desquelles les stratégies de production des exploitants restent inchangées. Sur le plan pratique, cette méthode est utilisée pour évaluer la «stabilité» des plans de production des exploitants face à des perturbations externes (climat, marchés) mais également pour évaluer les niveaux d'incitants (également des «perturbations» externes pour les producteurs !) à appliquer pour induire des changements significatifs dans les plans de production. Ici aussi, un logiciel a été développé et testé sur des études de cas simplifiées.

*Développement d'une méthode de prise en compte - dans les stratégies*

*du développement rural - du risque perçu par les producteurs ruraux à partir de données réellement disponibles auprès de ces producteurs.* Cette méthode est opérationnalisée par le logiciel IMCOS («Interactive Multi-criteria Optimization Software») mis au point dans les laboratoires des partenaires européens.

*Elaboration d'une typologie heuristique.* Il s'agit essentiellement d'effectuer séparément deux typologies : l'une, structurelle, est fondée sur la disponibilité relative des facteurs de production; l'autre, fonctionnelle, est fondée sur les types d'activités menées par les exploitants. On croise les deux pour faire apparaître les hypothèses pertinentes relatives au fonctionnement des exploitations. Enfin, on choisit, parmi les nombreux types mis en évidence, ceux qui doivent être modélisés en priorité. Cette typologie a été appliquée à l'étude de cas du partenaire algérien.

*Progression dans la mise au point d'une méthodologie permettant d'utiliser des données imprécises, qualitatives et/ou difficilement quantifiables pour la conception d'un modèle «qualitatif» d'aide à la prise de décision.*

Les méthodes développées dans le présent programme ont été appliquées à des études de terrain effectuées en Algérie et au Burundi. Il s'agit toutefois d'études de cas simplifiées et parfois préliminaires vu la limitation de la durée de ce programme à 24 mois.

En Algérie, une population d'exploitations privées dans le Wilaya de Sidi-Bel-Abbès a servi de base à l'étude de cas. L'étude a consisté en :

## Méthodes développées et résultats principaux

*Développement d'une méthode pouvant aider des responsables du développement à choisir des incitants susceptibles d'induire des changements de stratégies de production agricole chez les exploitants ruraux.* L'approche choisie est celle de la modélisation et de la programmation mathématique. Cela veut dire que les données servant de base à l'aide au choix d'incitants consistent en :

- des critères à optimiser, quantifiant les objectifs des différents acteurs du problème (responsables du développement, producteurs, banquiers, ...);

- réalisation d'une typologie heuristique des exploitations, choix des types les plus intéressants;
- modélisation, validation du modèle par retour sur le terrain, puis test de la procédure de typologie comportementale;
- analyse du risque et enfin réactions des différents types d'exploitations à différentes stratégies d'incitants.

Au Burundi, l'étude de cas a été réalisée sur une région comprenant 3 communes de la province de Kayanza (Nord). L'étude a consisté à déterminer quelles seraient de meilleures alternatives de productions agricoles par rapport à la situation actuelle, faite essentiellement de cultures d'autosubsistance. Cette situation actuelle pose des problèmes parce que les affectations des sols sont loin d'être « optimales » des points de vue « production » et écologique (problèmes d'érosion). On s'est donc choisi un ensemble de critères et on a recherché, en utilisant la méthodologie d'aide à la décision multicritère, des affectations de sols satisfaisant le mieux possible ces critères et ce, pour différents niveaux requis de cultures destinées à l'autosubsistance familiale (l'autre débouché des cultures étant leur commercialisation). Les résultats obtenus sont préliminaires et constituent une amélioration potentielle qui ne pourra être réalisée sur le terrain que moyennant la mise en oeuvre d'incitants. Ce dernier aspect implique donc le choix d'une stratégie d'incitants pour lequel la méthodologie développée pourra s'avérer fort utile.

Durant le programme, 7 réunions de travail rassemblant tous les partenaires et d'une durée moyenne de 3 jours ont été organisées. Lors de ces réunions, chacun des chercheurs attachés au programme a pu présenter ses travaux. Ces présentations furent suivies d'échanges et de discussions stimulantes. En plus de ces réunions, des échanges « bilatéraux » eurent lieu à l'occasion de missions sur le terrain (Algérie-France et Belgique-Burundi) ou de séjours de travail (Belgique-France). Enfin, la formation des chercheurs

algériens et burundais à l'utilisation des méthodes d'aide à la décision a pu se réaliser tout au long de l'exécution du programme grâce à la collaboration soutenue avec leurs collègues européens.

## Conclusions

Le présent programme a été réalisé sur une période de 24 mois. Il a été axé sur des développements à caractère méthodologique. Les méthodes développées ont subi quelques tests de validation en étant appliquées à deux études de terrain simplifiées.

La suite de ce programme devrait tout naturellement déboucher sur des applications « en grandeur réelle » des outils développés. Pour mener à bien de telles applications dans le domaine de la planification du développement rural à l'échelle régionale, il est indispensable de collaborer étroitement avec des responsables régionaux en matière de politique du développement. De telles collaborations ont pu être programmées avec le projet « Cultures Villageoises en Haute Altitude (CHVA) » au Burundi et avec la Chambre de Commerce de Sidi-Bel-Abbès en Algérie. Pour pouvoir mener à bien de telles applications, les partenaires du présent programme ont introduit un projet dans le cadre du programme STD-3 (2e appel). Ce projet de 24 mois a cependant été refusé par les instances « ad hoc » de la CEE. Ce refus est d'autant plus regrettable que le présent programme avait été introduit initialement pour une durée de 48 mois mais qu'il a dû être ramené à 24 mois pour des raisons budgétaires. Les partenaires du présent programme espèrent néanmoins trouver des financements alternatifs qui, s'ils se concrétisent, leur permettront de valoriser l'acquis accumulé durant ces 24 derniers mois. Il est cependant prévu que les travaux effectués seront valorisés, dans un avenir aussi proche que possible, par quelques publications complémentaires dans des revues à comité.

## Publications et communications

Gailly B., Boulier F. and Installé M., 1992. Application of multicriteria and multiperson decision making to the planning of the development of rural areas. Proceedings of the IFAC/FORS/IIASA Congress on Support systems for decision and negotiation processes. Warsaw, Poland, June 24-26, 1992, 141-146.

Gailly B., Boulier F. and Installé M., 1993. Decision support tools using hierarchical multiperson multicriteria model. General procedure and application to a problem of rural development. Proceedings of the 12th IFAC World Congress, Sydney, July 19-23, 1993, Vol. 10, 119-121.

Boulier F., 1990. Processus de décision et choix d'une méthode d'optimisation à objectifs multiples. Rapport technique, LECSA-INRA, Montpellier, 79pp.

Boulier F., 1990. Prise en compte du risque et de l'incertitude dans la modélisation des exploitations agricoles. Rapport technique, LECSA-INRA, Montpellier, 28pp.

Boulier F., Cao D. et Installé M., 1991. Aspects théoriques et pratiques de formulation d'un modèle d'aide à la décision en univers incertain. Application à la modélisation des exploitations agricoles. Rapport technique, LECSA-INRA et CESAME-UCL, Montpellier, 16pp.

Gailly B., 1991. Les problèmes à structure hiérarchisée : méthodes de résolution. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 6pp.

Gailly B., 1994. Problème d'analyse multicritère : modélisation et analyse critique. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 8pp.

Gailly B., 1991. Modèle d'optimisation multicritère : cahier des charges; informations nécessaires. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 4pp.

Gailly B., 1992. Construction d'un modèle multicritère d'optimisation de la production agricole. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 12pp.

Ndimubandi J., 1991. La perception du risque chez le paysan burundais et stratégies adoptées ainsi que les incitants développés par les pouvoirs publics. Rapport technique, ECRU, Louvain-La-Neuve.

Ndimubandi J., 1991. Analyse qualitative et sommaire de la commercialisation des produits agricoles dans la région naturelle du Mubamba. Rapport technique, ECRU, Louvain-La-Neuve, 13pp.

Gailly B., 1992. Équité et aide à la décision. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 8pp.

Gailly B., 1992. Identification des régions efficaces dans un problème multicritère linéaire par morceaux. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 4 pp.

Gailly B., 1992. Problèmes multiacteurs multicritères hiérarchisés : schéma général de résolution. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 12pp.



Gailly B., 1992. Modèle multicritère de simulation d'exploitations agricoles. Présentation et description. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 26pp.

Gailly B., 1992. How to fix aspirations level and the fallacy of the pay-off matrix. Rapport technique, CESAME, Louvain-La-Neuve, 7pp.

Ndimubandi J., 1992. Rapport de décision. Rapport technique, ECRU, Louvain-La-Neuve, 19pp.

Ndimubandi J., 1992. Résultats de l'enquête effectuée à Kayanza (Burundi) dans le cadre du projet CEE-STD. Rapport technique, ECRU, Louvain-La-Neuve, 21pp.

Ndimubandi J., 1993. Modèle d'optimisation multicritère: Application à la région de Kayanza (Burundi). Rapport technique, ECRU, Louvain-La-Neuve, 38pp.

Ndimubandi J., 1993. Programme d'optimisation multicritère pour Kayanza conçu dans le cadre du projet CEE-STD. Rapport technique, ECRU, Louvain-La-Neuve, 6pp.

Ferroukhi S.A., 1991. Caractérisation sommaire de l'agrosystème de la région de Sidi-Bel-Abbès. Rapport technique, LECSA, Montpellier, 19pp.

Ferroukhi S.A., 1992. Réflexions sur l'intensification céréalière suite aux changements induits par les réformes économiques du secteur agricole et agro-alimentaire en Algérie : cas de l'agrosystème de Sidi-Bel-Abbès. Rapport technique, LECSA, Montpellier, 28pp.

Ferroukhi S.A., 1992. Essai pour un bilan des activités de recherche-développement dans la région de Sidi-Bel-Abbès. Rapport technique, LECSA, Montpellier, 21pp.

Ferroukhi S.A., 1992. Présentation d'une typologie du secteur privé de la région de Sidi-Bel-Abbès. Rapport technique, LECSA, Montpellier, 18pp.

Ferroukhi S.A., 1992. Etude de cas en Algérie : situation en avril 1992. Rapport technique, LECSA, Montpellier, 44pp.

Ferroukhi S.A., 1993. Modélisation des systèmes de production céréales-élevage ovin dans la région de Sidi-Bel-Abbès. Rapport technique, Département d'Economie et de Sociologie Rurale, INRA, Alger, 23 pp.

Ferroukhi S.A., 1993. Etude prospective du développement de la céréaliculture : cas des exploitations privées de la région de Sidi-Bel-Abbès. Rapport technique, Département d'Econo-

mie et de Sociologie Rurale, INRA, Alger, 13pp.

Boulier F., Cao D. et Installé M., 1991. Aspects théoriques et pratiques de formulation d'un modèle d'aide à la décision en univers incertain. Application à la modélisation des exploitations agricoles. 33e journée du groupe européen Aide Multicritère à la Décision, 3-4 octobre 1991, Marseille.

Boulier F. et Schilizzi S., 1991. Modelling production systems using multiple objective programming techniques. Séminaire «Economie de la famille et modélisation des agricultures familiales», 4-6 décembre 1991, Montpellier.

Gailly B. et Boulier F., 1992. Aide multicritère à la décision dans un système à plusieurs niveaux hiérarchisés. Application aux problèmes de développement rural. Actes des «36e Journée du groupe de travail européen Aide à la Décision Multicritère», 15-16 octobre 1992, Luxembourg, 8pp.

Gailly B. et Installé M., 1993. Bi-level optimization and its applications to control problems. 12th Benelux Meeting on systems and control, 3-5 March, 1993, Houffalize, Belgium.

## INDEX OF KEY WORDS

# Index des mots clés - Index of key words

Les numéros renvoient aux pages correspondantes

<b>A</b>			
abscisic acid (ABA)	17	amélioration des plantes	22, 41
absorption d'hydrogène	130	amélioration génétique	53, 148
acceptabilité	269	amélioration nutritionnelle	279
acceptability	269	amélioration variétale	26
accroissement	120	aménagement du territoire	237
acid soils	213	aménagement forestier	120
acide abscissique (ABA)	17	analyse de population	90
adnc	70	annual crops	3
africa	292	anti-nutritional factors	279
afrique	292	aquaculture d'eau douce	183
afrique de l'ouest	3	arachide	26
agricultural price policy	287	atmosphère modifiée	263
agriculture durable	11	atténuation du réovirus de la carpe de rosseau	187
agro-système	296	attenuation of grass carp reovirus	187
agro-systems	296	attenuation processes	153
agroecological classification	249	avirulence genetics	90
agroforesterie	11, 135	azospirillum	46
agroforestry	11, 135	azote	60, 162
agrometeorological data	249		
agronomie	46	<b>B</b>	
agronomy	46	bacteria	46
aide à la décision	296	bactérie	46
aliment de sevrage	279	bananas	77
aliment pour animaux	159, 176	bananier	77
alimentation	168, 176	bangladesh	46
alimentation des ruminants	171	barley	17
alley-cropping	11	barrage	193
altered gene expression	153	barrage enterré	201
aluminium toxicity	213	base de données des sols	225
amande	269	bassin amazonien	225
amazon basin	225	beans	60, 64
amélioration de la qualité	263	behaviour	168
		benin	100
		bénin	100
		benthos	241
		besoin de puissance	255
		besoins nutritionnels	168
		bilan en azote du sol	33
		bilan hydrique	3
		biodiversité	241
		biodiversity	241
		biogeochemical cycles of elements	193
		biological control during storage	105
		biological nitrogen fixation	33
		biologie moléculaire	64
		biomass	11, 130
		biomasse	11, 130
		biomasse microbienne	225
		biosynthèse des glucosides cyanogéniques	70
		biosynthesis of cyanogenic glucosides	70
		black leaf streak disease	77
		blé dur	8
		bois d'hévéa	274
		bois-énergie	113
		bovine tropical theileriosis	153
		bradyrhizobium	130
		brazil	225
		breeding	53, 148
		brésil	225

<b>C</b>			
cacao	287	conductivité hydraulique	231
café	287	conjunctive use	201
calcium	263	contrôle	
camels	168	de l'expression génétique	17
cameroon	287	costa rica	11
cameroun	287	coton	287
canne à sucre	213	coton glandless	269
canopy modelling	135	cotton	287
caractérisation		cowpea	33, 60, 100, 105, 279
technologique de la noix	53	craterostigma plantagineum	17
cartographie du rflp	70	crop protection.	105
cashew nuts	53	crop residues	159
cassava	70	crustacé	241
cdna	70	crustaceans	241
cell line vaccines	153	cultural control	83
cellular resistance	22	cultural practices	33
céréale	279	culture annuelle	3
cereals	279	culture arborée	135
chameau	168	culture d'exportation	287
champignon	263	culture de tissu	70
chemical control	83	culture en mélange	135
chickpea	33	culture en sec	292
classification agroécologique	249	culture entre haies	11
classification des terres	231	culture fourragère	213
climat	162	culture intercalaire	60
climate	162	culture pérenne	225
clonal selection of parasite		culture vivrière	287
sub-populations	153	cyanogénèse	70
cobaye	176	cyanogenesis	70
cocoa	287	cycle biogéochimique	
coffea spp.	94	des éléments	193
coffee	287	cytochrome pp450	70
coleoptera bruchidae	105	<b>D</b>	
coléoptères bruchidae	105	dams	193
compactage du sol	218	déchet	274
comportement	168	decision support systems	296
comportement		déficit hydrique	33
de l'azote en milieu salé	209	dégradation	
composition de la litière	225	des glucosides cyanogéniques	70
		dégradation du sol	218
		degradation	
		of cyanogenic glucosides	70
		delta du mékong	213
		dessèchement	17
		dessication	17
		détection de médicament	143
		développement rural	296
		digestibilité	159
		digestibility	159
		digestion	168
		dioscorea spp.	41
		direct drilling	255
		donnée agrométéorologique	249
		dormance	41
		dormancy	41
		dormant root primordia	50
		downdraft gasifier	274
		drawbar force	255
		drought	22, 26, 292
		drought resistance	3, 8
		drought stress	17
		drug detection	143
		drug uptake	143
		drug-resistance	143
		dryland farming	292
		durable resistance	90
		dynamique des nutriments	225
		dynamique	
		des populations des insectes	105
		<b>E</b>	
		earliness	26
		earthworms	176
		eau	60
		écologie	33, 46, 83
		ecology	33, 46, 83
		economic channels	113
		economics	274, 287
		économie	274, 287



host-parasite interactions.	77
humid lowland rainforest	135
humid tropics	11
humification	225
humification	225
hydraulic conductivity	231
hydrogen uptake	130
hydrographic	241
hydrography	241
hyper-sensibilité	94
hypersusceptibility	94

## I

igname	41
in vitro genetic collection	41
in vitro propagation	53
indice physiologique	8
indice morpho-agronomique	8
induction du méristème	50
infiltration	231
inoculation	46
inoculation de mycorhizes	126
insect population dynamics	105
integrated control	83, 100
interaction hôte-pathogène.	77
interaction plante-nématode	94
intercropping	60
inventaire forestier	120
irrigated land management	209
irrigation	201
isolation du gène	17

## J

jachère	113
---------	-----

## K

kenkey	279
kenya	60, 100, 292
kernel	269

## L

lagoon	241
lagune	241
lait	168
land classification	231
land tenure	113
land use systems	231
landuse planning	237
larval parasitoids	105
legumes	162, 279
légumineuse	162, 279
légumineuse arborée	64
légumineuse tropicale.	50
légumineuse vivrière	33
leguminous trees	64
light simulation model	135
linamarase	70
lipide	22
lipids	22
litter composition	225
localisation directe	255
lutte biologique en stockage	105
lutte chimique	83
lutte intégrée	83, 100
lutte phytotechnique	83

## M

macroalgae	241
macroalgue	241
macrobrachium rosenbergii	183
magnaporthe grisea	90

maïs	60, 100, 279
maize	60, 100, 279
manure	3
maladie des poissons	187
maladie des raies noires	77
maladie hémorragique de la carpe de roseau	187
malaisie	274
malaysia	274
mangrove	241
mangrove litter transformation	241
mangroves	241
manioc	70
manure	3
map production	237
marqueur de virulence.	153
matière organique	218, 225
meat	168
mekong delta	213
membrane	22
membranes	22
meristem induction	50
microbial biomass	225
microbiologie	64
microbiology	64
mil	100, 249, 279
milk	168
milk production.	213
millet	100, 249, 279
mineral fertilization	3
mineralisation	225
minéralisation	225
mini-élevage	176
minilivestock	176
mise en valeur du sol	213, 218
mixed cropping	135
model for yield estimation	249
modèle d'estimation du rendement	249
modèle numérique.	241

modélisation 193, 296  
 modélisation de l'éclairage 135  
 modélisation du dôme foliaire 135  
 modelling 193, 296  
 modified atmosphere 263  
 molecular biology 64  
 morphoagronomical indices 8  
 morphogénèse 162  
 morphogenesis 162  
 mountain systems 237  
 multiplication 135  
 multiplication in vitro 53  
 multiplication végétative 53  
 mycorrhizal inoculation 126  
 mycosphaerella fijiensis 77

## N

national park 237  
 nématode 94  
 nematodes 94  
 niébé 33, 60, 100, 105, 279  
 nigeria 100  
 nigéria 100  
 nirs 213  
 nitrate 130  
 nitrates 130  
 nitrogen 60, 162  
 nitrogen fixation 46, 64, 130  
 nitrogen mineralization  
 in saline conditions 209  
 nitrogen nutrition 33  
 nod factor 50  
 nod genes 50  
 nodulation 64  
 nodule de tige 50  
 noix cajou 53  
 numerical modelling 241  
 nutrients 241  
 nutrients dynamics 225

nutrition 183, 269  
 nutrition azotée 33  
 nutritional improvement 279  
 nutritional needs 168  
 nutritive value 159, 171

## O

oil palm 135  
 oophages 105  
 optimisation 296  
 optimization 296  
 organic matter 218, 225  
 organic matter fractions 225  
 orge 17  
 orobanche 83  
 osmoregulation 33  
 osmorégulation 33  
 osmotic regulation 26  
 oxygen 33  
 oxygène 33  
 oxynitrilase 70

## P

packaging station 263  
 packing 263  
 paille 171  
 palmier à huile 135  
 parameters 148  
 paramètre 148  
 parasitic weed 83, 100  
 parasitoïde oophage 105  
 parasitoïde larvaire 105  
 parc national 237  
 pastoralism 292  
 pastoralisme 292  
 pastures 225  
 pathogenicity 94

pathogénie 94  
 pâturage 225  
 pays sahélien 100  
 perennial crops 225  
 petit producteur 176  
 phaseolus aureus 213  
 phosphore 11  
 phosphorus 11  
 photosynthèse 22  
 photosynthesis 22  
 physical properties of the soil 209  
 physiological ageing 135  
 physiological indices 8  
 phytometer 135  
 phytomètre 135  
 phytopathologie 41  
 phytopathology 41  
 phytovirologie 41  
 piègeage 263  
 plancton 241  
 planification rurale 296  
 plankton 241  
 plant breeding 26, 41  
 plant improvement 22  
 plant virology 41  
 plant-nematode interactions 94  
 plantain 77  
 plantains 77  
 plante tropicale cultivée 22  
 plante parasite 83, 100  
 pluie artificielle 231  
 pois chiche 33  
 poisson 241  
 politique des prix agricoles 287  
 population analysis 90  
 post-harvest handling 183  
 potential productivity 162  
 poultry 176  
 power requirement 255  
 pratique culturale  
 économisant l'eau 255

précarité	292
précocité	26
primordium dormant de racine	50
prise d'aliment	159
prise de décision de l'agriculteur	292
prise de médicament	143
processus d'atténuation	153
production de cartes	237
production de crevettes d'eau douce	183
production systems	296
productivité potentielle	162
productivité	120, 241
productivity	120, 241
produit de cueillette	113
profil du sol	255
promotion de croissance	46
propagation	135
propension à l'érosion	231
properties of the soil	209
propriété des sols et des saprolites	231
propriété physique des sols	209
protection des cultures	105
protéine	22
protéine réagissant au stress	17
proteins	22
pseudomonas	46
puissance à la barre de traction	255
pyriculariose du riz	90

## Q

qualité de l'eau	183, 193
qualité de l'eau souterraine	201
quality improvement	263

## R

racine	3
rainfall simulation	231
rat géant	176
recurrent selection	26, 90
reduced soil tillage	255
réduction du travail du sol	255
régime foncier	113
regulation of gene expression	17
régulation osmotique.	26
regulatory genes	64
remote sensing	249
réovirus de la carpe de roscau	187
reproductibilité	3
résidu de récolte	159
resistance	77, 94
résistance	77, 94
résistance à la chaleur	64
résistance à la chimiothérapie	143
résistance à la sécheresse	3, 8
résistance aux facteurs nuisibles	213
résistance cellulaire	22
résistance durable	90
resistance to injurious factors	213
revenues	176
revenus	176
rflp mapping	70
rhizobia	64
rhizobium	33, 64, 130
rice	17, 46, 213
rice blast	90
risk	292
risque	292
riz	17, 46, 213
riz pluvial	90
robinia	130
root taking	26
root systems	3

rubberwood	274
ruminant	148
ruminant feeding	171
ruminants	148
rural development	296
rural economy	113
rural forestry	113
rural planning	296
rural sociology	113

## S

s. tomé and principe	94
s. tomé et principe	94
sahelian countries	100
saline and alkaline soils	209
sandy soils	218
seagrasses	241
sécheresse	22, 26, 292
sécurité alimentaire	279
seed	269
sélection clonale de sous-populations de parasites	153
sélection récurrente	26, 90
semi-arid	60
semi-aridité	60
semi-urban areas	176
semperfresh	263
senegal river valley	193
senegal	120
sénégal	120
sensibilité	94
sidérophore	33
siderophores	33
sig (ILWIS)	237
signal exchange	50
simulation	296
simulation des processus pédologiques en milieu salé	209
simulation of soil changes in saline conditions	209



small producers	176
socio-economic survey	231
sociologie rurale	113
soil and saprolite properties	231
soil compaction	218
soil crusting	218
soil database	225
soil degradation	218
soil erosion survey	231
soil management	213, 218
soil nitrogen balance.	33
soil profile	255
soil structure	218
soil tillage	3
soja	33
sol acide	213
sol encroûté	218
sol sablonneux	218
sol salé	209
sorgho	100, 213
sorghum	100, 213
soybean	33
spain	83
spécificité de la plante-hôte	50
specificité symbiotique	126
station de conditionnement	263
stem nodules	50
stomata	22
stomate	22
straw	171
stress dû à la sécheresse	17
stress responsive proteins	17
striga	100
structure du sol	218
sugar cane	213
supplementation	171
supplémentation	171
surface water management	193
susceptibility	94
sustainability	3
sustainable agriculture	11

swaziland	231
symbiotic nitrogen fixation	50
symbiotic specificity	126
système d'exploitation agricole	113, 176, 287
système d'utilisation des terres	231
système de production	296
système montagneux	237

**T**

techniques culturales	33
technological nut characterization	53
technologie	269
technology	269
téledétection	249
thailand	237
thailande	237
theileria annulata	153
theilériose bovine tropicale	153
tissue culture	70
toxicité aluminique	213
traditional processing	269
training	46
traitement	171
traitement après récolte	183
transfer of c and n	241
transfert de c et n	241
transformation artisanale	269
transformation des débris de mangrove	241
trapping	263
travail du sol	3
treatment	171
tree crops	135
tropical crops	22
tropical legumes	50
tropical woodland	120
tropique humide	11

trypanocide	143
trypanocides	143
trypanosomiasis	143
trypanosomiasis	143
trypanotolerance	148
trypanotolérance	148
typologie des exploitations	287
typology of farms	287

## U

ultisols	11
uncertainty	292
underground dams	201
updg glucosyltransferase	70
upland rice	90
utilisation conjonctive	201

## V

vaccin provenant de cultures cellulaires	153
vaccination	
de la carpe de roseau	187
vaccination of grass carp	187
valeur nutritive	159, 171
vallée du fleuve sénégal	193
vegetative propagation	53
ver de terre	176
viande	168
vieillessement physiologique	135
vietnam	46
virulence marker	153
virus des poissons	187
vitrothèque	41
volaille	176

## W

waste 274

water	60	weaning foods	279
water balance	3	west africa	3
water management	213		
water quality	183, 193		
water shortage	33		
watersaving cultivation	255	yams	41

---

**Y**

---

**Z**

---

zimbabwe	218, 292
----------	----------

## INDEX OF PROJECT LEADERS

# Index des chefs de projet - Index of projects leaders

*Les numéros renvoient aux pages correspondantes*

Ahne W.	187	Berge Odile; Nabil Omar; Mustaphizur Rahman; Van Tran Van		Brown C.G.D.; Jackson L. A.; Shiels B.; Singh D.K.; Sutherland I.A.; Tait A.	
Ait-Oubahou Ahmed	263				
Ang Kok-Jee	183	Hoi Why Kong	274	Reilly P.J.A.	279
Annerose Daniel	26	Holmes Peter H.	143	Robert M.	209
Bache Bryon W.	11	Huignard Jacques	105	Rodrigues Junior Carlos José	94
Bartels Dorothea	17	Installé M.	296	Sall P.N.	120
Becker Klaus	159	Laudelout Henri	213	Santos Maria Susana Newton de Almeida	94
Bertrand A.	113	Lecher K.	201	Sardinha Raúl Manuel Albuquerque	53
Bridgwater A.V.	274	Lemaire Gilles	162	Stein Norbert	237
Cerri Carlos C.	225	Maracchi G.	249	Tio-Touré Bakary Zoundjiekpon Jeanne	41
Chermite A.	171	Marquie Catherine	269	Tisserand J.L.	168
Cheverry C.	209	Møller Birger Lindberg	70	Von Engelhardt W.; Cianci	
Chopart Jean-Louis	3	Mourichon Xavier	77	Toulmin Camilla	292
Clavel Danièle	26	Mushala Hezekiel M. Scholten Thomas; Felix-Henningsen Peter; Morgan Roy P.C.; Rickson R.J.	231	Vanderheyden Jos	64
Eichhorn H.	255			Van Montagu M.	50
Ferrari Giovanni A.	218	Newman Steven M.	135	Verhulst A.	148
Gac Jean Yves	193	Notteghem J.L.	90	Vieira da Silva Jorge	22
Garbaye J.	126	Obaton Michel	33	Wainwright Joanne	135
Goudet J.P.	120	Ouassou Abdellah	8	Werner D.	130
Hardouin J.	176	Pieterse A.H.	83, 100	Wood Martin	60
Heidhues Franz	287	Polk P.	241		
Heulin Thierry	46	Preston Patricia M.	153		

INDEX  
DES INSTITUTIONS



*INDEX  
OF INSTITUTIONS*

# Index des institutions - Index of institutions

Les numéros renvoient aux pages correspondantes

## Belgique

- 
- *Rijksuniversiteit Gent, Laboratorium Genetika.*  
 Ledeganckstraat 35,  
 9000 Gent  
 Tel : +32-9-264 51 70  
 Fax : +32-9-264 53 49  
 TS2-A-135  
 50
- 
- *K.U. Leuven, F.A. Janssens Laboratory of Genetics.*  
 Willem de Croylaan 42,  
 3001 Heverlee.  
 Tel : +32-16-22 09 21 (extension 2403)  
 Fax : +32-16-20 07 20  
 TS2-A-199  
 64
- 
- *Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Service de Production Animale Tropicale.*  
 Nationalestraat 155,  
 2000 Antwerpen  
 Tel : +32-3-247 63 91  
 Fax : +32-3-216 14 31  
 Tlx : 31648 Tropic (B)  
 TS2-A-076  
 148
- 
- *Tropical Animal Production Unit, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen.*  
 Nationalestraat 155,  
 2000 Antwerpen  
 Tel : +32-3-247 66 66  
 Fax : +32-3-216 14 31  
 Tlx : 31648 Tropic (B)  
 TS2-A-263  
 176
- 
- *Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat.*  
 Avenue de la Faculté d'Agronomie 22,  
 5030 Gembloux  
 Tel : +32-81-61 19 55  
 Fax : +32-81-61 49 41  
 Tlx : 59 165 CRAGx  
 TS2-A-257  
 213
- 
- *Université Catholique de Louvain,*  
*Laboratoire d'Automatique, de Dynamique et d'Analyse des Systèmes.*  
 Avenue G. Lemaitre 4-6,  
 1348 Louvain-la-Neuve  
 Tel : +32-10-47 25 94  
 Fax : +32-10-47 21 80  
 TS2-A-321  
 296
- 
- *Free University of Brussels, VUB, Laboratorium of Ecology.*  
 Pleinlaan 2,  
 1050 Brussels  
 Tel : +32-2-641 34 09  
 Fax : +32-2-641 34 03  
 TS2-A-240  
 241
-

## **Brazil**

- 
- *Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de Sao Paulo.*  
Avenida Centenario 303, Caixa Postal 96,  
13.400-970 Piracicaba, Sao Paulo  
Tel : +55-194-33 51 22 TS2-A-301  
Fax : +55-194-22 83 39 225

## **Côte d'Ivoire**

- 
- *Université Nationale de Côte d'Ivoire, Faculté des Sciences et Techniques.*  
22 BP 582 Abidjan 22,  
Tel : +225-44 90 00 / poste 3061 TS2-A-116  
Fax : +225-44 35 31 41

## **Denmark**

- 
- *Royal Veterinary and Agricultural University, Plant Biochemistry Laboratory,*  
*Department of Plant Biology.*  
Thorvaldsensvej 40,  
1871 Frederiksberg C, Copenhagen  
Tel : +45-35-28 33 52 TS2-A-265  
Fax : +45-35-28 33 33 70

## **Deutschland**

- 
- *Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung.*  
Carl-von-Linné-Weg 10,  
50529 Köln,  
Tel : +49-221-506 24 30 - +49-221-506 24 00 TS2-A-030  
Fax : +49-221-506 24 13 17
- 
- *Botanisches Institut, Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.*  
Karl-von-Frischstrasse  
3550 Marburg  
Tel : +49-6421-28 34 75 TS2-A-172  
Fax : +49-6421-28 20 57 130
- 
- *Universität Hohenheim, Institut für Tierproduktion in den Tropen und Subtropen.*  
70593 Stuttgart,  
Tel : +49-711-459 0 TS2-A-074  
Fax : +49-711-459 27 85 159
- 
- *Tierärztliche Fakultät der Universität München, Institut für Zoologie und Hydrobiologie.*  
Kaulbachstrasse 37,  
80539 München  
Tel : +49-89-2180 2785 TS2-A-120  
Fax : +49-89-2805 175 187

- 
- *Universität Hannover, Institut für Wasserwirtschaft, Hydrologie und Landwirtschaftlichen Wasserbau, IWH.*  
 Appelstrasse 9A,  
 30167 Hannover  
 Tel : +49-511-762 22 37  
 Fax : +49-511-762 37 31  
 Tlx : 09-23868 unihn d  
 TS2-A-318  
 201
- 
- *Johann Wolfgang Goethe-Universität, Institut für Physische Geographie.*  
 Senckenberganlage 36,  
 6000 Frankfurt/Main  
 Tel : +49-69-798 38 21  
 Fax : +49-69-798 83 82  
 TS2-A-024  
 237
- 
- *Institut für Landtechnik der Justus-Liebig-Universität.*  
 Braugasse 7,  
 35390 Giessen  
 Tel : +49-641-702 84 30  
 Fax : +49-641-702 84 27  
 TS2-A-160  
 255
- 
- *Universität Hohenheim, Institut für Agrar- und Sozialökonomie in den Tropen und Subtropen.*  
 Universität Hohenheim, Institut 490,  
 70593 Stuttgart  
 Tel : +49-711-459 25 81  
 Fax : +49-711-459 25 82  
 Tlx : 7-22959 uniho-d  
 TS2-A-281  
 287

## France

- 
- *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Département Cultures Annuelles, CIRAD-CA.*  
 BP 5035,  
 34032 Montpellier cedex 1  
 Tel : +33-67-61 58 00  
 Fax : +33-67-61 59 88  
 TS2-A-014/015  
 3
- Avenue de la Belle Gabrielle 45bis,  
 94736 Nogent sur Marne Cedex  
 Tel : +33-1-43 94 43 00  
 Fax : +33-1-43 94 44 91  
 Tlx : 264656 F  
 TS2-A-156  
 90
- Tel : +33-67-61 71 10  
 Fax : +33-67-61 56 67  
 Tlx : 480762F  
 TS2-A-245  
 269
- Département des Forêts, CIRAD-Forêts.*  
 Avenue de la Belle Gabrielle 45bis,  
 94130 Nogent sur Marne Cedex  
 Tel : +33-1-43 94 43 00  
 Fax : +33-1-43 94 43 29 / +33-1-43 94 43 81  
 TS2-A-070  
 TS2-A-081  
 113, 120



*Département des Fruits et Agrumes, Laboratoire de Pathologie Végétale, CIRAD-IRFA.*

Rue du Général Clergerie 6,

75116 Paris

Tel : +33-1-45 53 16 92

Fax : +33-1-47 27 48 11

Tlx : 645992

TS2-A-095

77

---

■ *Université Paris 7, Laboratoire d'Ecologie Générale et Appliquée.*

Place Jussieu 2, Case 7019 Tour 54-3,

75251 Paris Cedex 05, France.

Tel : +33-1-44 27 60 65

Fax : +33-1-40 51 71 08

TS2-A-101

22

---

■ *Institut National de la Recherche Agronomique, INRA*

*Laboratoires de Recherches sur les Symbiotes des Racines.*

Place Viala 1,

34060 Montpellier Cedex 1

Tel : +33-67-61 24 63

Fax : +33-67-54 57 08

Tlx : 4908 18 F

TS2-A-107

33

*Laboratoire de Microbiologie Forestière*

Rue de l'Université 145,

75007 Paris

54280 Champenois

Tel : +33-1-42 75 90 00 / +33- -83 39 40 76

Fax : +33-1-42 75 94 86 / +33- -83 39 40 69

TS2-A-093

126

*Station d'Ecophysiologie des Plantes Fourragères,*

86600 Lusignan

Tel : +33-49-55 60 00

Fax : +33-49-55 60 68

TS2-A-157

162

---

■ *Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS, Centre de Pédologie Biologique.*

Rue N-D des Pauvres 17 / BP5,

54501 Vandoeuvre les Nancy

Tel : +33-83-51 08 60

Fax : +33-83-57 65 23

TS2-A-119

46

*Institut de Biocénologie Expérimentale des Agrosystèmes, URA CNRS 1298*

Parc de Grandmont, Avenue Monge,

37200 Tours

Tel : +33-47 36 69 65

Fax : +33-47 36 70 40

TS2-A-269

105

---

■ *Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes, CIHEAM.*

Rue Newton 11,

75116 Paris

Tel : +33-1-47 23 45 55 / +33-1-47 23 45 43

Fax : +33-1-47 20 10 47

TS2-A-233

TS2-A-250

168, 171

- 
- *Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, ORSTOM.*  
Rue de la Fayette 213,  
75480 Paris Cedex 10 TS2-A-198  
193
- 

- *Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, ENSAR.*  
Rue de Saint Brieuc 65,  
35042 Rennes Cedex  
Tel : +33-99-28 50 00 TS2-A-108  
Fax : +33-99-28 54 30 209
- 

## Italie

- 
- *Università di Firenze, Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta.*  
P. Le Cascine 15,  
50122 Florence  
Tel : +39-55-36 70 37 TS2-A-285  
Fax : +39-55-33 32 73 218
- 

- *Centro Studi per l'Applicazione dell'Informatica in Agricoltura.*  
Logge degli Uffici Corti 1,  
Firenze  
Tel : +39-55-21 33 60 TS2-A-254  
Fax : +39-55-30 89 10 249
- 

## Malaysia

- 
- *University Pertanian Malaysia, Faculty of Fisheries and Marine Science.*  
43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan  
Tel : +60-3-948 61 01 TS2-A-099  
Fax : +60-3-948 25 07 183
- 

- *Forest Research Institute Malaysia.*  
Kepong 52109,  
Kuala Lumpur  
Tel : +60-3-634 633 TS2-A-247  
Fax : +60-3-636 7753 274
- 

## Maroc

- 
- *Institut National de la Recherche Agronomique, INRA.*  
Avenue de la Victoire BP 415,  
Rabat  
Tel : +212-7-25 83 TS2-A-019  
Tlx : 31702 M 8
-

- 
- *Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Campus d'Agadir.*  
BP 18/S,  
80.001 Agadir  
Tel : +212-8-24 10 06 - +212-8-24 01 55  
Fax : +212-8-24 22 43 - +212-8-84 39 77
- TS2-A-176  
263

## **Portugal**

- 
- *Instituto de Investigação Científica Tropical.*  
Rua da Junqueira 86,  
1300 Lisboa,  
Tel : +351-1-364 50 71  
Fax : +351-1-364 20 08
- TS2-A-167  
53

- 
- *Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, CIFC,*  
*Instituto de Investigação Científica Tropical,*  
2780 Oeiras  
Tel : +39-1-442 33 23  
Tlx : 63698 EANP
- RS2-A-158  
94

- 
- *Universidade de Coimbra, Departamento de Zoologia.*  
3049 Coimbra Codex  
Tel : +39-34-729 30 31  
Fax : +39-268 11  
Tlx : 52273 UNICOI P
- TS2-A-158  
94

## **Sénégal**

- 
- *Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, ISRA.*  
ISRA, B.P. 3120, Dakar.  
B.P. 53, Bambey  
Tel : +221-73 61 97  
Fax : +221-73 61 97
- TS2-A-104  
26

- 
- *Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération,*  
*ORSTOM.*  
BP 1386, Dakar  
Tel : +221-32 34 76  
Fax : +221-32 43 07
- TS2-A-198  
193

**Swaziland**

- 
- *University of Swaziland*  
 Private Bag 4,  
 Kwaluseni  
 Tel : +268-840 11 - +268-851 08  
 Fax : +268-852 76  
 Tlx : 2087 WD
- TS2-A-324  
231

**The Netherlands**

- 
- *Royal Tropical Institute, KIT.*  
 Mauritskade 63,  
 1092 AD Amsterdam  
 Tel : +31-20-568 83 07  
 Fax : +31-20-568 84 44
- TS2-A-124  
83

- 
- *Royal Tropical Institute, KIT.*  
 Mauritskade 63,  
 1092 AD Amsterdam  
 Tel : +31-20-568 83 07  
 Fax : +31-20-568 84 44
- TS2-A-236  
100

**United Kingdom**

- 
- *University of Cambridge, Department of Geography.*  
 Downing Place,  
 Cambridge, CB2 3EN  
 Tel : +44-223-33 33 99  
 Fax : +44-223-33 33 92
- TS2-A-029  
11

- 
- *University of Reading, Department of Soil Science.*  
 London Road,  
 Reading RG1 5AQ  
 Tel : +44-734-87 51 23  
 Fax : +44-734-86 98 58
- TS2-A-193  
60

- 
- *Fountain Renewable Resources Ltd.*  
 The Bell Tower, High Street 12,  
 Brackley, Northants, NN13 7DT  
 Tel : +44-280-70 57 00  
 Fax : +44-280-70 67 00  
 Tlx : 9312102202
- TS2-A-280  
135

- 
- *University of Glasgow Veterinary School.*  
 Bearsden Road,  
 Glasgow, G61 1QH,  
 Tel : +44-41-330 57 94  
 Fax : +44-41-330 57 97
- TS2-A-031  
143

- 
- *University of Edimburgh, Institute for Cell, Animal and Population Biology (Ashworth Laboratories), Division of Biological Sciences (previously Department of Zoology).*  
Kings Buildings, West Mains Road,  
Edimbourg, EH9 3JT, Scotland  
Tel : +44-31-650 1000  
Fax : +44-31-667 3210
- TS2-A-103  
153
- 
- *Natural Resources Institute.*  
Central Avenue, Chatham Maritime,  
Kent,  
Tel : +44-634-88 00 88  
Fax : +44-634-88 00 66 / 77
- TS2-A-267  
279
- 
- *International Institute for Environment and Development, London.*  
Endsleigh Street 3,  
London WC1 H0DD  
Tel : +44-71-388 21 17  
Fax : +44-71-388 28 26
- TS2-A-304  
292

## TABLE OF CONTENTS

# Table des matières - Table of Contents

## Avant-propos - Foreword

.....IV

## Introduction - Introduction

.....VI

## I Amélioration des productions agricoles - Improvement of agricultural products

### Production végétale - Plant production

#### Amélioration des plantes - agronomie - Plant improvement - agronomy

TS2-A-014/015	Techniques de gestion du sol et alimentation hydrique des cultures annuelles tropicales. ....	3
TS2-A-019	Amélioration génétique de la résistance du blé à la sécheresse du milieu par des indices physiologiques et biochimiques. ....	8
TS2-A-029	Phosphorus cycling and sustainability in agroforestry systems in the humid tropics. ....	11
TS2-A-030	Genetic and molecular studies for drought tolerance : identification of drought stress involved genes and proteins. ....	17
TS2-A-101	Mécanismes physiologiques de résistance à la sécheresse et création variétale. ....	22
TS2-A-104	Amélioration génétique de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide. ....	26
TS2-A-107	Amélioration du rendement et de la valeur agronomique des légumineuses vivrières par optimisation de la nutrition azotée et des itinéraires techniques. ....	33
TS2-A-116	Amélioration et valorisation de l'igname. ....	41
TS2-A-119	Utilisation agronomique de l'inoculation bactérienne du riz. ....	46
TS2-A-135	Study of the bacterial and plant functions involved in the formation of nitrogen-fixing stem nodules in <i>Sesbania rostrata</i> . ....	50
TS2-A-167	Selection of superior genotypes of cashew ( <i>Anacardium occidentale</i> L.) in Guinea-Bissau and development of <i>in vitro</i> techniques for their propagation. ....	53
TS2-A-193	Nitrogen and water use of beans-maize mixtures in a marginal rainfall area of Kenya. ....	60
TS2-A-199	Improvement of N <sub>2</sub> fixation on beans by heat tolerant <i>Rhizobium</i> strains isolated from tropical trees. ....	64

TS2-A-265	Production of cassava cultivars with acyanogenic roots. ....	70
<b>Protection des cultures - Crop protection</b>		
TS2-A-095	Elaboration de stratégies de lutte efficace contre la cercosporiose noire, maladie très menaçante pour les bananiers et les productions vivrières de plantains. ....	77
TS2-A-124	A study on host plant resistance in connection with the parasite weed <i>Orobancha</i> (broomrape). ....	83
TS2-A-156	Etude des relations <i>Oryza sativa</i> - <i>Magnaporthe grisea</i> et stratégie de sélection de variétés pourvues d'une résistance durable. ....	90
TS2-A-158	Screening for resistance to nematodes and host-parasite studies of coffee in S. Tomé and Príncipe. ....	94
TS2-A-236	Studies on the biology and ecology of the parasitic weed <i>Striga</i> in connection with integrated control schemes. ....	100
TS2-A-269	Lutte biologique contre les Bruchidae ravageurs du niébé en Afrique de l'Ouest. ....	105
<b>Forêts - Forests</b>		
TS2-A-070	Pénurie de bois et passage de l'autoconsommation à la commercialisation rurale et urbaine du bois de feu dans le bassin du Pondori au Mali et dans le département de l'Atlantique au Bénin. ....	113
TS2-A-081	Etude de la productivité et de la croissance des formations naturelles mixtes, forestières et graminéennes, dans le but de leur aménagement au Sénégal. ....	120
TS2-A-093	Controlled mycorrhization applied to improving the productivity of industrial plantations of eucalypts in the wet tropics. ....	126
TS2-A-172	Fast-growing legume trees, a technology to assist the preservation of tropical forests. ....	130
TS2-A-280	Rainforest agroforestry : a comparative study of the productivity of traditional tree crops. ....	135
<b>Production animale - Animal production</b>		
<b>Santé animale - Animal health</b>		
TS2-A-031	Animal trypanosomiasis : field and laboratory studies of drug-resistant African trypanosomes. ....	143
TS2-A-076	La trypanotolérance du bétail bovin, ovin et caprin en Afrique. Recherche sur son déterminisme génétique et sur l'identification et la sélection d'animaux trypanotolérants. ....	148
TS2-A-103	Vaccines against tropical theileriosis : studies on attenuation and loss of infectivity for ticks of attenuated <i>Theileria annulata</i> macroschizont-infected cell lines. ....	153
<b>Amélioration des productions animales - Improvement of animal production</b>		
TS2-A-074	Improving the utilization of maize stover and other crop residues as ruminant feeds in Egypt. ....	159
TS2-A-157	Productivité des espèces fourragères en climat tropical et possibilités de valorisation par les animaux. ....	162



TS2-A-233	Adaptation of camels to harsh grazing conditions. ....	168
TS2-A-250	Utilisation des pailles dans l'alimentation des ruminants dans la zone méditerranéenne. ....	171
TS2-A-263	Minilivestock as food and feed in semi-urban farming systems. ....	176

### **Pêche - Fisheries**

TS2-A-099	Prawn farming in developing countries : development of an appropriate technology for <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (de Man) production and post-harvest handling. ....	183
TS2-A-120	Vaccination of grass carp and black carp against the virus of haemorrhagic disease in the P.R. China. ....	187

## **II Conservation et mise en valeur du milieu - *Conservation and better use of the environment***

### **Ressources en eau et utilisation - *Water resources and their use***

TS2-A-198	Environnement et qualité des eaux du fleuve Sénégal (EQUESEN). ....	193
TS2-A-318	Optimal management of surface and underground reservoirs (conjunctive use) for irrigation. ....	201

### **Gestion et défense des sols - *Soil management and protection***

TS2-A-108	Salure des sols maghrébins. Influence sur les propriétés physiques et physico-chimiques des sols et sur la minéralisation de l'azote. ....	209
TS2-A-257	Mise en valeur des sols acides du delta du Mékong. ....	213
TS2-A-285	Improvement in the productivity of crusting soils and depleted sandy soils in areas of Zimbabwe under intensive cropping. ....	218
TS2-A-301	Study of the dynamics of soil organic matter in the Amazon ecosystem and after deforestation, a basis for efficient agricultural management. ....	225
TS2-A-324	Soil erosion and river sedimentation in Swaziland. ....	231

### **Evaluation des ressources - *Resources appraisal***

TS2-A-024	Geo-ecological maps within agricultural development projects in the mountain areas of Northern Thailand. ....	237
TS2-A-240	Dynamics and assessment of Kenyan mangrove ecosystems. ....	241
TS2-A-254	Agrometeorological data and agroecological classification for Sahel countries. ....	249

### III Génie agricole et techniques post-récolte *Agricultural engineering and post-harvest technology*

#### **Génie agricole et mécanisation - *Agricultural engineering and mechanization***

TS2-A-160	The performance of tillage implements on farms and research stations and on different soil types in Morocco. ....	255
-----------	--	-----

#### **Techniques post-récolte - *Post-harvest technology***

TS2-A-176	Amélioration des techniques de stockage et de conditionnement de certains produits horticoles au Maroc. ....	263
TS2-A-245	Les cotonniers glandless, source d'huile et de protéines de grande valeur pour l'alimentation humaine et animale. ....	269
TS2-A-247	Gasification of rubberwood for electrical power generation in a downdraft gasifier. ....	274
TS2-A-267	Evaluation and improvement of traditionally fermented cereals and legumes in Ghana. ....	279

### IV Systèmes de production - *Production systems*

TS2-A-281	Agricultural price policy and its impact on export and food crop production in Cameroon. A farming systems based analysis of pricing policies. ....	287
TS2-A-304	Coping with uncertainty in Africa's drylands. ....	292
TS2-A-321	Amélioration de la productivité des agro-systèmes à l'aide de techniques de simulation et d'optimisation. ....	296

#### **Index des mots-clé - *Index of key words***

.....	303
-------	-----

#### **Index des chefs de projet - *Index of project leaders***

.....	313
-------	-----

#### **Index des institutions - *Index of institutions***

.....	317
-------	-----

Réalisation  
Olivier Guyaux Communication s.a.  
Rue des Bollandistes, 23 - B-1040 Bruxelles

Cet ouvrage a été composé par publication assistée par ordinateur

Imprimé sur les presses de l'imprimerie  
Van Ruys - Bruxelles

1995