

CR002441



institut Sénégalais de Recherche Agricole

Université Libre de Bruxelles



Centre d'Etude Régional pour l'Amélioration de l'Adaptation à la Sécheresse

Méthodes de culture utilisées en serre et techniques biophysiques de mesure

Rapport de stage

Du 1^{er} Mars au 1^{er} Mai 2001 au Laboratoire de Physiologie et d'Agrotechnologies
Végétales (LPAV) de l'ULB (Belgique)

Présenté par

M.Papa **Malick** SALL

Juin 2001

SALL
PHYS2
2641

Introduction

Le CERAAS est un laboratoire national de l'ISRA et un centre régional de recherche spécialisé dans l'amélioration de l'adaptation des plantes à la sécheresse. Son mandat est de conduire des recherches et de participer à la formation par la recherche de chercheurs, ingénieurs et techniciens de la sous région. Cette formation nécessite un transfert permanent de technologies du Nord vers le Sud afin de renforcer le potentiel scientifique et technique du Ceraas. Le CGRI (Commissariat général aux relations internationales) dans le cadre de l'accord culturel sénégal-belge finance des séjours d'échanges entre scientifiques du Sénégal et de la Belgique. C'est ainsi que nous avons effectué un stage du 1^{er} mars au 1^{er} mai 2001 au LPAV de l'ULB. Au cours de cette formation nous nous sommes initiés à la phytotechnie des serres et à de nouvelles techniques utilisables dans les études sur l'adaptation à la sécheresse comme la spectroradiométrie, la spectrométrie d'absorption atomique, la fluorescence FMS II (Fluorescence Measurement System II), la mesure des échanges gazeux avec un IRGA type CIRAS et la mesure du phosphore par spectrométrie.

I Phytotechnie en serre : La serre du laboratoire d'agrotechnologies de l'ULB est entièrement automatisée et est munie d'un système de gestion des fenêtres et rideaux.

Pour des températures élevées par rapport à la référence de réglage, les rideaux sont fermés et les fenêtres ouvertes.

La serre comporte un système d'alimentation en eau bi distillée obtenue par système d'osmose inverse (voir photo2). L'eau potable arrive dans une grande cuve où elle est déminéralisée une première fois ; puis elle passe dans un adoucisseur qui la distille une seconde fois.

Les pots de culture sont posés sur des caches qui peuvent être soit des pots de plus grands diamètres soit des plateaux (voir photo3), ce qui permet d'éviter la perte des éléments fertilisants par drainage.

Les substrats de culture utilisés sont inertes (fibres de coco, vermiculite, laine de roche). Les graines sont toujours pré germées. Au cas où le substrat serait du sable, les racines des plantules sont plongées dans une solution de fongicide systémique avant le repiquage. La fertilisation est apportée sous forme de sels (KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) ou à l'osmocote (engrais à diffusion programmée). La concentration en éléments fertilisants est en général de 50 méq pot⁻² alors qu'en hydroponie, elle ne doit pas dépasser 30 méq pot⁻¹. Les traitements phytosanitaires sont effectués pour certaines plantes de manière préventive et pour d'autres au besoin avec une gamme de produits disponibles (tableau 1).

Tableau 1 : Traitement insecticide et fongicide utilisés contre les nuisibles et les ravageurs en serre

Produits	Actions	Doses
SHERIFF	Insecticide du sol	2g /plant
Compo	Insecticide contre pucerons, chenilles, mouches blanches	60 à 100ml dans 10L pour 100 m ²
Decisquick	Insecticide de contact et d'ingestion	400 ml/ha
Pyranica 200EC	Acaricide	500 ml/ha
Dichlorovos	Contre acariens et mouches blanches	500 ml/ha
Nicotine	Contre mouches blanches	1 gr / l
Fopaz 100EC	Fongicide systémique	5 ml/10L/are
Virolex	Fongicide systémique	8 ml/100m ²
Systane	Fongicide systémique	8 ml/100m ²

L'hydroponie : La serre est pourvue de trois dispositifs en hydroponie différents (voir photo 4 et 5)

- un système des marées identique à celui utilisé au CERAAS
- un système à pulsion d'air où l'oxygénation des plantes est apportée par des tuyaux alimentés par un compresseur. C'est **un** système peu encombrant et très pratique.
- un système sans oxygénation qui nous a servi de support pour une expérimentation sur le maïs. Ici le substrat est la laine de roche, la solution nutritive utilisée a **une** composition suivante :

Solution hydroponique de Maïs

Bidon A en g / 5l

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	(nitrate de calcium)	218,4g
MnSO ₄	(sulfate de manganèse)	1,120g
ZnSO ₄	(sulfate de zinc)	0,421g
H ₃ BO ₃	(acide borique)	0,812g
CuSO ₄	(sulfate de cuivre)	0,06g
Heptamolybdate	d'ammonium	0,653g

Bidon B en g / 5l

Mg SO ₄ 7H ₂ O	114g
KH ₂ PO ₄	31,5g
KNO ₃	117,9g
Chélate de fer	4,52g

PH réajusté à 5

A coté de ces kits un dispositif avec substrat est utilisé pour les expérimentations de travaux pratiques.

II Les techniques de mesure utilisées

2-1 Le spectroradiomètre

2-1-1 Présentation : Le spectroradiomètre de type GER (Geophysical and Environmental Research) est un appareil portable qui permet de mesurer la réflectance foliaire (voir photo 6). Il peut être utilisé aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire. Il permet d'exprimer la réflectance des feuilles en fonction de la longueur d'onde. Il se caractérise par :

-un domaine spectral étalé de 350 à 1050 nm

-un pas de 1,5 nm

-un détecteur en silicium

-un champ de vue instantané

-un poids **de 1,8 kg**

-une mémoire de 483 courbes

-un temps d'intégration moyen allant de 5 à 160 ms

-une moyenne de mesures par prise de 1 à 0

Lorsque le rayonnement arrive à la surface de la terre, celui-ci peut être réfléchi, absorbé par la surface ou transmis. La proportion de l'énergie qui est réfléchie, absorbée ou transmise dépend de la nature et de l'état des surfaces mais aussi de la longueur d'onde.

La réflectance foliaire peut être définie comme la part de l'énergie incidente qui est réfléchie. Elle est souvent utilisée en télédétection. Et lorsqu'elle est exprimée en fonction de la longueur d'onde, elle correspond à une signature spectrale de la surface considérée.

La signature spectrale de la végétation est caractéristique. Elle est constituée de 2 pics : un petit pic dans le vert qui donne la couleur verte aux végétaux et un grand pic dans l'infrarouge (IR). Au niveau de (IR) il n'y a pas d'absorption à cette longueur d'onde d'où une réflectance élevée. A ces longueurs d'onde, la signature spectrale présente des minima (Wolff, 1996 et 1997). L'effet inverse se traduit dans le bleu et le rouge où les pigments assurent une absorption importante.

C'est ainsi qu'un stress a un effet direct sur la signature spectrale qui peut avoir comme principales conséquences :

- une augmentation de la réflectance dans le visible
- une diminution de la réflectance dans l'infrarouge

Afin de caractériser cette différence spectrale entre traitement au cours d'une expérimentation un paramètre de quantification appelé NDVI est souvent utilisé en télédétection : (Wolff, 1997 et 1998).

Le NDVI est un indice de végétation calculé au cours du temps et se définit comme le rapport de réflectance suivant : **$NDVI = \frac{\text{Proche infrarouge} - \text{Rouge}}{\text{Proche infrarouge} + \text{Rouge}}$**

avec le proche infrarouge fixé à 900nm et le rouge à 700nm.

2- I-2 Protocole de mesure :

Une sonde reliée à l'appareil permet de mesurer au préalable un étalon puis l'échantillon. Cette mesure de référence est primordiale pour les mesures de réflectance. En fait, le radiomètre mesure la radiance de l'objet et calcule le rapport (en %) entre cette radiance et celle de l'étalon. Deux conditions doivent être remplies par un étalon :

-être un réflecteur parfait : l'absorption et la transmission doivent être nulles, ainsi tout rayonnement incident sera entièrement réfléchi.

-être un diffusant parfait : les surfaces parfaitement lisses subissent une réflexion spéculaire c'est à dire que toute l'énergie est réfléchie dans une seule direction suivant l'angle du rayon incident.

L'étalon est en général constitué par une feuille de papier blanche.

Pour la suite des mesures, les données sont transférées vers un ordinateur où les courbes sont visualisées et exploitées.

2-2 Le spectrophotomètre d'absorption atomique

La spectroscopie atomique s'applique à l'analyse qualitative et quantitative d'environ 70 éléments chimiques. Sa rapidité, sa simplicité, sa sélectivité exceptionnellement élevée et le coût modéré de son appareillage constituent autant d'atouts supplémentaires de la méthode (voir photo 7).

Pendant la mesure l'échantillon à analyser est introduit sous forme de gouttelettes dans une flamme où il est porté à une température élevée (2600-2800°C). La majeure partie de l'échantillon est alors dissociée sous forme atomique. Une partie des atomes est excitée jusqu'à des niveaux d'énergie supérieurs tandis que la plupart reste à des niveaux d'énergie plus bas. Ce sont ces derniers qui sont mesurés par l'absorption atomique.

Les atomes libres produits, par la rupture des liaisons entre les molécules de l'échantillon, absorbent les radiations (de longueurs d'onde caractéristiques des éléments présents) provenant d'une lampe à cathode creuse.

Cette lampe à cathode creuse émet un faisceau lumineux dont le spectre correspond au spectre d'absorption de l'élément. Le faisceau lumineux passe à travers la flamme et une partie de ce faisceau est absorbée par les atomes.

L'appareil mesure la quantité des radiations absorbées par l'échantillon ou par les atomes libres. D'après la loi de BEER, cette absorption est proportionnelle à la concentration des éléments dans l'échantillon analysé.

Le calcul est fait en comparant la valeur d'absorption obtenue pour l'échantillon par rapport aux valeurs d'absorption obtenues pour les standards qui sont préparés pour chacun des éléments.

2-3 Le système de mesure de la fluorescence FMS II (Fluorescence Measurement System II) :

Les manipulations effectuées n'ont pas été concluantes (lumière actinique sans réponse et valeurs aberrantes) : nous ne présenterons ici qu'une description de l'appareil FMS et de son principe de mesure.

L'appareil également appelé PAM (Pulse Amplitude Modulation), est un fluorimètre de la société Hansatech, qui donne le détail de la phase lente de la cinétique de fluorescence ou effet Kautsky (voir photo 8). Celle-ci peut être suivie en temps réel sur l'écran d'un ordinateur, qui est relié à la boîte de contrôle.

Le protocole de mesure est identique à celui du fluorimètre de type PEA qui mesure la fluorescence rapide : une adaptation de feuilles à l'obscurité est réalisée avec l'installation du clip pendant une demi-heure environ. Puis, la sonde qui renferme une fibre optique est fixée sur le clip. Cette fibre sert à éviter de prendre en considération les longueurs d'onde en dehors du spectre de fluorescence.

La grande différence avec le fluorimètre PEA est l'utilisation d'une lumière modulée pour obtenir la fluorescence initiale (F_0). Sur cette lumière modulée de fond, on surimpose une lumière saturante pour atteindre les niveaux optimaux de fluorescence. Quant à la lumière actinique, elle sera ensuite appliquée pour induire les réactions photochimiques de fluorescence et atteindre l'état stationnaire de la phase lente après une dizaine de minutes.

Les paramètres mesurés et calculés par l'appareil sont récapitulés dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Paramètres de quantification de la fluorescence

F_0	Fluorescence initiale au temps t_0 qui suit l'adaptation à l'obscurité au moment où tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts, c'est-à-dire que les accepteurs d'électrons sont totalement oxydés.
F_m	Fluorescence maximale atteinte lorsque l'échantillon préalablement adapté à l'obscurité est soumis à un pulse de lumière saturante. Tous les accepteurs d'électrons sont temporairement réduits, ce qui bloque la photochimie du PSII
F_v	Fluorescence variable adaptée à l'obscurité ($F_m - F_0$)
F_v/F_m	Rendement quantique maximal de photochimie du PSII, adapté à l'obscurité. ($\Phi_{PSII\max} = TR/ABS$)
F_s	Fluorescence à l'état stationnaire
F_m'	Fluorescence maximale atteinte lorsque l'échantillon préalablement adapté à la lumière est soumis à un pulse de lumière saturante
F_0'	Fluorescence minimale des plantes adaptées à la lumière au moment où tous les centres réactionnels du PSII sont ouverts
F_v'	Fluorescence variable adaptée à la lumière ($F_m' - F_0'$)
F_v'/F_m'	Rendement des antennes du PSII après adaptation à la lumière
$\Phi_{PSII\text{R}}$	Rendement quantique réel de photochimie du PSII. $= (F_m' - F_s)/F_m' = ET/ABS$ avec $ET = TR$ à l'état stationnaire

q_P	Coefficient d'extinction photochimique $= (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$
q_{NP}	Coefficient d'extinction non photochimique $= (F_m - F_m') / (F_m - F_o')$
$iNPQ$	Extinction non photochimique (autre définition). $= (F_m - F_m') / F_m'$

2-4 L'analyseur à infrarouge type CIRAS

IX CIRAS est un analyseur de gaz à infrarouge produit par la société PP-system. Il est composé en fait de 4 analyseurs indépendants : deux pour le dioxyde de carbone et deux pour l'eau.

Une paire ($CO_2 + H_2O$) avec entrée et sortie commune est définie comme la référence tandis que l'autre est l'analyse.

Les mesures de concentrations en CO_2 sont exprimées par des différences entre référence et analysé et sont pratiquées au moyen d'une cuvette dans laquelle est placé l'échantillon végétal qui reste attaché à la plante entière. Dans cette cuvette de l'air avec une concentration en CO_2 pouvant varier de 0 à 2000 vpm est insufflé si on place une bombonne de CO_2 . L'humidité peut être également contrôlée en mode automatique : la température foliaire et le PAR (entre 15 et 2000 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$) fixés. L'intérêt est de pouvoir simuler les conditions de croissance de la plante en fixant des valeurs fréquemment rencontrées. Bien que portable et pouvant fonctionner de manière autonome, le CIRAS est assez encombrant. Relié à un PC il permet de suivre l'établissement des valeurs de T° foliaire (TL), de concentration en CO_2 interne (CINT), de conductance stomatique (GS) et photosynthèse nette (PN) jusqu'à stabilisation au cours du temps. En général, cela se produit au bout de 5 à 10 minutes, ce qui correspond au temps d'adaptation aux conditions de mesure nécessaire à la plante. Les paramètres mesurés et calculés par le CIRAS sont présentés dans le tableau 3 :

Tableau 3 : Paramètres mesurés et calculés par l'analyseur CO_2/H_2O de type CIRAS

Paramètres	Unités
Débit d'air sec dans la cuvette	$cm^3 s^{-1}$
Surface de la feuille	cm^2
Résistance de la couche limite à la vapeur d'eau	$msmol^{-1}$
Pression atmosphérique	bar
Débit d'air sec dans la cuvette à 20°C et 1 bar	$cm^3 s^{-1}$
Densité du flux de photons	$\mu mol m^{-2} s^{-1}$
Température de l'air dans la cuvette	$^\circ C$
Flux massique d'air sec /unité de surface foliaire	$mol m^{-2} s^{-1}$
Pression de vapeur de l'eau de l'air dans la cuvette	bar
Pression de vapeur de l'eau de l'air de la cuvette	bar
Pression de vapeur saturée à la T° de la feuille	/bar
Température de la feuille	$^\circ C$
Radiation absorbée par la feuille	$W m^{-2}$
Différence de température entre la feuille et l'air	$^\circ C$
Concentration en CO_2 de l'air dans la cuvette	$\mu mol mol^{-1}$
Concentration en CO_2 de la chambre sous stomatique	$\mu mol mol^{-1}$
Résistance stomatique à la vapeur d'eau	$m^2 smol^{-1}$
Conductance stomatique à la vapeur d'eau	$mol m^{-2} s^{-1}$
Conductance totale au transfert de CO_2	$mol m^{-2} s^{-1}$
Taux d'échange de CO_2 dans la cuvette (photosynthèse)	$\mu mol m^{-2}$
Taux de transpiration	$mol m^{-2} s^{-1}$

Le CIRAS est également capable de réaliser des courbes de saturation en CO_2 et lumière.

2-5 Dosage et mesure du phosphore par spectrométrie

La valorisation agronomique des boues de dragage et d'épuration (analyse de la composition minérale des boues après stockage, possibilité de neutralisation et lixiviation des métaux lourds; par chaulage) constitue l'une des activités du Laboratoire de Physiologie et d'Agrotechnologies Végétale de l'ULB. La teneur des éléments chimiques contenus dans les boues varie pendant le stockage (influence de la durée de stockage et de l'horizon de surface dans le tas). Des travaux antérieurs ont révélé que cette altération était très marquée par rapport au phosphore, un des éléments importants de la nutrition minérale des plantes. C'est dans ce cadre que nous avons participé à une expérimentation pour évaluer la quantité de phosphore contenue dans les boues stockées. Ce travail nous a permis de nous initier à la technique de dosage du phosphore par la méthode de Hedely et al, 1982.

Toutes les formes de phosphore ont été extraites et dosées

Extraction séquentielle

- Extraction des formes minérales et organiques du phosphore avec de l'eau.

- Extraction des formes de phosphore labiles (minérales et organiques) avec NaHCO_3 (0.5 M à pH 8.5).

- Extraction du P minéral adsorbé par les minéraux ou par les colloïdes organiques et le phosphore organique présent dans les composés humiques et fulviques par NaOH (0.1 M)

- Solubilisation des phosphates de calcium par HCl (1.0 M).

Après chaque extraction, les teneurs en phosphore minéral et total des surnageants sont mesurées. Le phosphore minéral est mesuré par colorimétrie à 712 nm (Murphy et Riley, 1962). Le phosphore total contenu dans les extraits de H_2O , NaHCO_3 et NaOH est déterminé après digestion à 120°C en présence de 1.8 M H_2SO_4 et de persulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ et mesuré par colorimétrie (photo 6). Le P organique de ces extraits est calculé comme la différence entre leur phosphore total et leur phosphore minéral. Le phosphore résiduel restant dans les boues est calculé par différence entre le phosphore total des boues et la quantité de phosphore extraite durant l'extraction séquentielle.

Protocole

a) Réactifs :

H_2O , NaHCO_3 0.5 M à pH 8.5 ; NaOH 0.1 M ; HCl 1 M et HClO_4 concentré

b) Extraction

- Jour 1 : peser 2g de sol broyé (0.5 g de boue) dans un flacon de centrifugation de 200 ml + 100 ml d'eau distillée. agiter pendant 17 heures.

- Jour 2 : centrifuger la suspension (10000 rpm) et filtrer le surnageant. Apporter 100 ml NaHCO_3 0.5 M à pH 8.5 sur le culot et agiter pendant 17 heures.

- Jour 3 : centrifuger la suspension et filtrer le surnageant. Apporter 100 ml de NaOH 0.1 M sur le culot et agiter pendant 17 heures.

- Jour 4 : centrifuger la suspension et filtrer le surnageant. Apporter 100 ml de HCl 1 M sur le culot et agiter pendant 17 heures.

- Jour 5 : centrifuger la suspension et filtrer le surnageant. Apporter 100 ml de nouveau de NaOH 0.1 M sur le culot et agiter pendant 17 heures.

- Jour 6 : centrifuger la suspension et filtrer le surnageant. Transférer le sol resté dans un flacon d'attaque, ajouter 20 ml d'acide perchlorique pour mesurer le P résiduel comme le P total.

c) Dosage :

- Dosage du P en solution (méthode de Murphy et Riley, 1962) :

-Pipeter un volume aliquote de la solution à doser dans une fiole volumétrique de 50 ml. ajuster le pH avec le NaOH 4 N et le H₂SO₄ 0,5 N en utilisant le paranitrophénol comme indicateur. Ajouter 8 ml de solution de coloration. homogénéiser et attendre 10 minutes, puis lire la densité optique (Do) sur le spectrophotométrie à 712 nm.

-Réactifs nécessaires à la fabrication de la solution de Murphy et Riley :

- 40g de molybdate d'ammonium par litre
- 26.4g d'acide ascorbique par 500 ml
- 1.454g de tartrate d'antimoine de potassium par 500ml d'eau distillée

-Préparation de la solution de Murphy et Riley : à 250 ml de H₂SO₄ 5N, ajouter 75 ml de solution de molybdate d'ammonium, puis 50 ml de solution d'acide ascorbique. 25 ml de solution d'antimoine. et enfin compléter le volume à 500 ml d'eau distillée.

• Dosage du P inorganique dans les extraits NaHCO₃ et NaOH

-Pipeter 10 ml de solution dans un tube de centrifugeuse de 50 ml

-Acidifier à pH 1.5 avec 3.6 ml de H₂SO₄ 1.8 N (pour précipiter les matières organiques).

-Centrifuger à 10000 rpm

-Décantier le surnageant dans une fiole volumétrique de 50ml

-Ajouter 1 goutte d'indicateur. ajuster le pH, apporter le réactif de coloration et développer la couleur

• Dosage du P total dans les extraits H₂O, NaHCO₃ et NaOH :

-Pipeter 5 ml de solution dans un erlenmeyer de 50 ml

-Ajouter 10 ml de H₂SO₄ 1,8 N + 0,5 g de persulfate d'ammonium

-Couvrir de papier d'aluminium et autoclaver pendant une heure à 120°C.

-Transférer la solution dans une fiole de 50 ml, ajuster le pH. apporter le réactif de coloration et développer la couleur.

Conclusion Le contexte agronomique des pays de la sous région se caractérise globalement par une baisse des rendements des cultures qui découle de la double contrainte climatique et édaphique. Cette situation mise en relation avec l'accroissement exponentiel de la population s'est traduite par un déséquilibre au niveau des indicateurs macroéconomiques de nos états qui a pour principales corollaires la pauvreté, la malnutrition et la famine.

L'une des solutions préconisées par la plupart des acteurs au développement pour résoudre cette crise reste la redynamisation de l'agriculture via la recherche agricole par la création de variétés mieux adaptées à nos conditions climatiques et la revitalisation de nos sols.

A ce titre notre séjour en Belgique a été très fructueux. En effet il **nous** a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur des techniques utilisées en nutrition minérale et en physiologie de l'adaptation à la sécheresse. Ces techniques contribueront à approfondir les connaissances sur les mécanismes agrophysiologiques des espèces cultivées dans les pays en zones sèches en tenant compte de la double contrainte hydrique et minérale, à améliorer les connaissances sur la génétique des caractères, à participer au développement d'outils (modèles de cultures et SIG) pour la prévision agricole et la détection des zones de calamité agricole pour l'aide à la décision. Par cette occasion nous remercions le CGIAR qui nous a permis de bénéficier d'une bourse de formation à l'ULB. Cette institution n'a ménagé aucun effort pour nous mettre dans de bonnes conditions pendant notre stage. Nos remerciements vont à l'endroit du professeur Delhave et de l'ensemble du personnel du laboratoire de physiologie et d'agrotechnologies végétales de l'ULB pour leur disponibilité et leur sens de l'accueil. Nous remercions également le directeur du Ceraas pour avoir autorisé et facilité cette mission.

Photo 1: Système de commande de la serre de l'ULB

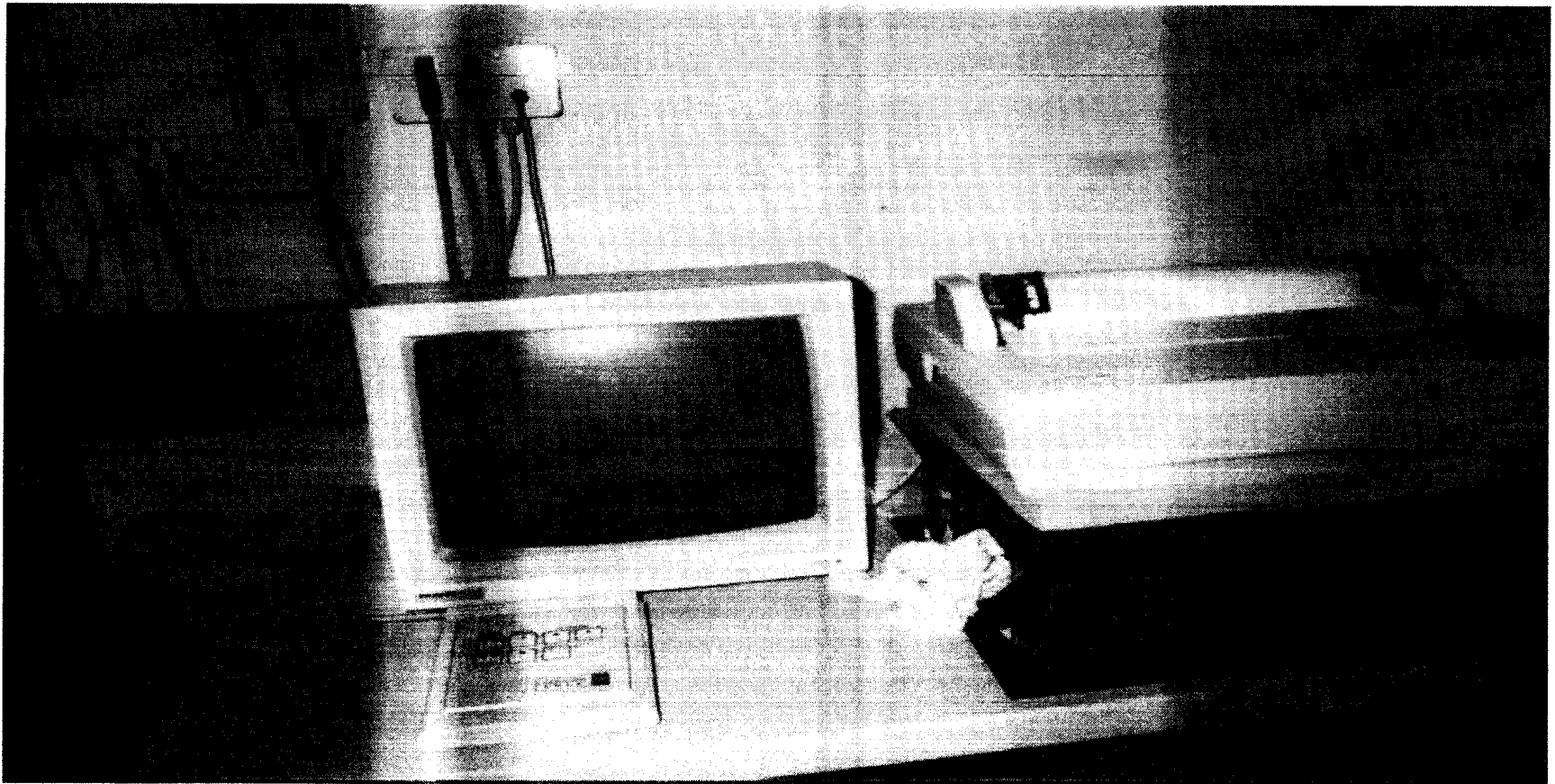


Photo 2: Système d 'osmose inverse de l 'eau bidistillée

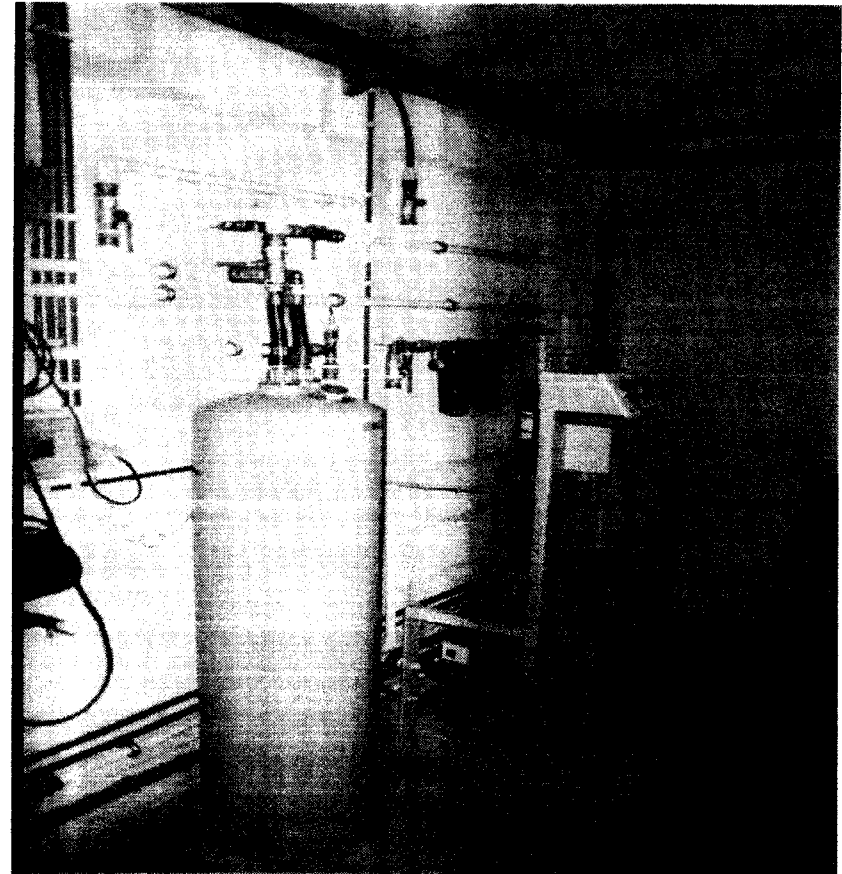
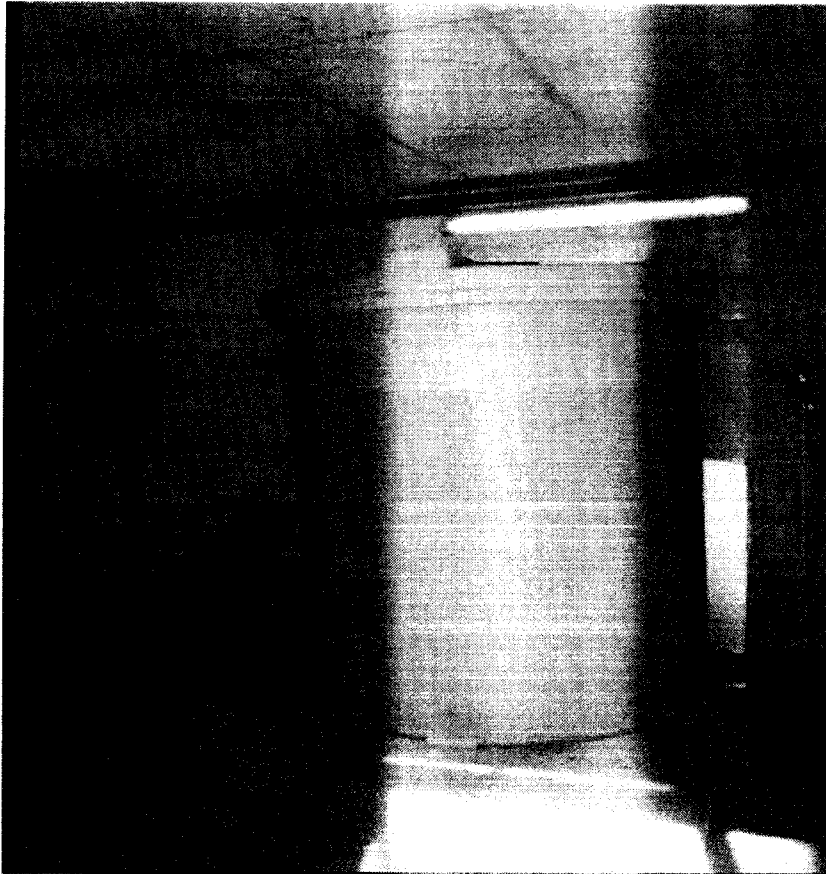


Photo 3: Supports de culture

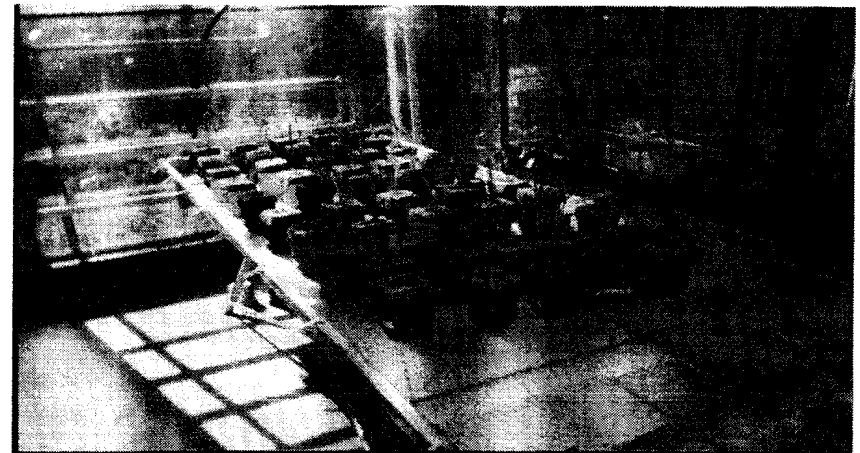


Photo 4: Différents systèmes hydroponiques

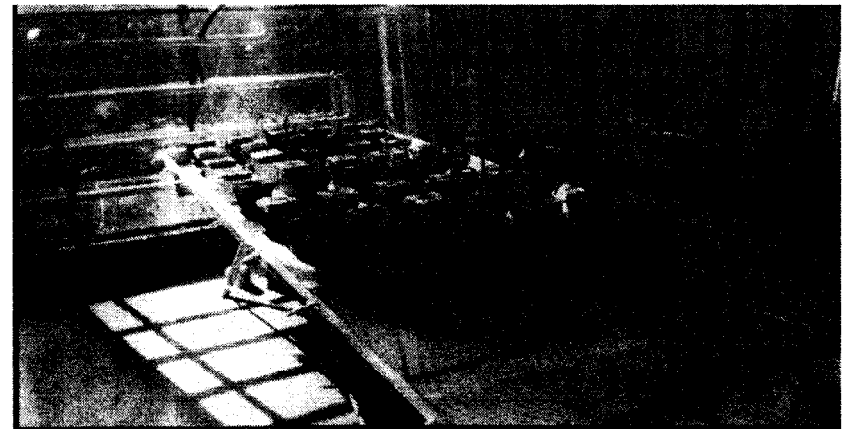
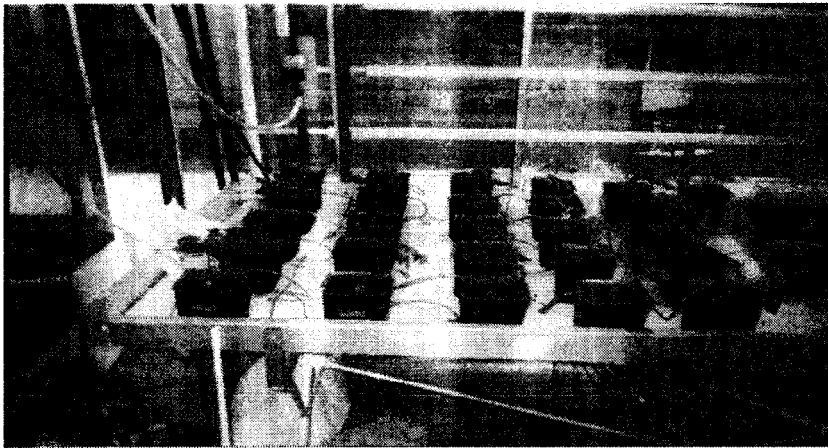


Photo 5: Hydroponie sur substrat

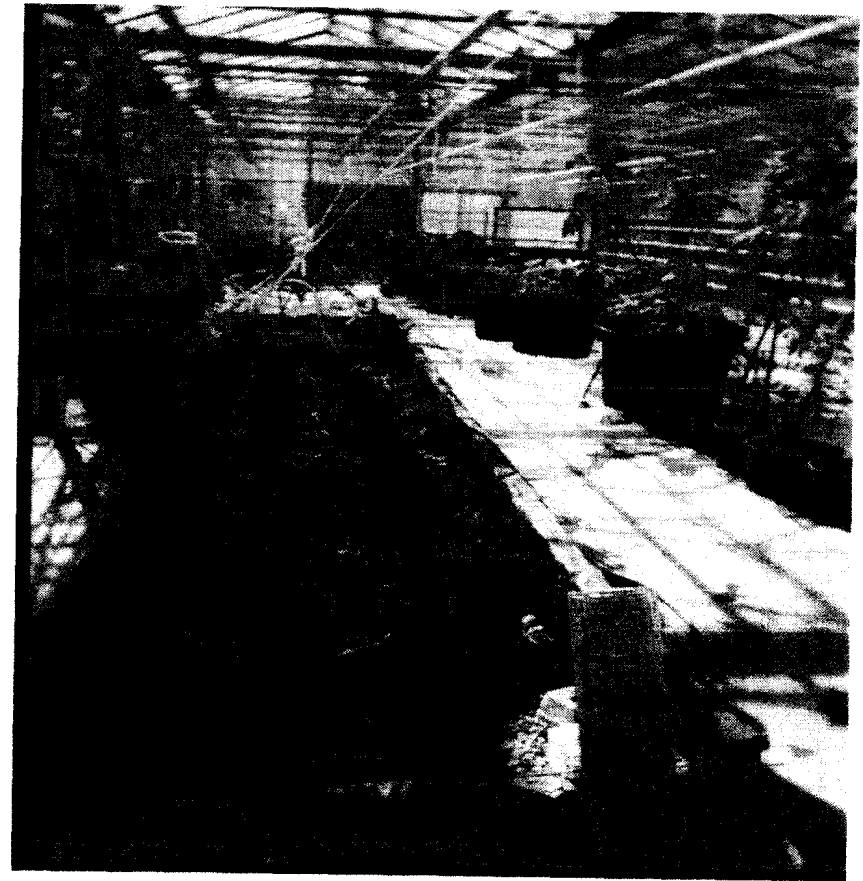


Photo 6: Spectroradiomètre

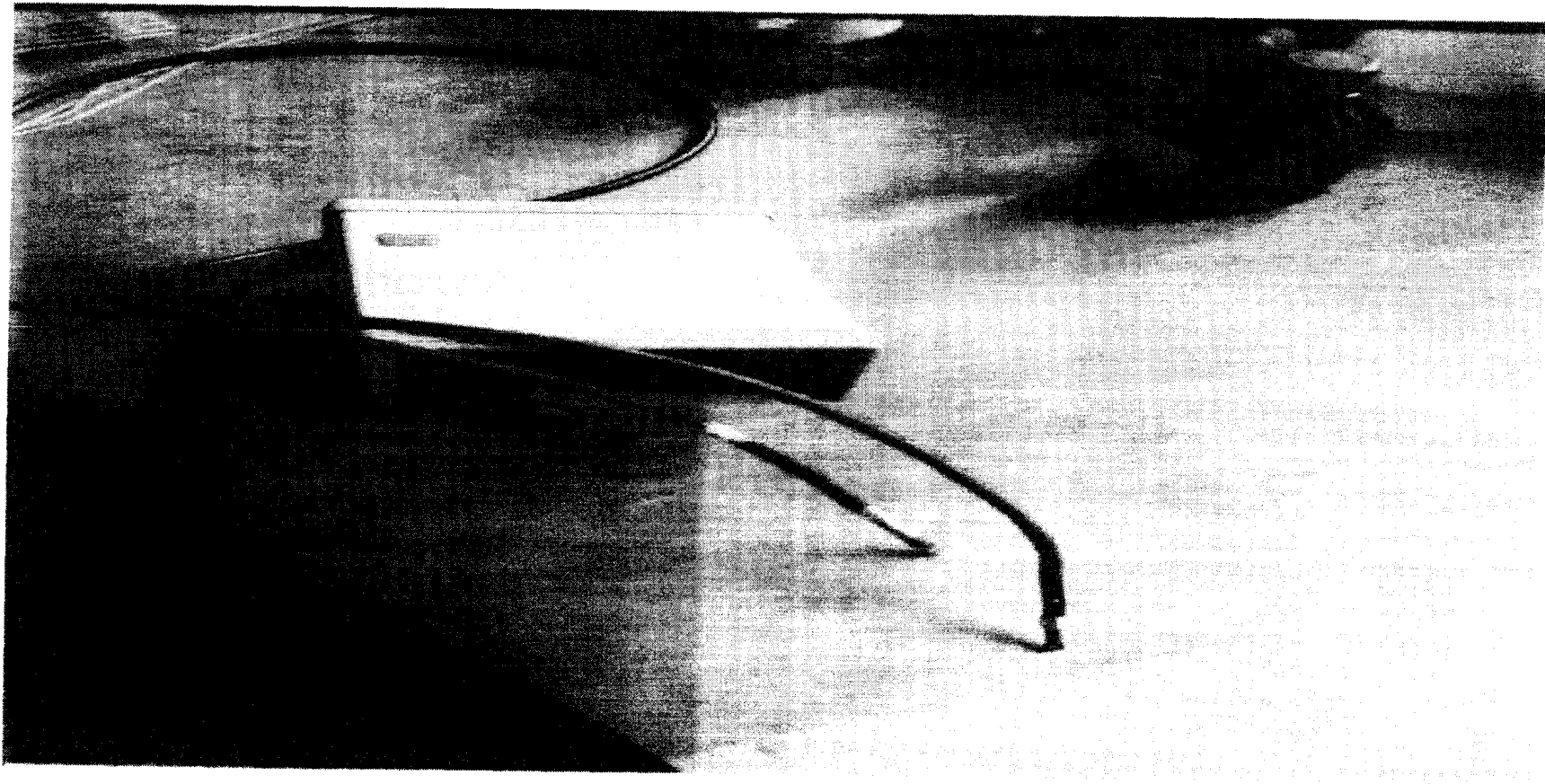


Photo 7: Spectrophotomètre d'absorption atomique

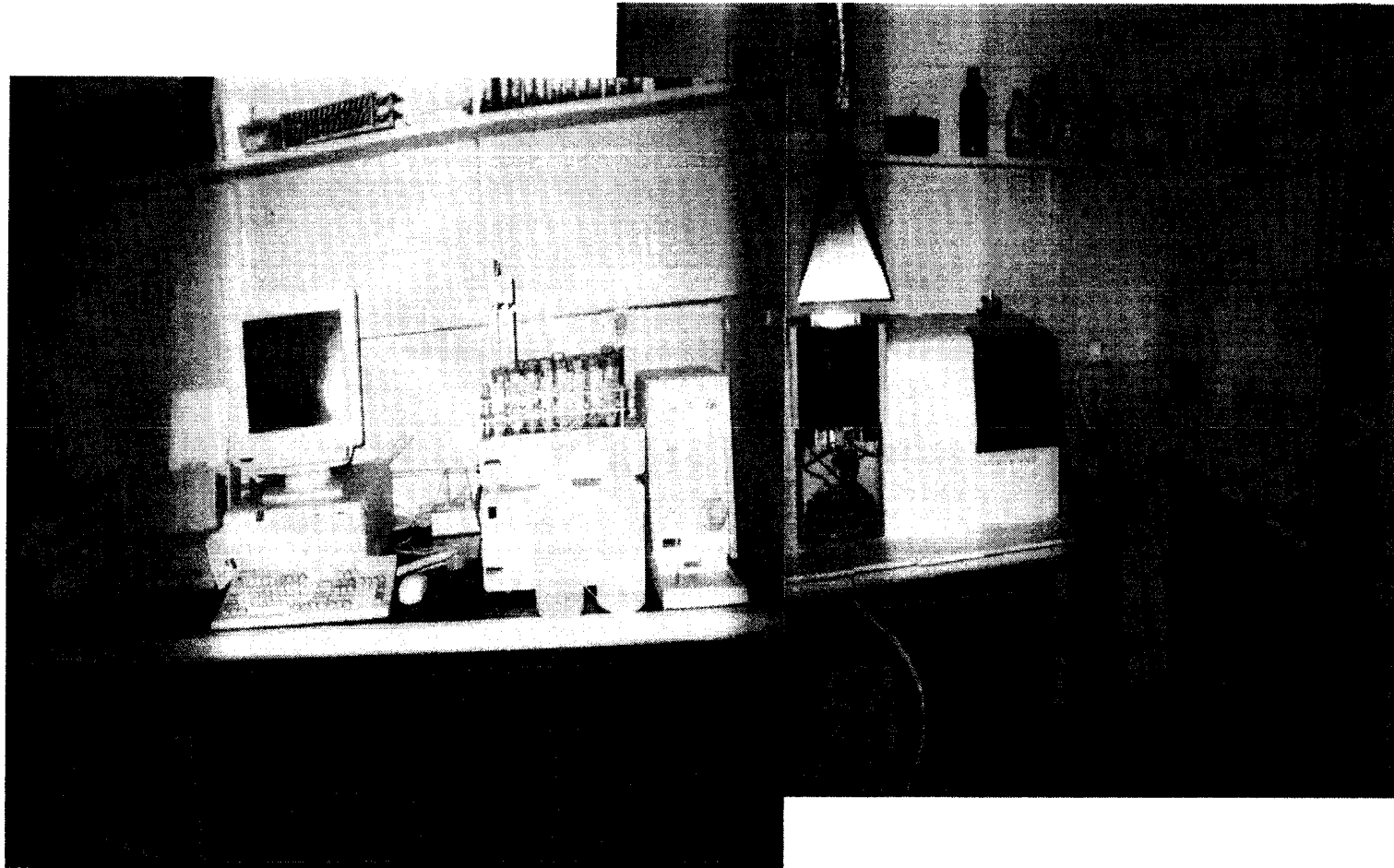


Photo 8: P.A.M et Spectromètre

