

ISBN/ISSN : 678-99919-62-55-9

# ANNALES DE L'UNIVERSITE DE PARAKOU



*Parakou, BENIN*

*Série "Sciences Naturelles et Agronomie"*

*NUMERO 1  
(2010)*

*VOLUME 1*



# ANNALES DE L'UNIVERSITE DE PARAKOU

Revue publiée par le Vice Rectorat chargé de la Recherche Universitaire de l'Université de Parakou (RU/UP)

Site Web : <http://>

Dépôt légal : N°3362 du 26 juin 2007 Bibliothèque Nationale

ISBN/ISSN : 678-99919-62-55-9

Annales de l'Université de Parakou

Editeur : Vice Rectorat, Chargé de la Recherche, Université de Parakou

BP 123 Parakou (Bénin) Tél/Fax : (229) 23 61 07 12

## Comité d'Édition

**Président :** Professeur Simon A. AKPONA

**Vice Président :** Professeur Nestor SOKPON

**Secrétaire :** Professeur Prosper GANDAHO

*Série : Sciences Naturelles et Agronomie*

## Comité de Publication

**Directeur de Publication :**

Professeur Nestor SOKPON

**Secrétaire de publication :**

Docteur Ernest GOUDEGNON

**Membres :**

Docteur Sanni DOKO A.

Docteur Is Haq DAOUDA

Docteur Ibrahim ALKOIRET

Docteur Léonard AFFOUDA

Docteur Christine OUINSAVI

## Comité de Lecture

Prof S. Alidou (Sciences de la Terre), Prof A. Sanni (Biotechnologie), Prof S. A. Akpona (Biochimie), Prof. M. Boko (Climatologie), Prof G. Biau (Economie Rurale), Prof. B. Sinsin (Ecologie Végétale et Animale), Prof. V. Agbo (Sociologie), Prof N. Sokpon (Sciences Forestières), Prof J. Lejoly (Ecologie Tropicale), Prof K. Akpagana (Ecologie Végétale), Prof A. Akoegninou (Botanique), Prof P. Atachi (Entomologie), Prof D. Kossou (Phytotechnie), Prof A. Fantodji (Biologie Marine), Prof J. Hounhouingan (Technologie Alimentaire), Prof. L. J. G. Van de Maesen (Botanique), Prof Ph. Laleye (Hydrobiologie), Prof A. Ahanchédé (Malherbologie), Prof J. CT. Codjia (Zoologie), Prof. S. Adoté-Hounzangbé (Parasitologie), Prof E. Agbossou (Hydraulique), Prof B. Biao (Economie), Prof F. A. Abiola (Ecotoxicologie), Prof G. A. Mensah (Zootechnie), Prof M. C. Nago (Biochimie Alimentaire), Prof J. Zoundjiékpon (Génétique), Prof R. Mongbo (Sociologie Rurale), Prof N. Fonton (Biométrie)

## Table des Matières

### CONTENU

- C. Ouinsavi , N. Sokpon :** 01- 19  
Spatial structure of genetic variation of *Milicia excelsa* populations in Benin revealed by random amplified polymorphic DNA Markers
- F. Agognon, C. Ouinsavi , N. Sokpon :** 20 - 36  
Caractérisation écologique des populations rémanentes de samba (*Triplochiton scleroxylon* K. Schum) et essais d'amélioration génétique des arbres par greffage et cerclage au Bénin
- A.D. Kokutse , N. Amusant , N. Boutahar , G. Chaix :** 37 -50  
Influence of soil properties on the natural durability, extractive content and colour of teak(*Tectona grandis* L.f) wood in Togo
- C. E. Agbangba, D. G. Dagbenonbakin, V. Kindomihou :** 51 -69  
Etablissement des normes du Système Intégré de Diagnostic et de Recommandation de la culture d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr) variété Pain de sucre en zone subéquatoriale du Bénin
- E. Y. Attakpa, M. S. Hounzangbe-Adote, B. P. Bessarabov:** 70 - 89  
Caractéristiques épidémiologiques de l'association bursite infectieuse - colisepticémie chez les poulets de chair «broiler-6»
- E.Y .Attakpa, P. A. Olounlade , R. H. Bosma:** 90- 98  
Comparative study of the resistance : of broilers to colisepticaemia after vaccination against infectious bursal disease and *escherichia coli* inoculation



## Spatial structure of genetic variation of *Milicia excelsa* populations in Benin revealed by random amplified polymorphic DNA markers

Christine Ouinsavi\*, Nestor Sokpon

Laboratoire d'Études et de Recherches Forestières, Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, BP 123 Parakou, République du Bénin;

\*Author for correspondence: E-mail: [christine.ouinsavi@sbf.ulaval.ca](mailto:christine.ouinsavi@sbf.ulaval.ca); [ouinsch@yahoo.fr](mailto:ouinsch@yahoo.fr)  
Phone : (229) 90023053, Fax: (229) 2361 0712

### Abstract

The level of genetic variation and the pattern of genetic structure in twelve natural populations of *Milicia excelsa*, covering the species range in Benin, were assessed using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Based on seven primers, a total number of 49 bands were recorded in 116 *Milicia excelsa* sample investigated, of which 44 bands (89.8 %) were polymorphic. Genetic variation was moderate ( $N_A = 1.933 \pm 0.258$ ,  $N_E = 1.416 \pm 0.364$ ,  $h = 0.252 \pm 0.177$  and  $H_S = 0.168 \pm 0.012$ ). Genetic differentiation among populations was moderate ( $G_{ST} = 0.331$ ) indicating that 33 % of the total genetic variation accounted for among-population differentiation. Estimated gene flow equaled to  $Nm = 1.01$  showing limited seed and pollen dispersal among populations. Cluster analysis dispatched populations into four groups based on genetic distances. In addition, Barrier analysis combining geographical coordinates and genetic differentiation among populations pairs, has distinguished three main zones with sharp genetic change and lower gene flow, likely due to an effect of isolation by distance. Based on these results, conservation actions could be planned to ensure the maintenance of appropriate levels of genetic variation in *Milicia excelsa* populations in Benin.

*Keywords:* genetic variation, population structure, *Milicia excelsa*, RAPD.

### Introduction

*Milicia excelsa* Welw. C.C. Berg (Moraceae) commonly known as iroko is a dioecious species widely distributed across West Central and East Africa and occurs in a wide belt from Côte d'Ivoire to Tanzania. *M. excelsa* grows in transitional vegetation between closed forests and savanna (Howthorne, 1995). It is often found in gallery forest and can be found in deciduous, semi-deciduous or evergreen forest. Occasionally it is found in isolated relict forests from sea level to about 1300 m. It is



fairly abundant in the drier areas of semi-deciduous *Antiaris-Chlorophora* forest. In Republic of Benin, *M. excelsa* is distributed across the whole country area between latitude 6°30'N to 11°N.

From the early 1980s up to late 1990s, this species was the focus of an important transaction between Africa and Europe. Many African countries were exporters of iroko timber, especially Ghana (traded together with *M. regia*), Côte d'Ivoire, Cameroon, Congo and Gabon (WCMC, 1991). As a result of its over-exploitation, this species was classified on the IUCN red list as close to vulnerable (IUCN, 2006) and has been given conservation priority in many African countries. Genetic diversity assessment is necessary for *M. excelsa* genetic resources conservation. Therefore, attention needs to focus on the level of biological structure within the species.

Nowadays, a panel of molecular markers is available for genetic resources characterization, management and use. This wide array of DNA markers such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR), inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) has enabled researchers to investigate genetic diversity among various plant species across natural populations (Vanijajiva *et al.*, 2005; Jeandroz *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2003; Archak *et al.*, 2003, Lowe *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 1995).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), a technique generated by PCR using single decamer primers to amplify arbitrary fragments of DNA from priming sites throughout the entire genome (Gillies and Abbott, 1998), may provide a good basis for the estimation of intra – and inter- specific relationship especially in case there is lack of genetic information on a species. RAPD markers have been past and recently used for number of species in a wide variety of applications such as: assessment of genetic diversity within and between populations (Chalmers *et al.*, 1992; Bhat and Jarret, 1995; Yeh *et al.*, 1995; Changtragoon *et al.*, 1997 ; Farooqui *et al.*, 1998; Mamuris *et al.*, 1999; Lowe *et al.* 2000; Jeandroz *et al.*, 2004; Besse *et al.*, 2004; Mehrnia *et al.*, 2005), species and cultivars identification (Khasa et Dancik, 1996 ; Gillies *et al.*, 1998; Schnell *et al.*, 1999), marker linked to disease resistance and agronomic traits (Hayley *et al.*, 1993; Yu and Paul, 1993), and establishment of species relationship in plant genera (Thormann *et al.*, 1994; Graham and McNicol, 1995; Comincini *et al.*, 1996; Skepner and Krane, 1998; Ofori *et al.*, 2001; Besse *et al.*, 2004; Vanijajiva *et al.*,

2005; Khanuja *et al.*, 2005). Ofori *et al.* (2001) have used RAPD markers to dispatch the different species of *Milicia* which occur in Ghana, Côte d'Ivoire and Sierra Leone with relation to their geographical distribution in Ghana. But to date, there is no information on the extent and partitioning of genetic variation in *Milicia excelsa* in the whole Dahomean Gap.

In this study, we use Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) to provide insights into the genetic variability of *Milicia excelsa* and population structure in Benin.

## **Materials and methods**

### ***Plant material***

Leaf samples from a total of 116 *Milicia excelsa* trees were collected in twelve natural populations (Fig. 1) representing the geographical distribution of the species in Benin (Table 1). Populations were geographically distant for more than 50 km and trees sampled within a population were distant from at least 100 m. The collected leaves were oven dried and used for DNA extraction.





Table 1: Summary of Genetic Variation Statistics in twelve *Milicia excelsa* populations

Populations	Sample size	Geographical coordinates		$N_A (\pm SD)$	$N_E (\pm SD)$	$h (\pm SD)$	$I (\pm SD)$
		Longitude (°E)	Latitude (°N)				
Sakete	10	002°04'49.6"	07°18'16.1"	1.333 ± 0.488	1.146 ± 0.304	0.087 ± 1.183	0.137 ± 0.235
Ketou	06	002°35'45.2"	07°20'59.2"	1.267 ± 0.458	1.136 ± 0.293	0.081 ± 0.160	0.125 ± 0.234
Bahicon	10	002°39'38.4"	09°38'17.7"	1.267 ± 0.458	1.191 ± 0.358	0.107 ± 0.191	0.157 ± 0.275
Biro	10	0023°5'34.8"	06°37'05.2"	1.333 ± 0.488	1.221 ± 0.381	0.127 ± 0.197	0.188 ± 0.285
Djougou	10	001°26'04.8"	10°07'27.4"	1.800 ± 0.414	1.504 ± 0.375	0.291 ± 0.190	0.433 ± 0.263
Bassila	10	001°39'16.9"	09°02'36.1"	1.666 ± 0.488	1.391 ± 0.411	0.222 ± 0.213	0.332 ± 0.297
Bante	10	001°58'06.6"	08°13'49.2"	1.733 ± 0.457	1.415 ± 0.405	0.239 ± 0.205	0.364 ± 0.283
Tamarou	10	002°56'28.8"	09°56'11.2"	1.600 ± 0.507	1.377 ± 0.382	0.224 ± 0.203	0.334 ± 0.294
Niacou	10	002°08'08.1"	06°44'16.1"	1.600 ± 0.507	1.352 ± 0.397	0.203 ± 0.211	0.303 ± 0.298
Aplahoue	10	001°50'42.6"	07°05'06.4"	1.533 ± 0.516	1.297 ± 0.365	0.177 ± 0.199	0.268 ± 0.287
Lokossa	10	001°40'16.4"	06°45'26.1"	1.733 ± 0.457	1.258 ± 0.271	0.173 ± 0.158	0.283 ± 0.229
Seve	10	002°31'16.1"	08°04'27.9"	1.400 ± 0.507	1.120 ± 0.234	0.081 ± 0.135	0.136 ± 0.204
Mean	118			1.522 ± 0.186	1.284 ± 0.119	0.167 ± 0.067	0.255 ± 0.099

$N_A$  = Observed number of alleles;  $N_E$  = Effective number of alleles;  $h$  = Nei's (1973) gene diversity;  $I$  = Shannon's Information index

#### DNA extraction and RAPD Amplification

Total genomic DNA was extracted from about 0.05 g of dried leaves weighed from each sample using the protocol provided in DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, UK, Ltd). DNA concentration was determined by electrophoresis on agarose - TAE gel stained with ethidium bromide



(Harry, 2001) by comparison with a 200 bp Hyperladder (Bioline, UK Ltd).

Ten decamers primers (GEN 1-60, A-J) designed by GENOSYS (BioRad, UK Ltd) were screened and seven of them selected for clarity of the produced patterns were used for the amplification. Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out using a 96-well block thermocycler (PCR express, Hybaid, UK Ltd) in 20 $\mu$ l reaction volume containing 16 ng genomic DNA templates, 1x reaction buffer, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM dNTPs, 1 $\mu$ M primer and 1 unit Taq polymerase. The PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 36 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min and extension at 72°C for 2 min, with final extension at 72°C for 7 min. PCR products were held at 4 °C until they were analyzed. RAPD fragments were separated electrophoretically in 1.4 % TAE agarose gel stained with ethidium bromide at 0.5  $\mu$ g/ml. Gel was run at a constant voltage 100 volts for 3 hours and image were analyzed using AlphaMager digital imaging and analysis system (Flowgen Bioscience, UK Ltd). Sizes were assigned to bands by comparison with a 200 bp Hyperladder (Bioline, UK Ltd).

### **Data analysis**

Unequivocally scorable and consistently reproducible amplified DNA bands were transformed into binary character matrices as present (1) or absent (0) on the basis of size comparison with external standards (DNA Ladder Plus).

The following parameters were generated using the program POPGENE version 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) to describe intra- and inter-population genetic variation: Percentage polymorphism ( $P$ ), heterozygosity ( $h$ ), also referred to as genetic diversity, Shannon's information index ( $I$ ), the observed number of alleles ( $N_A$ ) and the effective number of alleles ( $N_E$ ) (Lewontin, 1972; Nei, 1973, Yeh *et al.*, 1997). Genetic divergence between populations were investigated using Nei's unbiased genetic distances ( $GD$ ) and genetic identities ( $GID$ , Nei, 1978). These data were used to construct a phylogenetic dendrogram based on unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA, Nei, 1978) modified from NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.5. The genetic structure was investigated using Nei's gene diversity statistics, including the total genetic diversity ( $H_T$ ), genetic diversity within populations ( $H_S$ ),



and the relative magnitude of genetic differentiation among populations ( $G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ ) (Lewontin, 1972). An estimate of gene flow among populations ( $Nm$ ) was computed using the formula [ $Nm = (1 - G_{ST}) / 2 G_{ST}$ ] (McDermott and McDonald, 1993). A geographic matrix were generated by calculating geographic distances between populations based on their latitude and longitude, using the great-circle method (available at <http://www2.nau.edu/~cvm/latlongdist.html>).

The program BARRIER version 2.2 was used to highlight geographical areas with pronounced genetic barriers between populations (Manni, 2004) based on Monmonier algorithm (Monmonier, 1973). The method allows defining zones of maximum genetic change along a network of connecting populations (the 12 populations of *Milicia excelsa*). First, a Delaunay triangulation network (Brassel and Reif, 1979) was created to connect the adjacent populations by a set of triangles. Then a Voronoï tessellation, a polygonal neighborhood for each population that is constituted of those points, on the plane, that are closer to such sample than to any other one (Voronoi, 1908), was superimposed on the corresponding Delaunay network. Finally the maximum difference algorithm of Monmonier was applied to identify zones of discontinuity. A barrier was initiated by tracing a line on the edge of Voronoï polygon that was associated with the highest distance between two neighbouring populations. The barrier was extended progressively to the adjacent edge that was associated to the highest distance until it reached the edge of the network or until it closed a circle around one or more populations. This new method uses pairwise measures of differentiation among populations with known locations to determine where breaks in gene flow might occur.

## Results

### *RAPD variation and Genetic diversity within iroko populations*

A total number of 49 scoreable bands were recorded over the 7 primers in the 116 *Milicia excelsa* tree samples investigated with a range from 3 bands (GEN 1- 60 B) to 9 bands (GEN 1-60 C) and an average of 7 bands per primer (Table 2). Most of the bands were polymorphic across populations with percentage polymorphic bands ranging from GEN 1-60 C ( $P = 66\%$ ) to GEN 1-60 B and GEN 1-60 H ( $P = 100\%$ ), and an average of 89.8 %.



Table 2: Number of bands and percent polymorphism revealed by RAPD primers

Primers identification	Primer sequence	Number of bands	Number of polymorphic bands	Percent polymorphism
GEN 1-60 B	GTCCTACTCG	3	3	100 %
GEN 1-60 C	CTACACAGGC	9	6	66 %
GEN 1-60 D	GTCCTTAGCG	8	8	100 %
GEN 1-60 E	GTCCTGAACG	8	8	100 %
GEN 1-60 G	GAGTCAATCG	7	6	86 %
GEN 1-60 H	GTCCTCAGTG	6	6	100 %
GEN 1-60 J	GCAGACTGAG	8	7	87.5 %
Average		7	6.29	89.8 %

The mean number of alleles varied from Ketou and Bohicon ( $N_A = 1.267 \pm 0.458$ ) to Djougou ( $N_A = 1.800 \pm 0.414$ ) with an average of  $N_A = 1.522 \pm 0.186$  while the mean effective number of alleles ranged from Save ( $N_E = 1.120 \pm 0.234$ ) to Djougou ( $N_E = 1.504 \pm 0.375$ ) with an average of  $N_E = 1.284 \pm 0.119$  (Table 1). Nei's gene diversity ( $h$ ) varied from  $0.081 \pm 0.135$  to  $0.291 \pm 0.190$  with an average of  $0.252 \pm 0.177$  and Shannon's information index ranged from  $0.125 \pm 0.234$  to  $0.433 \pm 0.263$  with an average of  $0.167 \pm 0.067$ .  $h$  and  $I$  showed a similar trend in all of the populations. Population Djougou showed the highest gene diversity while populations Save and Ketou have the lowest gene diversity.

Nei's estimate of gene diversity under Hardy-Weinberg disequilibrium revealed a total genetic diversity of  $H_T = 0.251 \pm 0.031$  and genetic diversity within populations equalled to  $H_S = 0.168 \pm 0.012$  (Table 3).

Table 3: Nei's (1973) genetic diversity statistics under the assumption of Hardy-Weinberg disequilibrium.

Spatial structure of genetic variation of *Milicia excelsa* populations in Benin revealed by random amplified polymorphic DNA Markers

Parameter	Entire Data			
	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$	$Nm$
Hardy-Weinberg disequilibrium	0.251 ± 0.031	0.168 ± 0.012	0.331	1.010

$H_T$  = Total heterozygosity,  $H_S$  = within population heterozygosity,  $G_{ST}$  = genetic differentiation among populations,  $Nm$  = estimate of gene flow from  $G_{ST}$ ,  $Nm = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$

**Population genetic structure**

Genetic differentiation among populations estimated for multiple populations by  $G_{ST}$  was equaled  $G_{ST} = 0.331$  (Table 3). Estimated value of gene flow obtained from the estimate of  $G_{ST}$  (Slatkin, 1989) was  $Nm = 1.01$  migrants per generation between populations (Table 3), suggesting a restricted extent of gene flow among populations. The calculated genetic distance between populations pairs varied from  $GD = 0.007$  to  $GD = 0.337$ . The highest values were recorded between populations Djougou, Bassila and Bante on one hand and populations Sakete, Ketou and Biro on another hand.

Table 4: Nei's Genetic Identity and Genetic distance among populations of *Milicia excelsa*.

Populations	Sakete	Ketou	Bohicon	Biro	Djougou	Bassila	Bante	Tamarou	Niaouli	Aplahoue	Lokossa	Save
Sakete	****	0.9495	0.9453	0.9085	0.8116	0.7950	0.8210	0.9193	0.8874	0.8910	0.8943	0.9119
Ketou	0.0518	****	0.9825	0.9598	0.7835	0.7338	0.7748	0.9058	0.8807	0.8522	0.8192	0.8182
Bohicon	0.0562	0.0177	****	0.9506	0.7572	0.7136	0.7536	0.8909	0.8579	0.8405	0.8069	0.8163
Biro	0.0960	0.0410	0.0506	****	0.8266	0.7871	0.8309	0.9572	0.9082	0.8776	0.8581	0.8636
Djougou	0.2087	0.2440	0.2781	0.1905	****	0.9709	0.9933	0.9075	0.9522	0.9233	0.9238	0.8826
Bassila	0.2295	0.3098	0.3375	0.2394	0.0296	****	0.9833	0.8939	0.9510	0.9381	0.9403	0.9113
Bante	0.1972	0.2552	0.2829	0.1852	0.0068	0.0168	****	0.9166	0.9583	0.9374	0.9485	0.9140
Tamarou	0.0842	0.0990	0.1155	0.0437	0.0971	0.1121	0.0871	****	0.9585	0.9486	0.9355	0.9465
Niaouli	0.1194	0.1270	0.1533	0.0963	0.0490	0.0502	0.0426	0.0424	****	0.9761	0.9508	0.9280
Aplahoue	0.1154	0.1599	0.1738	0.1306	0.0798	0.0639	0.0647	0.0527	0.0242	****	0.9686	0.9585
Lokossa	0.1117	0.1994	0.2146	0.1530	0.0793	0.0616	0.0529	0.0667	0.0505	0.0319	****	0.9790
Save	0.0922	0.2006	0.2030	0.1467	0.1249	0.0929	0.0900	0.0549	0.0747	0.0423	0.0212	****



Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

UPGMA dendrogram constructed from modified NEIGHBOR procedure of PHYLIP, showed division of the populations into four clusters (Fig 2). This result revealed the existence of geographical structure of genetic variation of *Milicia excelsa* in Benin. Northern east populations clustered to form group 1, southern east populations including one population from the center (Bohicon) composed group 2, northern west populations grouped in group 3 and southern west populations clustered with one population from the center to form group 4. Two more broad groups can be distinguished at a less significant similarity level which are composed each of populations from east of the country, and western populations.

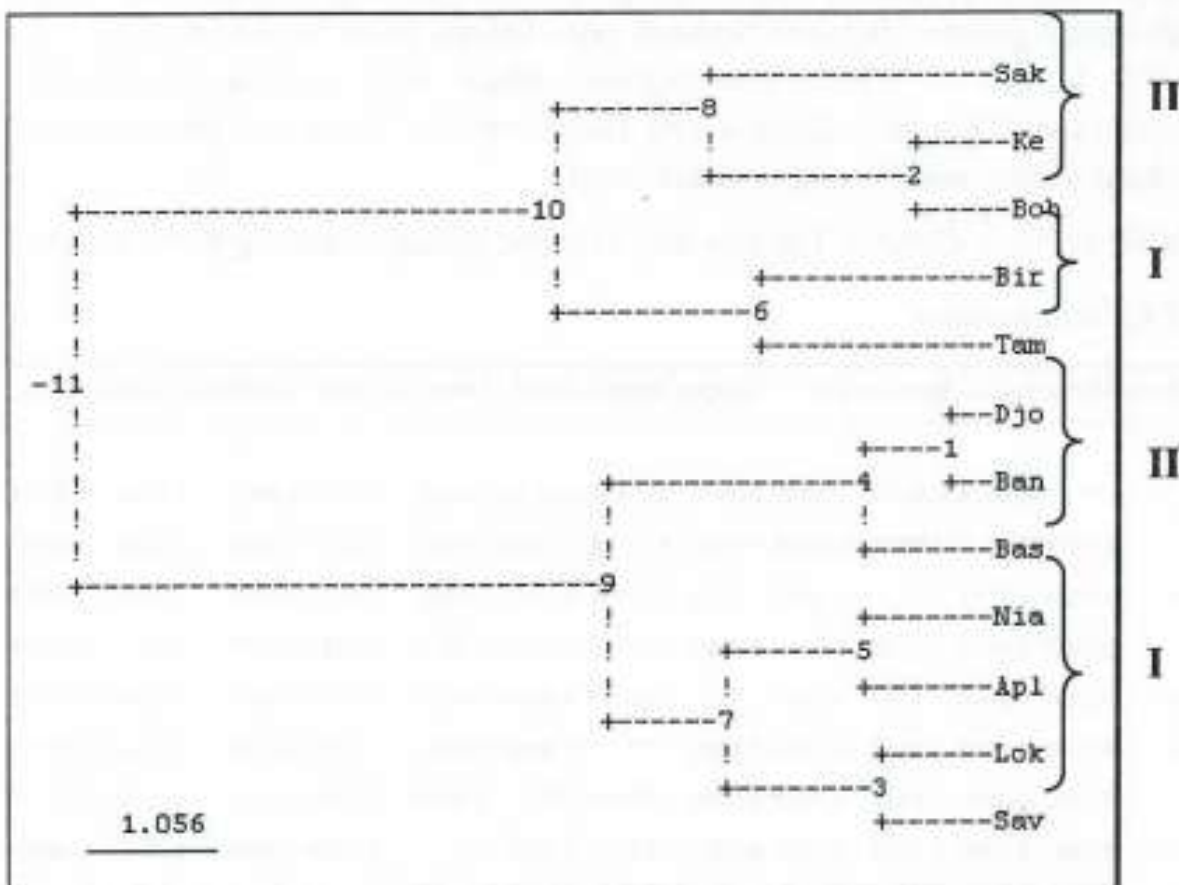


Fig. 2: UPGMA dendrogram of *Milicia excelsa* populations based on Nei's unbiased genetic distances among populations.

Sak = Sakete; Ket = Ketou; Tam = Tamarou; Bir = Biro; Djo = Djougou; Bas = Bassila; Ban = Bante; Boh = Bohicon; Nia = Niaouli; Apl = Aplahoue; Lok = Lokossa; Sav = Save

Monmonier's maximum difference algorithm identified three main genetic boundaries (Fig. 3), supporting the previous results. By definition, these boundaries correspond to zones of most abrupt genetic change in space and are identified in a descending order. The first genetic barrier (*a* on Fig. 3) separated the two northern east populations. The second boundary (*b* on Fig. 3) separated the two southern east populations from the other eight populations while the third genetic barrier (*c* on the Fig 3) separated the three northern west populations from the rest. The average genetic diversity estimated for each of the four groups delineated by the Monmonier spatial analysis were 0.11 for northern east group, 0.14 for southern east group, 0.26 for northern west group and 0.20 for southern west and central group.



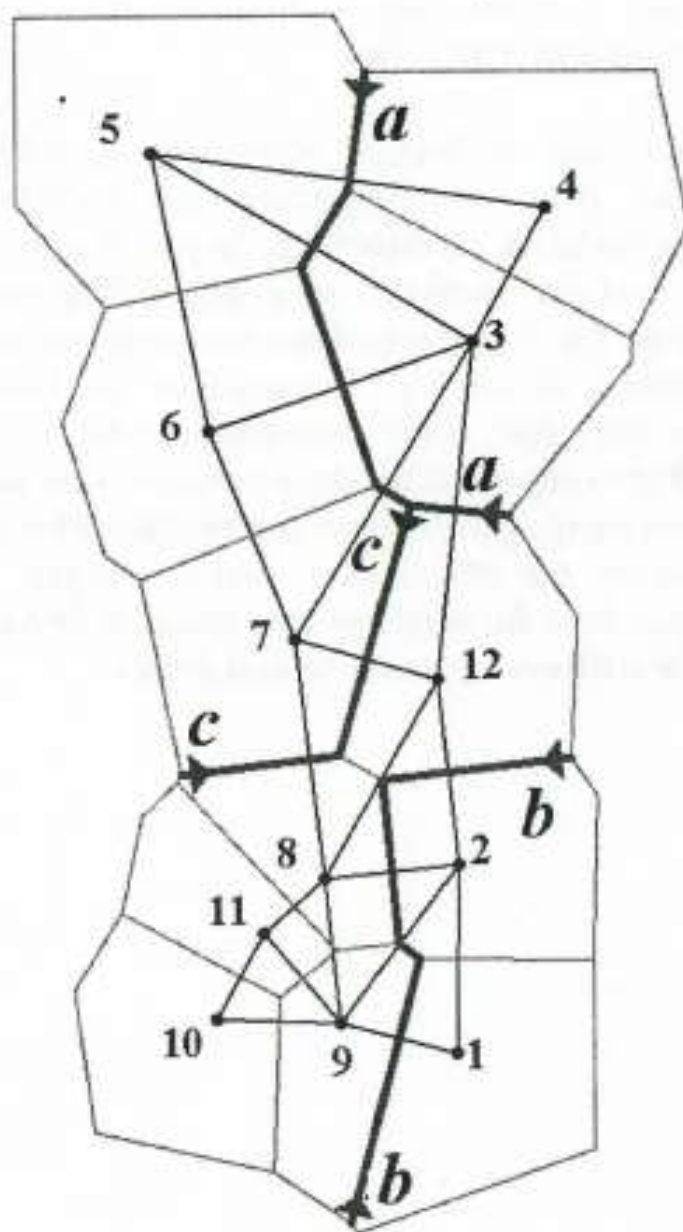


Fig. 3: Result of BARRIER analysis using pairwise  $G_{ST}$   
 1 = Sakete; 2 = Ketou; 3 = Tamarou; 4 = Biro; 5 = Djougou; 6 = Bassila; 7 = Bante; 8 = Bohicon; 9 = Niaouli; 10 = Aplahoue; 11 = Lokossa; 12 = Save; a, b, and c are the genetic barriers; 1,2,...12 are the geographical locations of populations; Cluster 1 = (3,4); Cluster 2 = (1,2); Cluster 3 = (5,6,7) and Cluster 4 = (8,9,10, 11, 12)

## Discussion

Dominant markers have been widely used for genetic variability and cultivars identification in number of species (Aga *et al.*, 2005). They are reproached with having low reliability and repeatability. In this study, repetitiveness was ensured by repeating amplification at least twice and selecting the most reproducible bands for the analysis.

Based on this RAPD investigation, genetic variability in *Milicia excelsa* ( $N_A$ ,  $N_E$ , and  $h$ ) was moderate. Estimated within population genetic diversity ( $H_S$ ) was lower than the values reported for the same species in moist forest (0.405) and dry forest populations in Ghana (Khanuja *et al.*, 2005). But this value is higher than those estimated for Ivory Coast (0.054) and Sierra Leone (0.122) populations (Khanuja *et al.*, 2005). The total genetic diversity for *Milicia excelsa* ( $H_T$ ) is greater than that reported for animal-pollinated (0.167 – 0.182) plants and widespread (0.204) tropical tree species (Loveless & Hamrick, 1984, Hamrick & Godt, 1989, Loveless, 1992, Desphande *et al.*, 2001). Regarding the biocological features and mating system of the species (widespread, majority outbreeding species), it is expected to show a higher genetic diversity than observed (Hamrick & Godt, 1992). This results raised a suspicion that there may be a reduction of heterozygosity probably due to inbreeding occurring in the species or other factors such as Wahlund effect, genetic drift and the maintained of ancestral polymorphism which could lead to the same results.

The amount of genetic differentiation observed among populations was considerable ( $G_{ST} = 0.331$ ) indicating that 33 % of the total genetic variation accounted for among population differentiation. Since the species of concern is a tropical cross pollinated species with bat and bird dispersal – seeds (Taylor *et al.*, 2000) and some gravity-dispersed seed, this value seems to be large taking into account the general observation that woody, perennial and outbreeding species maintain most of their variation within populations (Hamrick & Godt, 1992). However the large  $G_{ST}$  value was supported by the relatively low gene flow between populations ( $Nm = 1.01$ ). Theoretically, gene flow of more than four migrants per generation among populations is necessary to prevent genetic drift causing local genetic differentiation and therefore, population divergence (Slatkin, 1987). Similar result was obtained for other outbreeding animal-pollinated plant species (Desphande *et al.*, 2001).



Cluster analysis dispatched populations into four groups based on genetic distance among population pairs, separating northern east populations, northern west populations, southern east populations and, central and southern west populations thus suggesting a geographical heterogeneity in *Milicia excelsa* genetic structure. Other authors have investigated the spatial genetic structure in various tropical or temperate tree species and reported either a lack or a weak geographical heterogeneity which, they argued by the limited seed dispersal and extensive gene flow (Berg & Hamrick, 1994, Loiselle *et al.*, 1995; Chung & Chung, 1999) or by extensive gene flow, wide seed dispersal, self incompatibility and dispersal agent (Waser, 1987; Dewey & Heywood, 1988; Doliguez & Joly, 1997; Chung *et al.*, 2000). According to these authors, woody insect-pollinated species with seed widely and independently dispersed by birds, at most weak genetic structure will result. In the current study, Barrier analysis identifying three main zones with sharp genetic change and lower gene flow, clearly suggested an impact of limited seed and pollen dispersal and evidence effect of isolation by distance.

The information gained from this study is of tremendous use for planning conservation genetic actions to ensure the maintenance of appropriate levels of genetic variation in *Milicia excelsa* populations in Benin. However, further researches on the species, should address the level of inbreeding and distribution patterns of ancestral polymorphism in the species.

### **Acknowledgments**

The authors thank the staff of the Biotechnology laboratory of Forestry Research Institute of Ghana (FORIG) especially Dr. D.A Ofori and Dr. J.R. Cobbinah for hosting the practical work of this study and simulation useful discussion on the topic.

## References

- Aga E., Bekele E., Bryngelsson T., 2005. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia, *Genetica* (124) 213-221.
- Archak S., Gaikwad A.B., Gautam D., Rao E.V.V.B, Swamy K.R.M, Karihaloo J.L., 2003. DNA fingerprinting of Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) varieties using RAPD and ISSR techniques. *Euphytica*, (230) 397-404.
- Berg R.R, Hamrick J.L., 1994. Spatial and genetic structure of two sand hills oaks: *Quercus laevis* and *Quercus margaretta* (Fagaceae), *American Journal of Botany*, (81) 7-14.
- Besse P., Da Silva D., Bory S., Grisoni M., Le Bellec F., Duval M-F., 2004. RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationship with *V. tahitensis* and *V. pompona*, *Plant Science* (167) 379 – 385.
- Bhat K.V., Jarret R.L., 1995. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in India *Musa* germplasm, *Genet. Res. Crop. Evol.* (42) 107 - 118
- Brassel K.E., Reif D., 1979. A procedure to generate Thiessen polygons, *Geogr. Anal.*, (325) 31-36.
- Chalmers K.J., Waugh R., Sprent J.I, Simons A.J., Powell W., 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers, *Heredity* (69) 465 – 472.
- Changtragoon S., Szmidt A.E, Wang X-R., 1995. The use of molecular markers in the study of genetic diversity in ratta: preliminary results. In Ayad, W. G., T. Hodgkin, A. Jaradat and V. R. Rao, editors. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI workshop, 9 – 11 October, Rome, Italy.* International plant genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 39 – 43.
- Chung M.G, Chung J.M., Epperson B.K., 1999. Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms within populations of *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae), *Silvae Genetica*, (48) 223-227.
- Chung M.G., Chung J.M., Chung M.Y., Epperson B.K., 2000. Spatial genetic distribution of allozyme polymorphisms following clonal and sexual reproduction in populations of *Rhus javanica* (Anacardiaceae), *Heredity*, (84) 178-185.



- Comincini S., Sironi M., Bandi C., Giunta C., Rubini M., Fontana F., 1996. RAPD analysis of systematic relationship among the *Cervidae*, *Heredity* (76) 215 – 221.
- Deshpande A.U, Apte G.S., Bahulikar R.A, Lagu M.D., Kulkarni B.G., Suresh H.S., Singh N.P., Rao M.K.V., Gupta V.S., Pant A., Ranjekar P.K., 2001. Genetic diversity across natural populations of three montane plant species from the Western Ghats, India revealed by intersimple sequence repeats, *Molecular Ecology*, (10) 2397-2408.
- Dewey S.E, Heywood J.S., 1988. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa* I. Distribution of genotypes, *Evolution*, (42) 834-838.
- Doligez A., Joly H., 1997. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana, *Heredity*, (79) 72-82.
- FAO, 1986. Some medicinal forest plants of Africa and Latin America. FAO Paper 67. pp. 252.
- Farooqui N., Ranade S.A, Sane P.V., 1998. RAPD profile variation amongst provenances of neem. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 45 (5) 931 – 939.
- Gillies C.M.A., Abbott J.R., 1998. Evaluation of random amplified polymorphic DNA for species identification and phylogenetic analysis in *Stylosanthes* (Fabaceae), *Pl. Syst. Evol.* (211) 201 – 216.
- Graham J., McNicol R.J., 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationship within and between *Rubus* species, *Theor. Appl. Genet.* (90) 1128 – 1132.
- Hamrick J.L, Godt M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population Genetic, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS), Chapman and Hall, New York, pp. 281-304.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W., Sherman-Broyles S.L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species, *New For.* (6) 95 – 124.
- Harry M., 2001. Génétique moléculaire et évolutive. Collection Sciences fondamentales, Maloine, 326 p.
- Hawthorne W.D., 1995. Ecological profiles of Ghanaian forest trees. Oxford Forestry Institute, Oxford, pp. 345.



- Hayley S.D., Miklas P.N., Stavely J.R., Byrum J., Kelly J.D., 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean, *Theor. Appl. Genet.* (86) 505 – 512.
- IUCN, 2004. IUCN Red List of Threatened Species. [www.redlist.org](http://www.redlist.org) downloaded on 20 April 2006.
- Jain N., Shasany A.K., Sundaresan V., Rajkumar S., Darokar M.P., Bagchi G.D., Gupta A.K., Kumar S., Khanuja S.P.S., 2003. Molecular diversity in *Phyllanthus amarus* assessed through RAPD analysis, *Curr. Sci.* (85) 1454 – 1458.
- Jeandroz S., Collignon A.M., Favre J.M., 2004. RAPD and mtDNA variation autochthonous and planted populations of *Picea abies* from the Voges mountains (France) in reference to other French populations, *Forest Ecology and Management* (197) 225 – 229
- Khanuja P.S.S., Shasany K.A., Pawar A., Lal R.K., Darokar M.P., Naqvi A.A., Rajkumar S., Sndaresan V., Lal N., Kumar S., 2005. Essential oil constituent and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon Spreng.* (Poaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* (33) 171 – 186.
- Khasa P.D., Dancick B.P., 1996. Rapid identification of white-Engelmann spruce by RAPD, *Theor. Appl. Genet* (92) 46 – 52.
- Lewontin R.C., 1972. The apportionment of human diversity, *Evol. Biol.* (6) 381-398.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J., Graham C., 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae), *American Journal of Botany*, (82) 1420-1425.
- Loveless M.D., 1992. Isozyme variation in tropical trees: Patterns of genetic organization, *New Forests* (6) 67-94.
- Loveless M.D., Hamrick J.L., 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations, *Annual review of Ecology and Systematics*, (15) 65-95.
- Lowe A.J., Gillies A.C.M., Wilson J., Dawson I.K., 2000. Conservation genetic of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis, *Molecular Ecology* (9) 831 – 841.
- Mamuris Z., Stamatis C., Triantaphyllidis C., 1999. Intraspecific genetic variation of striped red mullet (*Mullus surmuletus* L.) in the Mediterranean Sea assessed by allozyme and random amplified polymorphic DNA, *Heredity* (83) 30 – 38.



- Manni F. and Guérard E., 2004. BARRIER vs. 2.2. Manual of the user. Population genetics team, Museum of Mankind (Musée de l'Homme), Paris 2004, [Publication distributed by the authors].
- Manni F., Guérard E., Heyer E., 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by "Monmonier's algorithm", *Human Biology*, 76(2) 173-190.
- McDermott J.M., McDonald B.A., 1993. Gene flow in plant pathosystems, *Annu. Rev. Phytopathol.* (31) 353-373.
- Mehrnia M., Zarre S., Sokhan-Sanj A., 2005. Intra- and inter-specific relationship within the *Astragalus microcephalus* complex (Fabaceae) using RAPD, *Biochemistry Systematics and Ecology* (33) 149 – 158
- Monmonier M., 1973. Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method, *Geogr. Anal.*, (3) 245-61.
- Nei M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (70) 3321-3323.
- Nei M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics* (89) 583-590.
- Ofori D.A., Swaine M.D., Leifert C., Cobbinah J.R., Price A.H., 2001. Population genetic structure of *Milicia* species characterized by using RAPD and nucleotide sequencing, *Genetic Resources and Crop Evolution* (48) 637-647
- Schnell R.J., Goenaga R., Olano C.T., 1999. Genetic similarities among cocoyam cultivars based on randomly amplified polymorphic DAN (RAPD) analysis, *Scientia Horticulturae* 80 (3-4) 267 – 276.
- Skepner A., Krane D.E., 1998. RAPD reveals genetic similarity of *Acer saccharum* and *Acer nigrum*, *Heredity* (80) 422 – 428.
- Slatkin M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations, *Science*, (236) 787-792.
- Slatkin M., Barton N.H., 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow, *Evolution* (43) 1349-1368.
- Taylor D.A.R., Kankam B.O., Wagner M.R., 2000. The role of the fruit bat, *Eidolon helvum*, in seed dispersal, survival, and germination in *Milicia excelsa*, a threatened west African hardwood. *International Workshop Proceedings*, 15-16 November, pp.29-39
- Thormann C.E., Ferreira M.E, Camargo M.E.A., Tivang J.G., Osborn T.C, 1994. Comparaison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationship within and among cruciferous species, *Theor. Appl. Genet.* (88) 973 – 980.

- Vanijajiva O., Sirirugsa P., Suvachittanont W., 2005. Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD, *Biochemical Systematics and Ecology* (33) 159 - 170.
- Voronoi M.G., 1908 Nouvelles applications des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques, deuxième mémoire, recherche sur les paralléloèdres primitifs, *Journal Reine Angew. Math.*, (134) 198-207.
- Waser N.M., 1987. Spatial genetic heterogeneity in a population of the mountain perennial plant *Delphinium nelsonii*, *Heredity*, (58) 249-256.
- WCMC, 1991. Provision of Data on Rare and Threatened Tropical Timber Species. pp. 58.
- Yeh F.C., Chong D.K.X., Yang R.C, 1995. RAPD variation within and among natural populations of Trembling Aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *Heredity* (86) 454 – 460.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T., 1997. POPGENE, version 1.32 ed. Software Microsofte Window-Based freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta, Edmonton, Alta, 1997
- Yu K., Pauls K.P., 1992. Optimisation of the PCR program for RAPD analysis, *Nucl. Acids Res.* (20) 2606.



## **Caractérisation écologique des populations rémanentes de samba (*Triplochiton scleroxylon* K. Schum) et essais d'amélioration génétique des arbres par greffage et cerclage au Bénin**

F. Agognon, C. Ouinsavi\*, N. Sokpon,

Laboratoire d'Etudes et de Recherches Forestières  
Faculté d'Agronomie, Université de Parakou  
BP : 123 Parakou

Auteur de la correspondance: E-mail: [christine.ouinsavi@sbf.ulaval.ca](mailto:christine.ouinsavi@sbf.ulaval.ca);  
[ouinsch@yahoo.fr](mailto:ouinsch@yahoo.fr) Phone : (229) 90023053, Fax: (229) 2361 0712

### **Résumé**

Les caractéristiques structurales des populations rémanentes de samba (*Triplochiton scleroxylon*) ont été étudiées à travers l'inventaire des individus de l'espèce dans trois zones agroécologiques de son aire de répartition au Bénin. La densité des populations varie d'une zone à l'autre : (1 au centre du pays, 8 au sud-ouest, et 50 au sud-est). La surface terrière évolue dans les mêmes proportions et est estimée à 0,41m<sup>2</sup>/ha au centre, 4,78 m<sup>2</sup>/ha au sud-est, et 12,23 m<sup>2</sup>/ha au sud-est. Le diamètre moyen varie de 47,5 cm à 64,8 cm. La régénération demeure faible et varie de 1 à 17 tiges/ha. L'étude de la productivité de ces populations a permis de distinguer au Bénin, cinq classes de productivité. Les populations Sud-Est, sont plus productives que celles du Sud-Ouest qui sont plus productives que celles du Centre.

L'analyse de la vitesse de fermeture de l'écorce prélevée révèle que la cicatrisation est plus rapide chez les sujets plus jeunes de diamètre compris entre 20 et 70 cm que chez les sujets plus âgés dont le diamètre supérieur à 70 cm.

Le greffage effectué sur 300 jeunes plants de samba a donné un taux de réussite de 10,66%. Il existe une différence significative au seuil de 5% entre le comportement des greffons (en termes de taux de reprise et de vigueur des plants obtenus) en fonction de leur provenance.

Mots clés : *Triplochiton scleroxylon*, productivité, régénération, greffage, cerclage, Bénin.

### **Introduction**

Le Bénin, étant situé dans le couloir sec Dahoméen, dispose de ressources forestières très limitées. La FAO (1999) estime la couverture forestière du pays en 1995 à 4625000 ha. De fortes menaces, consécutives à l'explosion démographique qui pèsent sur les ressources



génétiques forestières peuvent se résumer en la destruction de l'habitat des espèces à la suite des activités consommatrices de l'espace forestier telles que l'agriculture, l'élevage et l'exploitation forestière anarchique (Agbahungba et al., 1998). *Triplochiton scleroxylon* vulgairement appelé samba en français et wawa au Ghana, est une importante espèce tropicale de bois d'œuvre et figure en Afrique de l'Ouest parmi les espèces prioritaires sélectionnées pour l'afforestation (Ofori et al., 2003). Il représente d'ailleurs actuellement 23% du volume total de bois exporté. Mais il se pose chez le samba, quelques problèmes physiologiques qui entravent la reproduction de l'espèce. En effet, la floraison reste capricieuse et n'a lieu que tous les 4 ou cinq ans. De plus, une grande partie des semences produites demeure de qualité médiocre, entraînant un faible taux de germination (Taylor, 1960 ; Jones, 1976 ; Oni, 1990). Pour contourner cette difficulté liée à l'insuffisance en stock de plants, des mesures telles que la multiplication végétative de plusieurs clones génétiques à travers la technique de culture de tissus et l'induction artificielle de la floraison pour une production abondante de lignées hétérogènes ont été prises. Dans certaines régions à climat modéré, on a pu obtenir la fructification de jeunes pousses âgées de 26 à 82 mois (Leakey et al., 1998). Ceci implique qu'il est possible d'induire artificiellement la floraison chez *Triplochiton scleroxylon* et produire annuellement des semences de bonne qualité.

Des manipulations physiologiques conduiraient donc à écourter la phase juvénile et à induire la floraison chez cette espèce. Partant de là, une application expérimentale de ces méthodes permettrait une identification de la meilleure méthode d'induction florale sur *Triplochiton scleroxylon*. L'objectif de cette étude est d'augmenter les possibilités de régénération des populations rémanentes de *Triplochiton scleroxylon* et de produire à terme du matériel végétal génétiquement supérieur au Bénin.

### **Milieu d'étude**

Le Bénin est un petit pays de l'Afrique occidentale, couvrant une superficie de 112622 km<sup>2</sup>, s'étendant entre les parallèles 6°30' et 12°30' Nord et les méridiens 1° et 3°40'. Elle est limitée au Nord par la République du Niger, au Nord Ouest par le Burkina Faso, à l'Est par la République Fédérale du Nigéria, à l'Ouest par la république Togolaise et au Sud par l'Océan Atlantique.

La présente étude s'est déroulée globalement de la côte jusqu'à la hauteur de Savè, c'est-à-dire entre les parallèles 6°30' et 8°30' de latitude



nord et les méridiens 1°35' et 2°45' de longitude est (Figure 1). Cette étendue correspond à l'aire de répartition du samba au Bénin et conformément aux exigences écologiques de l'espèce, il s'agit de zones d'altitude comprise entre 0 et 900m. Elle englobe deux des quatre zones de végétation identifiées au Bénin par Adjanooun et *al.* (1989) à savoir :

- la zone guinéenne ou subéquatoriale dans le sud, située entre 6°30' et 7°N et où la pluviométrie varie de 900 à 1500mm par an. On distingue quatre saisons dont deux humides avec trois à cinq mois secs. La température moyenne annuelle y est de 26,5°C et l'humidité relative moyenne annuelle est de 75%. L'insolation est en moyenne de 2290 heures par an.

- La zone guinéo-soudanienne, située au centre entre 7° et 10° de latitude nord, avec des fluctuations de températures très marquées et une pluviométrie moyenne annuelle de 1200mm. C'est une zone de transition au sein de laquelle la seconde saison humide tend à disparaître et où l'on compte quatre à cinq mois secs. La température moyenne annuelle y est de 27°C et l'humidité relative est annuellement voisine de 60%. L'insolation moyenne annuelle est de 2305 heures.

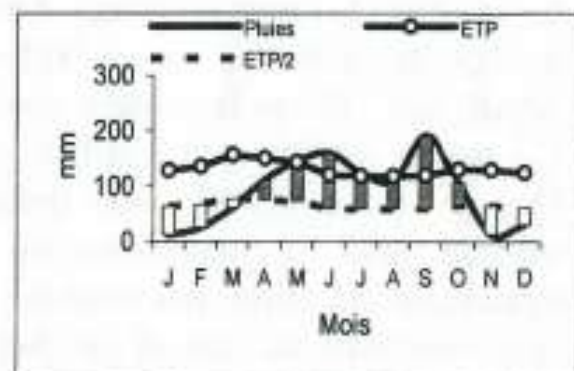
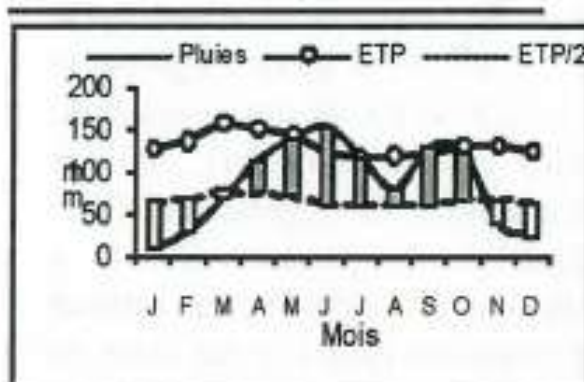
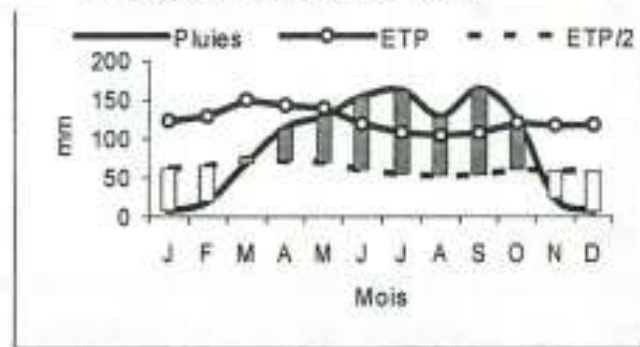


Figure 1 : Carte de localisation de la zone d'étude



## Méthodes

### *Méthodes d'inventaire*

A priori, les îlots de samba ont été considérés comme des populations différentes. Ainsi, en fonction de leurs nombres et sur la base du gradients pluviométriques Est-Ouest et Nord-Sud existant au sein de l'aire de répartition du Samba au Bénin, sept populations ont été choisies de façon à couvrir les différentes variantes climatiques. Il s'agit des populations de Aklampa au centre, les populations de Avegamey et Atiéomé au Sud-Ouest et celles de Pobè, Ichèdé-Toffo, Adakpamè et de Bonou au Sud-Est. Dix (10) placeaux circulaires de 1000m<sup>2</sup> ont été installés dans chacune d'elles et des mesures de diamètre à hauteur de poitrine (1,30m) et de hauteur totale ont été effectuées sur les sujets de samba rencontrés. La régénération, c'est-à-dire tous les individus de DBH inférieur à 10 cm, a été évaluée au sein des placettes. L'installation des placeaux a été faite de façon à ce qu'il y ait au moins 250m d'écart entre deux placettes. Tous les placeaux inventoriés ont été répertoriés au GPS et positionnés sur une carte.

Ces mesures ont permis de calculer la densité (le nombre d'individus à l'hectare), la surface terrière et la hauteur dominante.

### *Productivité des populations de samba*

Les caractéristiques structurales de la population de samba d'âge connu ont permis d'estimer l'âge des autres populations. Les couples de données (âge, hauteur dominante) issus des mesures effectuées sur des placettes d'inventaires ont permis de construire des courbes de croissance pour les différentes populations de samba au Bénin.

Le modèle de croissance utilisé est celui de Schumacher. Il stipule qu'à un âge de référence, on a :  $H_{dom} = e^{b_0} + e^{b_1}/A^k$ ,  $A$  étant l'âge de la population ;  $H_{dom}$  la hauteur dominante ;  $b_0$ ,  $b_1$  et  $k$  sont des constantes. Ce même modèle a été utilisé par Bailley et Clutter (1974), cité par Dupuy et al. (1999) pour indiquer la méthode de régression sériée utilisée pour la matérialisation des courbes de productivité. Il a également été utilisé par Fonton (1985) et Akossou (1998) pour estimer la productivité du teck et par Sokpon et Ouinsavi (2004) pour celle du *Khaya senegalensis*.

### *Production de greffes*

Le choix des individus destinés à fournir des greffons est basé sur leur âge, leur morphologie et leur état de santé. Ainsi, 10 sujets matures sains ont été choisis, 6 à Athiémé et 4 à Calavi. Sur chacun d'eux, 30 greffons ont été prélevés soit au total 300 greffons (tableau 1). La technique utilisée pour cette étude est celle du greffage en fente.

**Tableau 1: Origine et répartition des greffons**

Sites	Calavi				Athiémé					
Code du sujet	UAC <sub>1</sub>	UAC <sub>2</sub>	UAC <sub>3</sub>	UAC <sub>4</sub>	AT <sub>1</sub>	AT <sub>2</sub>	AT <sub>3</sub>	AT <sub>4</sub>	AT <sub>5</sub>	AT <sub>6</sub>
Nbre de greffons	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Total	120				180					

### *Cerclage de l'écorce*

Le cerclage est matérialisé par le prélèvement d'une bande de 10mm d'écorce sur le tronc des individus de samba. Seize (16) arbres ont été cerclés à hauteur de poitrine et 16 autres à la première grosse branche. A chacun de ces deux traitements ainsi définis est associé deux groupes témoins, soit au total 64 sujets (tableau 2).

L'estimation de la vitesse de cicatrisation a été faite par comparaison de la largeur de bois restée nue à la largeur d'écorce prélevée lors du cerclage.

**Tableau 2 : Dispositif expérimental**

Populations	Troncs		Branches		Total
	T <sub>1</sub>	T <sub>01</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>02</sub>	
P <sub>1</sub>	3	3			6
P <sub>2</sub>	8	8	4	4	24
P <sub>3</sub>	5	5	12	12	34
Total	16	16	16	16	64

T<sub>01</sub>, T<sub>02</sub>: témoins

T<sub>2</sub>: cerclage à la base du tronc

T<sub>1</sub>: cerclage à la plus basse grosse branche

P: Populations



## Résultats et discussion

### *Caractéristiques structurales*

Le tableau 3 présente les caractéristiques structurales et la régénération des populations de samba. La densité des populations passe de 1 au centre du pays à 8 au sud-ouest, puis à 50 dans le sud-ouest. La surface terrière évolue dans les mêmes proportions et est estimée à 0,41 m<sup>2</sup>/ha au centre, 4,78 m<sup>2</sup>/ha au sud-ouest, et 12,23 m<sup>2</sup>/ha au sud-est. Le diamètre moyen varie de 47,5 cm à 64,8 cm.

La structure diamétrique des populations de samba se traduit en général par une distribution erratique, caractéristique des essences typiques de lumière. Mac Grégor, (1971) et Serrain (1975) en déduisent la nature grégaire de l'espèce que l'on rencontre par groupe de 10 à 20 à la lisière des forêts et qui émerge parmi les arbres le long des routes comme il est observé dans la commune d'Athiémé. La figure 2 traduit l'évolution des courbes de répartition par classes de diamètre de l'espèce.

**Tableau 3: Caractéristiques structurales et régénération des populations de samba**

Zones	Forêts	Densités (pieds/ha)	Surface terrière (m <sup>2</sup> /ha)	Régénération			
				R. totale (tiges/ha)	1<D<5 (tiges/ha)	5<D<10 (tiges/ha)	H<50cm (tiges/m <sup>2</sup> )
Centre	Aklampa	1	0,41				
Sud-ouest	Avégamey	8	2,72	6,75	1,25	5,5	1,03
	Pobé	48	11,19	1			
Sud-est	Itchêdê- Toffo	50	13,83	17	13	4	0,69
	Adakplamé	44	12,97	15	6	9	0,4
	Bonou	52	12,29	11	7	4	4,18

La régénération reste faible dans toutes les populations. Elle varie de 1 à 17 tiges/ha. Comme pour la plupart des paramètres précédents on remarque une situation plus alarmante au Centre. Cet état de chose pourrait se justifier dans un premier temps par la nature de l'espèce qui a une régénération capricieuse. En effet, Holand et Bowen (1977)

pouvoir germinatif après 20 jours. L'existence d'un gradient de pluviométrie Sud-Nord détermine la répartition des formations forestières (Sokpon, 1995) et ainsi, dans les régions tropicales où le régime thermique est relativement constant, l'eau apparaît comme un élément déterminant pour le développement de l'arbre (Bellefontaine et al, 1997). Cette variation de la densité et de la structure en général de l'espèce, pourrait également s'expliquer par les pressions anthropiques sur les ressources forestières et par l'importance socio - culturelle de cette espèce au Bénin.

En effet, l'arbre de samba est fortement protégé dans le Sud-est du pays malgré les mutilations annuelles qu'il subit du fait de la place importante qu'il occupe dans les pratiques culturelles du « Voudou Oro ».

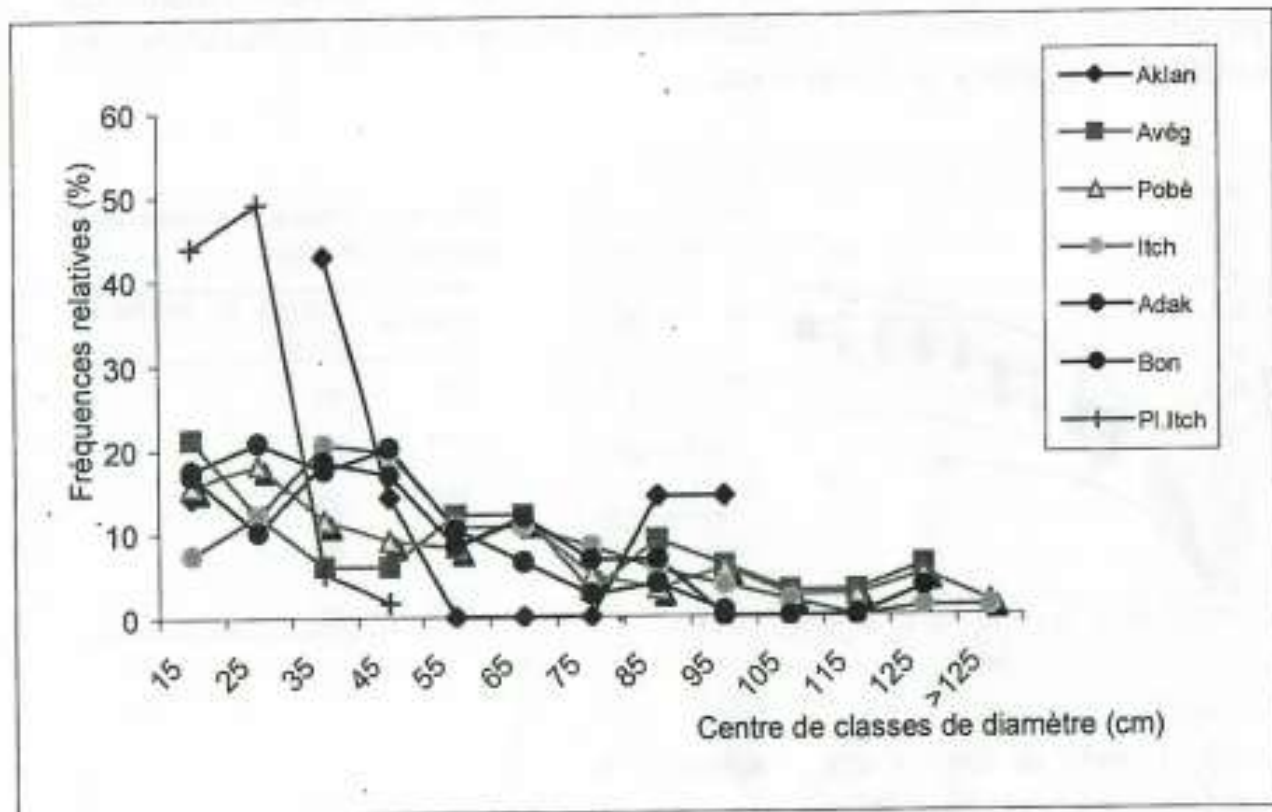


Figure 2 : Évolution des courbes de répartition par classes de diamètre des effectifs de samba au sein des différentes populations

#### *Productivité des populations de samba*

La figure 3 montre le faisceau des courbes de productivité des différentes populations. Elle traduit l'évolution de la hauteur dominante en fonction



de l'âge qui suit une fonction d'équation :  $\text{Ln } H = 3,62 - 6,36 / A^{0,7}$  avec  $R^2 = 69\%$  et l'erreur standard  $s = 0,103$ .

Les courbes présentent dans un premier temps, une forte pente ; ceci traduit une certaine vigueur des sujets dans le jeune âge, caractéristique des essences héliophiles qui à la faveur d'une trouée émergent rapidement et atteignent la canopée supérieure. Cette pente diminue progressivement par la suite, tendant à s'annuler autour de 70 ans. L'analyse du faisceau de courbes jumelé au nuage de point provenant des couples de données âges-hauteurs dominantes des différentes populations montre que l'écart de fertilité des populations de samba au Bénin n'est pas très grande. L'ensemble du nuage de points tourne autour des classes  $Ip_3$  et  $Ip_4$ . Cependant, on remarque que les populations les plus productives sont celles de Bonou et d'Adakplamè. Viennent ensuite les populations de Pobè et d'Itchède-Toffo puis les moins productives sont celles d'Avégamey et d'Aklampa.

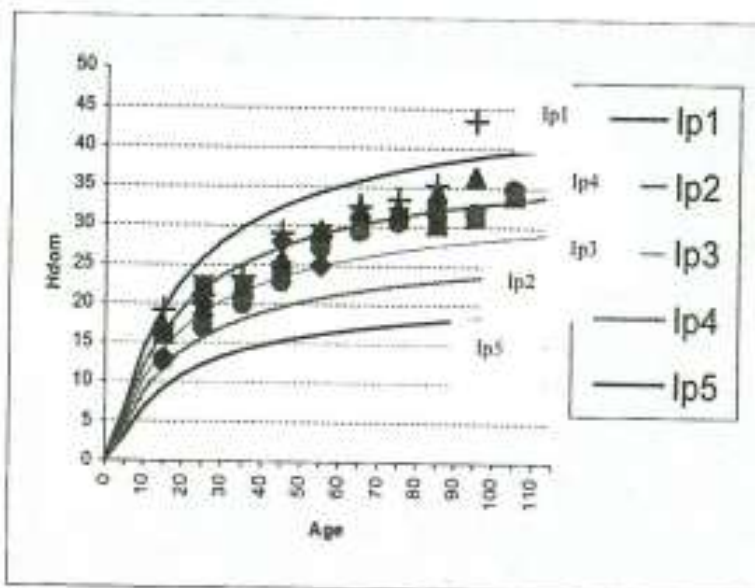


Tableau 4 : Classes de productivité des populations de samba

Classes	Indices de fertilité à 70 ans
1 <sup>ère</sup>	38
2 <sup>ème</sup>	35
3 <sup>ème</sup>	32
4 <sup>ème</sup>	29
5 <sup>ème</sup>	26

Figure 3 : Courbe de fertilité des populations de *Triplochiton scleroxylon* au Bénin

Contrairement à Fonton (1985), Akossou (1998) et Ganglo (1999) qui ont utilisé des données d'analyses de tiges pour la détermination des niveaux de productivité dans les plantations de teck, nous avons utilisé des données issues de premières mesures sur des placettes installées à titre permanent. Rondeux (1993) notifie que des résultats satisfaisants



peuvent être obtenus à partir des données provenant de placeaux temporaires, méthode qu'ont utilisée Sokpon et Ouinsavi (2004) avec succès pour la détermination de la fertilité des plantations de *Khaya senegalensis* dans le sud et le nord Bénin. La productivité des populations de samba est dans un premier temps conditionnée par le niveau de fertilité des stations qui les abritent. Le gradient de productivité est essentiellement dépendant du régime des pluies. Selon Dupuy (1990), les meilleures productions ont été enregistrées pour le teck en zone de forêt dense où la pluviométrie est la plus élevée. Le même schéma s'observe en ce sens que les populations de samba de Bonou, Kétou et Pobè qui ont des conditions stationnelles plus favorables en terme de hauteurs annuelles des précipitations sont plus productives que celles provenant des régions moins arrosées telles que Avégamey et Aklampa. Cette situation ne fait que confirmer l'hypothèse émise par Dupuy et Milles (1991) selon laquelle les observations faites sur le teck en Côte d'Ivoire seraient valables pour d'autres espèces telles que le fraké (*Terminalia superba*), le *Cedrela odorata*, l'*Acacia mangium*, le framiré (*Terminalia ivoirensis*), le samba (*Triplochiton scleroxylon*) et le *Gmelina arborea*. Cependant, les pressions anthropiques subies par les populations du Centre pourraient avoir sur ces dernières, un effet déstructurant, les empêchant ainsi d'exprimer au mieux les potentialités offertes par les conditions stationnelles.

### **Le greffage**

Globalement le taux de réussite du greffage a été faible quand on considère l'ensemble des greffons, toute origine confondue. En effet, seulement trente deux greffons sur les 300 greffés ont repris, soit un taux de réussite de 10,7%. Cependant, quand on s'intéresse à la provenance, on constate que ceux de Calavi ont mieux repris (25%) par rapport à ceux provenant d'Athiémé (1,1% ;  $P < 5\%$ ). L'origine des greffons semble donc avoir un effet sur la réussite de l'opération de greffage chez *T. scleroxylon*.

Les valeurs prises par la hauteur totale et le nombre total de feuilles sont plus élevées chez les témoins que chez les individus greffés. Il existe une différence significative au seuil de 5% entre la croissance des greffes et celle des témoins. En effet, la croissance moyenne en hauteur a été de 11,09cm chez les témoins contre 4,4cm chez les plants greffés et le nombre de feuilles a varié de 0 à 3 chez les plants greffés contre 3 à 8 chez les témoins.



En nous intéressant aux différentes souches, nous notons l'existence d'une différence significative au seuil de probabilité de 5% au niveau du nombre de feuilles.

Au niveau des témoins c'est à dire des plants non greffés, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes souches aussi bien en terme de nombre de feuilles émises que de la longueur des tiges au seuil de probabilité de 5%. Les figures 4 et 5 montrent la croissance des plants greffés comparée à celle des témoins.

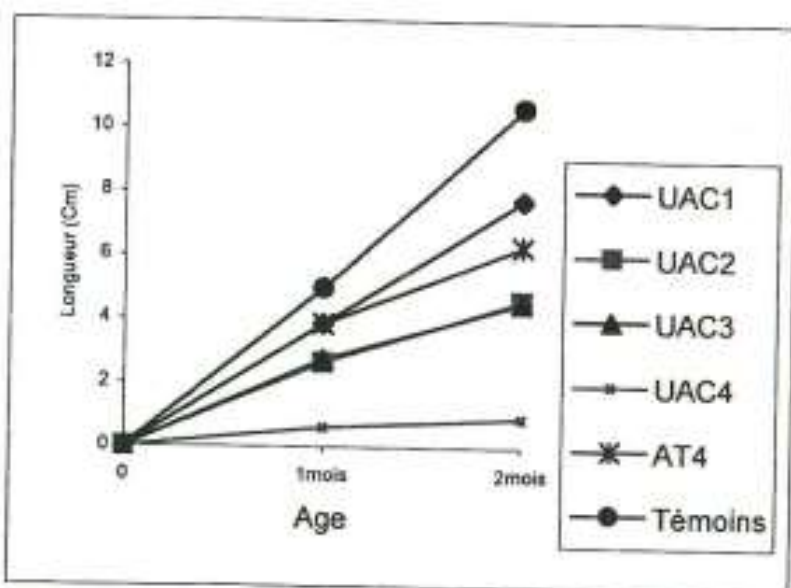


Figure 4: Croissance en nombre de feuilles des plants greffés et des témoins

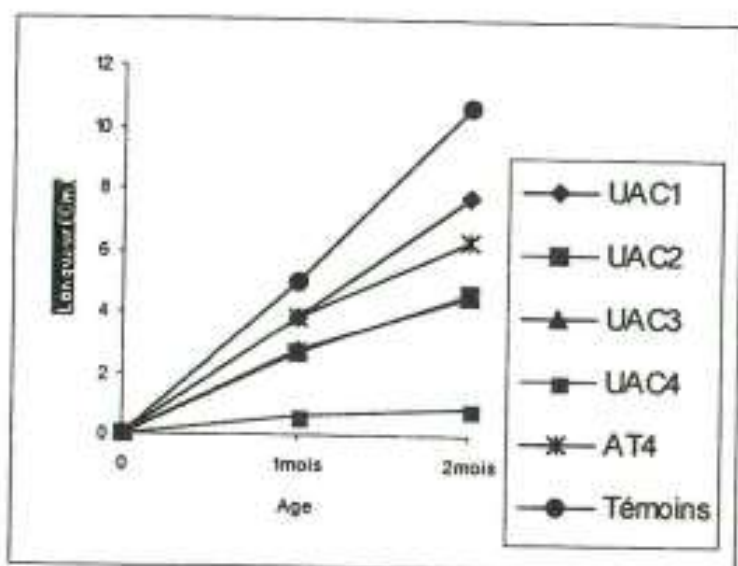


Figure 5 : Croissance en longueur des plants greffés et des témoins

L'amélioration visée par le greffage sur *Triplochiton scleroxylon* K. Schum est non seulement une floraison rapide des individus mais aussi, une, abondante et continue d'une année à l'autre en donnant des fruits et des semences de bonne qualité. Bien que le pourcentage de réussite n'a été que de 10,7%, il a permis de déceler une certaine variabilité existant entre et au sein des individus mis en cause en matière d'aptitude au greffage. En effet, la technique de greffage étant la même pour tous les plants ainsi que les conditions d'opération et d'entretien, la reprise devait avoir lieu dans les mêmes proportions si des facteurs internes à chacune des souches utilisées n'entraient pas en ligne de compte. Si plusieurs considérations liées aux conditions stationnelles (climat, sols) peuvent facilement être évoquées pour expliquer la différence de comportement entre les greffons provenant de deux zones différentes, celles constatées sur des matériaux provenant de deux sujets voisins ne peuvent être que l'expression du potentiel génétique de chacun d'eux dont la variabilité ne fait que se révéler. Il existe en effet une différence significative au seuil de 5% entre le nombre de greffons ayant repris pour chacun des types de clones provenant de Calavi. Ce nombre varie de 2 à 18 reprises. Dans cette étude nous avons considéré comme ayant repris les greffons restés verts durant toute la période de l'essai. Serrain (1975) avait lui aussi remarqué que le taux de réussite chez *Triplochiton scleroxylon* pour la greffe en fente variait beaucoup selon les individus et pouvait osciller entre 0 et 80%.

Cette variabilité au sein des individus seule ne saurait expliquer nos résultats. En réalité, ils sont en général très faibles par rapport à ceux obtenus par Garner, (1967) qui, en utilisant la technique du greffage en fente a obtenu des résultats de l'ordre de 30% et pour l'écussonnage, il a obtenu 43%, contrairement à Ikeklumamen (1966) et Britwum (1970) qui, après avoir décrit les méthodes efficaces de greffage pour le samba, ont affirmé que les meilleurs résultats furent ceux du greffage en fente. Il attribue l'échec de plusieurs greffes en fente à une contamination de la plante par un champignon (*Fusarium sp.*).

En comparant la vitesse de croissance des plants greffés à celle des témoins, on constate que les témoins ont crû beaucoup plus rapidement avec une différence significative au seuil de 5%. Il ne s'agit là que d'une différence qui serait liée à la force des liens établies entre les deux parties.



Il n'existe pas de différence significative de croissance entre les deux provenances utilisées pour le greffage. La longueur moyenne des greffons après huit semaines est de 4,4 cm et un nombre moyen de 1,8 feuilles aussi bien pour ceux issus d'Athiéomé que ceux venant de Calavi. Par contre entre les souches, il existe une différence significative au seuil de probabilité de 5% ; le nombre de feuilles par individu pour chaque souche varie de 0,38 à 2,4 alors que la longueur oscille entre 1,03 et 7,74 cm. Ces différences reflètent une variabilité au sein des différentes populations. Ceci est d'autant plus important dans la mesure où elle détermine l'efficacité des sélections génétiques. Ce test de greffage révèle donc une grande variabilité au sein des individus d'Athiéomé et ceux de Calavi, ce qui revêt une grande importance dans les sélections.

### *Effet du cerclage*

Tous les sujets cerclés ont amorcé la fermeture de leur blessure et le niveau de cicatrisation atteint après trois mois varie entre 40 et 95% chez les troncs et entre 75 et 97% pour les branches.

L'analyse de variance à un critère de classification révèle l'existence d'une différence significative au seuil de 5% entre les trois classes de diamètre identifiées et pour les trois niveaux de cicatrisation. Le tableau 5 récapitule les différents sous ensembles isolés pour chaque classe. On constate donc que la cicatrisation démarre rapidement au niveau des petits diamètres qui garde une avance du niveau de cicatrisation jusqu'à la fin. Les individus de diamètre moyen (dbh compris entre ]50 - 70]) qui au premier et au deuxième mois ont adopté un comportement intermédiaire par rapport aux petits (dbh compris entre ]20-50]) et aux grands diamètres, semblent rejoindre les plus gros (dbh > 70cm) au troisième mois. En somme, les jeunes sujets cicatrisent plus rapidement que les sujets âgés. La provenance, c'est-à-dire la sous-zone ne semble pas influencer sur la vitesse de cicatrisation.

**Tableau 5 : Vitesse de cicatrisation en fonction du diamètre**

	dbh (cm)	Effectifs	Sous-ensemble pour alpha = .05	
			1	2
Niveau moyen de cicatrisation après un mois				
Duncan	>70	4	1a	
	]50-70]	5	10,6ab	10,60
	]20-50]	7		14,57b
Niveau moyen de cicatrisation après deux mois				
Duncan	>70	4	8,5a	
	]50-70]	5	34ab	34,00
	]20-50]	7		40b
Niveau moyen de cicatrisation après trois mois				
Tukey B	>70	4	67,5a	
	]20-50]	7		89,64b
	]50-70]	5		90,4b

Les moyennes affectées des mêmes lettres ne diffèrent pas de façon significative au seuil de 5%

Cette méthode d'induction florale a été pratiquée avec succès sur un certain nombre d'espèces fruitières telles que les Mélèzes du Japon (Philipson, 1996), l'olivier d'Europe (*Olea europaea*; Meilan, 1997), l'avocatier (*Persea americana*; Zilberstaine et Kaluski, 1999), le karité (*Vittelaria paradoxa*; Lamien, 2006). La présente étude dont la phase d'observation n'a duré que cinq mois ne nous permet pas d'adjoindre le samba à la liste des essences ligneuses favorables au cerclage de l'écorce, mais son comportement vis à vis de ce traitement montre qu'il pourrait bien y répondre favorablement dans certaines conditions. Il faut signaler d'entrée de jeu qu'aucune différence significative n'a été observée entre les réactions enregistrées au niveau du cerclage du tronc et celui des branches d'une part et celui des témoins d'autre part en ce qui concerne l'émission des fleurs car aucune floraison n'a été observée tout au long de l'étude.

Au traumatisme causé par le cerclage, *Triplochiton scleroxylon* a eu en général une réaction satisfaisante. En effet, tous les individus cerclés ont amorcé la cicatrisation de la blessure et le niveau de reconstitution de l'écorce atteint est en moyenne de 92,5 %. Chez les sujets de diamètre supérieur ou égal à 50cm, la vitesse de cicatrisation est inférieure à celles de sujets de diamètre plus petit, que ce soit au premier, au second



ou au troisième mois. Ceci montre que les jeunes sujets cicatrisent plus vite que les vieux. En effet, les premiers étant encore en croissance possèderaient des hormones de croissance qui activeraient la cicatrisation de la blessure faite sur leur écorce.

En outre nous avons remarqué une émission de repousses en dessous du point de cerclage. Ce phénomène a été également observé chez le Karité et est assimilé à une réaction au traumatisme (Lamien, 2006). Dunn et Lorio (1992) pensent qu'il s'agit d'une réponse au déficit en hydrates de carbone et en hormones, substances produites par les parties aériennes et dont cette partie du tronc sous-jacente à l'anneau et les racines sont privées. L'émission de nouvelles repousses productrices de sève élaborée constitue donc une sorte de palliatif au déficit en substances de réserve et autres métabolites dont les racines ont besoin afin de jouer pleinement leur rôle de pourvoyeur en eau et sels minéraux en vue d'assurer la survie du végétal.

### **Conclusion**

La caractérisation écologique des populations rémanentes de samba faite dans cette étude révèle une grande variabilité structurale des populations en fonction des sous zones identifiées dans l'aire de répartition de l'espèce. Les zones de concentration de *Triplochiton scleroxylon* permettent de déduire les conditions optimales de croissance et de développement de l'espèce. Le niveau de régénération est faible dans toutes les populations et de plus, on assiste à la dégradation des forêts naturelles. Ceci nous amène à dire qu'il urge de définir des bases d'une sylviculture adaptée aux conditions locales de production, ce qui sous-entend l'installation des plantations à partir de souches testées capables de résister aux aléas climatiques. A cet effet, le samba se prête au greffage et cela permettrait une bonne sélection en vue de l'obtention des meilleures souches. L'irrégularité des floraisons pourrait être contournée par le cerclage d'écorce et ainsi parvenir à la production abondante de semences de grande valeur.

### **Remerciements**

Nous tenons à remercier l'Académie Africaine des Sciences qui a financé cette étude via le réseau AFORNET.



### Références bibliographiques

- Adjanonhoun E. J.; Adjakidje, V.; Ahyi, M. R. ; Ake Assi, L.; Akoegninou, A.; D'almeida, J.; Apovo, F.; Boukef, K.; Chadare, M.; Cusset, G.; Dramane, K.; Eyme, J.; Gassita, J.N.; Goudote, E.; Guinko, S.; Houngnon, P.; Issa LO, L.; Keita, A.; Kinifo, H.V.; Kone-Bamba, D.; Musampa Nseyya, A.; Saadou, M.; Sogodandji, TH.; De Souza, S.; Tchabi, A.; Zinsou Dossa, C.; Zohoun, T., 1989. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Bénin. Médecine traditionnelle et pharmacopée. ACCT, Paris. 895 p
- Afouda, M. S. 1987. Etude de quelques techniques de régénération du samba (*Triplochiton scleroxylon* K. Schum.) et du fraké (*Terminalia superba* Engl. et Diels) dans la forêt naturelle de la Station de Recherche sur le Palmier à Huile (Pobè: Sud-Bénin). Thèse d'Ingénieur Agronome. FSA/UNB. 275 p.
- Agbahungba, A. G.; Sokpon, N., 1998. Rapport national sur les ressources phylogénétiques forestières du Bénin. 30 p.
- Agbo, V.; Sokpon, N., 1998. Forêts sacrées et patrimoine vital au Bénin. Rapport technique final. 32 p.
- Akossou, A. Y. J., 1998. Contribution à la modélisation de la production des plantations de teck (*Tectona grandis* L. F.) au Sud-Bénin. Thèse d'Ingénieur Agronome, FSA/UNB. 60 p.
- Dembele, C. 2004. Forest regeneration in savannas woodland subjected to selective cutting disturbance in Burkina Faso, West Africa. Graduate thesis in forest management, Swedish university of agricultural sciences, Umea, Sweden, 55p.
- Dickson, R. E., 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. *Ann. Sci. Forest*, 46:631-647.
- Dunn, J. P.; Lorio, P. L. JR., 1992. Effects of bark girdling on carbohydrates supply and resistance of loblolly pine to southern pine beetle (*Dendroctonus frontalis* Zimm.) attack. *Forest ecology and Management*, 50:317-330.
- Dupuy, B.; Maitre, H-F.; N'guessan Kanga, A., 1999. Table de production du teck (*Tectona grandis*) : l'exemple de la Côte d'Ivoire. *Bois et forêts des Tropiques*, 261(3) : 7-14.



- Ganglo, J. C. 1987. Etude de quelques facteurs de multiplication par semis et par bouturage de tige de *Triplochiton scleroxylon* K. Schumann (Sterculiacées). Thèse d'ingénieur Agronome. FSA/UNB. 110 p.
- Hall B. J. and Bada, S. O., 1979. The distribution and ecology of obeche (*Triplochiton scleroxylon*). *Journal of ecology*, 67: 543 – 564.
- Jones, N., 1975. The distribution of *T. scleroxylon* with special reference to Nigeria. Sym. Var. And breedings systys *T. scleroxylon* Fed. Dep. For. Res. Ibadan, (Nigeria). pp 8-18
- Kozłowski, T. T., 1992. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. *The Botanical Review* 58 (2): 107-222.
- Lamien N., 2006. Fructification du Karité (*Vitellaria paradoxa* C. F. Gaetn.) Sapotaceae : Facteurs de déperdition, amélioration et prévision des rendements à Bondoukuy, ouest Burkina Faso. Thèse de Doctorat. 101 p.
- Leakey R. R. B. AND Longman K. A., 1986. Physiological environment and genetic variations in apical dominance as determined by decapitation in *Triplochiton scleroxylon*. *Tree Ecology*, 1: 193 – 207.
- Leakey R.R.B. AND Coutts M.P., 1989. The dynamics of rooting in *Triplochiton scleroxylon* cutting: their relations to leaf area, node position, dry weight accumulation, leaf water potential and carbohydrates composition. *Tree Physiology*, 5: 135 – 146.
- Meilan, R., 1997. Floral induction in woody angiosperms. *New Forest*, 14: 179-202.
- Serrain, N., 1975. Symposium sur *Triplochiton scleroxylon*. Rapport de la mission au Nigeria et au Ghana. ENSA 1975.
- Sokpon, N. 1995. Recherches écologiques sur la forêt dense semi-décidue de Pobè au sud-est du Bénin : Groupements végétaux, structure, régénération naturelle et chute de litière. Thèse de Doctorat. ULB. 350 p.
- Sokpon, N.; Ouinsavi, C., 2004. Gestion des plantations de *Khaya senegalensis* au Bénin. *Bois et Forêts des Tropiques*, 279 (1) : 37-46.
- Tessaou, O. 2004. Caractérisation structurale des peuplements de *Triplochiton scleroxylon* (Sterculiacées) au Bénin. Mémoire de DEAT.
- Zilberstaine, M.; Kaluski, E. 1999. Improving avocado orchard yield through the use of pruning and girdling. *Subtropical Fruits news*.7 (1)7-8



## **Influence of soil properties on the natural durability, extractive content and colour of teak (*Tectona grandis* L.f) wood in Togo**

A.D. Kokutse<sup>1</sup>, N. Amusant<sup>2</sup>, N. Boutahar<sup>2</sup> G., Chaix<sup>3</sup>

1 Laboratoire de Botanique et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Lomé, BP1515,

Lomé, Togo, Tel : (+228) 225-50-94, Fax: (+228) 221-85-95

mimidam@hotmail.com

2 Cirad-Persyst, UR Valorisation des Bois Tropicaux, B.P. 5035, TA B40/16, 34398 Montpellier Cedex

5, France, Tel. +33 (0) 467614497 – Fax +33 (0) 467615725

nadine.amusant@cirad.fr, nabila.bouthar@cirad.fr

3 Cirad-Bios, UR Génétique Forestière, B.P. 5035, TA A39/16, 34398 Montpellier Cedex 5, France,

Tel: +33 4 67 61 44 51 - Fax: +33 4 67 59 37 33 gilles.chaix@cirad.fr

### **Abstract**

Togolese teak is highly resistant to pathogen attack, but natural durability and wood colour vary according to plantation sites and geographical zones. Therefore, further information concerning the influence of environmental parameters and their effects on teak wood quality is necessary and it could be possible to improve these characteristics through tree breeding and silviculture programs in Togo. In order to examine the influence of soil properties on teak wood characteristics, 321 wood samples issued from 20 trees were exposed to two fungi: *Antrodia* sp., and *Coriolus versicolor*. Depending on type of soil in which they grew, trees had been randomly selected in two different sites in the same climatic area in Togo. The colour parameters of each sample were measured using the CIELAB system and total extractive content was determined using the Accelerated Solvent Extraction (ASE) procedure. Results showed a significantly lower total extractive content (11.1%) for trees that grew on hydromorphic tropical ferruginous (HTF) soil than trees from drained ferruginous soil (12.8%). Samples from HTF soil were lighter and the redness  $a^*$  and yellow-blueness  $b^*$  were significantly higher. Independently of soil quality, all the trees were highly durable regarding decay by *C. versicolor*. With *Antrodia* sp., 90 % of the trees from both sites were highly durable and only 10% were durable. However, samples from HTF soil were less durable with regard to the two fungi.



## Introduction

Teak (*Tectona grandis* L.f) is historically well known for highly durable wood, due largely to the presence of extracts in the heartwood, e.g. anthraquinones and tectoquinones (Pahup *et al.* 1989; Yamamoto *et al.* 1998; Simatupang and Yamamoto 1999 Haluk *et al.* 2001). Due to this natural durability, teak is often used for outdoor purposes, for example boat decking, bridge building and garden furniture as well as for traditional indoor uses such as flooring and furnishings. Such uses require a highly stable wood with regard to physical properties as well as an aesthetically pleasing colour and adequate resistance to pathogens. Because of the high demand, teak plantations are increasing and becoming an important timber source in tropical countries especially in West-Africa, Asia and South Africa. Over 14,000 ha of teak plantation exist in Togo (Tengué 1995). Although wood density and strength properties of Togolese teak wood are not significantly different compared to those from natural forests (Kokutse *et al.* 2004), natural durability and wood colour shows high variability within and between stands due to tree age (Kokutse *et al.* 2006), extractive content (Gierlinger, 2003) and to various ecological conditions (e.g. geomorphology, topographic, soil, rainfall) (Kokutse *et al.* 2006, Adjonou *et al.* 2009). Due to the variability in environmental conditions, the reputation of teak wood for natural durability is often questioned when trees from plantations are supplied for outdoor uses (Bhat *et al.* 2004). Simatupang and Yamamoto (2000) have reported that teakwood from a wet plantation site is less resistant to fungi than teak from a dry site. Bhat *et al.* (2005) studied home garden teak and found that wood samples from a wet site with pale coloured wood and lower extractive content were more susceptible to fungi. The main objective of the present study was to examine the influence of soil properties on natural durability, wood colour and extractive content in teak wood from Togolese plantations.

## Material and methods

### Site description

The study sites, namely Tchorogo (established in 1972) and Oyou (established in 1966), were situated in the same area of the central part of Togo (1°00'E, 8°21'N), West Africa (Fig.1). This central area of Togo is covered by Guinean woody savannas and is situated at an altitude of 200-400 m. In this area, two major seasons exist annually, one long rainy season lasting 6-8 months followed by a long dry season. The mean annual precipitation is 1400-1600 mm and temperatures vary from 25°C to 40°C (Ern, 1979). The Oyou site is located on tropical ferruginous soils with a pseudogley layer and hydromorphic surface horizons. This kind of soil is periodically flooded in the rainy season. The substratum is made up of basic rocks, micashists and quartzites of Togo Mountains. The texture is muddy, sandy and clayey. Tchorogo site is located on a tropical ferruginous and well drained soil with a sandy-fine gravel texture. The description of the study sites is presented in Table 1.



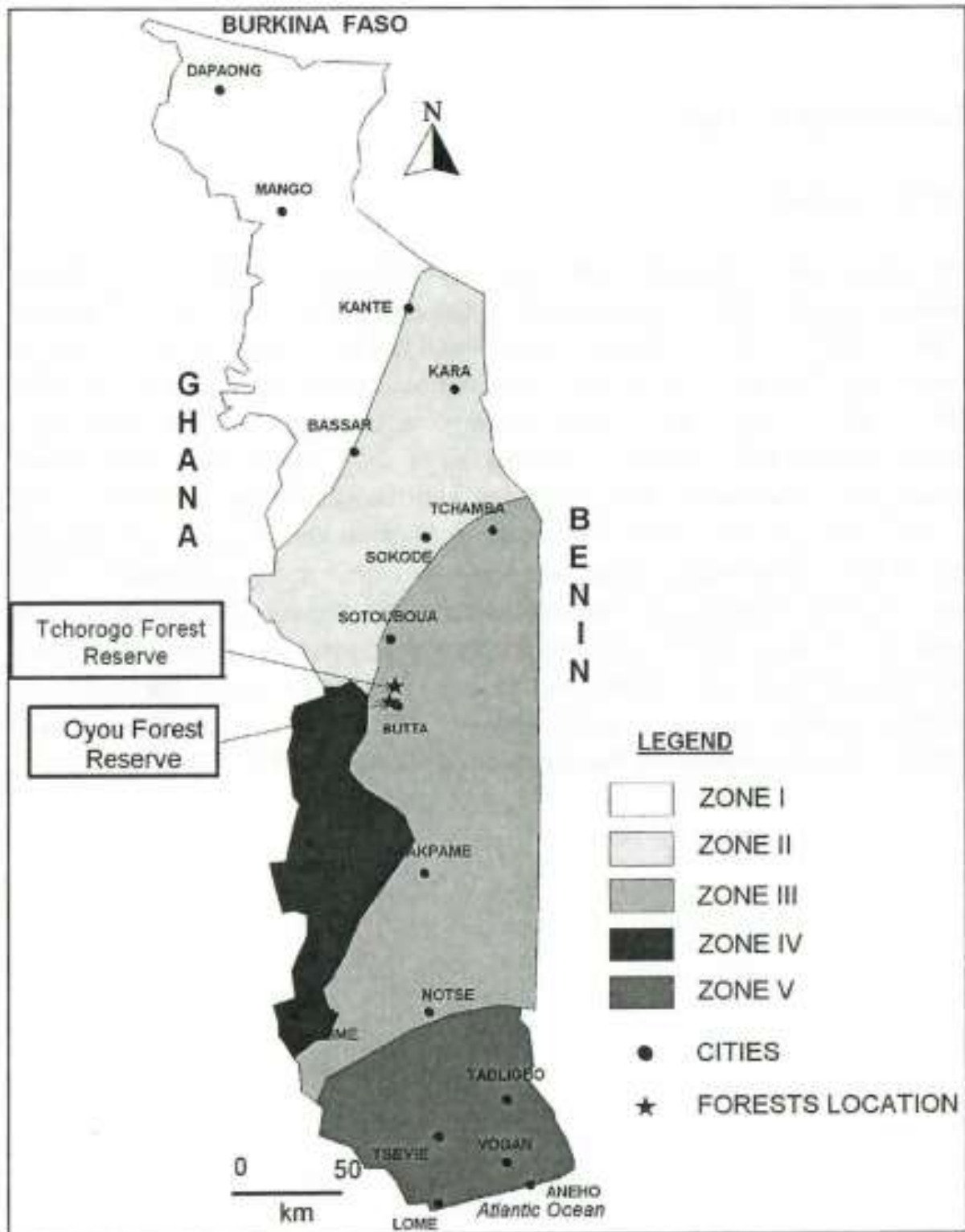


Fig.1. Map of the ecological zones of Togo with the visited plantations  
 Zone I: zone of the northern plains; Zone II: zone of the northern mountains;  
 Zone III: zone of the central plains; Zone IV: southern zone of mounts Togo;  
 Zone V: coastal plains of the southern part of Togo (Ern, 1979)

### Sample preparation

Twenty trees of 34 and 40 years of age, respectively were harvested in 2006 from Tchologo and Oyou. A 550 mm long log was cut from each tree at breast height which was further sawn into boards in the radial direction (15 x 20 mm). Boards were sawn radially (550 mm in the longitudinal axis and 50 mm in the tangential axis) at breast height. Beams of heartwood (20 x 15 x 550 mm) were cut from each board and finally, 10 (20 x 15 x 50 mm in radial and tangential longitudinal directions) wood samples were cut per beam. The samples were conditioned at 20°C and 65 % RH. The location of each wood sample, according to its position in the stem, was recorded by measuring its cambial age and the distance from the pith. The samples were classed into three groups depending on cambial age of the samples: inner (5-10 years), intermediate (11-20 years) and outer heartwood (21-30 years). A total of 321 and 343 samples were used to evaluate durability and wood colour respectively. The remaining samples were then ground into wood meal for total extractive content measurement.

### Extractive content

The extractive content was determined gravimetrically. The ground wood samples were extracted using a sequence of solvents: hexane, acetone and methanol 80% (technical grade). Extractions were performed with an ASE-200 apparatus (Dionex). 2.5 g of wood meal was weighed and the dry mass calculated after the determination of humidity on parallel samples. Extraction conditions were: temperature (80°C), pressure (100 bars), static time (5 min), static cycles (3), flush (100 %) and purge (90 s). Analyses were carried with three replicas. When the extraction was completed, the wood meal was removed from the cells and dried in an oven at 103°C until constant mass. The extractive content was determined using the equation: Extraction percentage =  $[\text{dry mass before the extraction} - \text{dry mass after extraction}] \times 100 / \text{dry mass before the extraction}$ .



### Wood colour measurements

Colour measurements were performed along the tangential-radial side of the wood samples. The percentage of reflectance data was collected at 10 nm intervals over the visible spectrum (from 400 to 700 nm) using a portable spectrophotometer (Microflash Datacolor 200d). The reflectance readings were converted into  $L^* a^* b^*$  values (CIELAB system), where  $L^*$  describes the lightness (100 = white) or darkness (0 = black) of a colour,  $a^*$  represents the X axis which is redness [red (+) to green (-)] and  $b^*$  represents the Y axis, yellow-blueness [yellow (+) to blue (-)]. Illuminant A (representing incandescent light), 10° standard observer with 6 mm apertures chosen and specular reflection setting was excluded.

Table 1. Site characteristics. A: altitude (m). D: density (tree.ha<sup>-1</sup>). MD: mean diameter (cm) at height 1.3 m. MH: Mean height (m).

Location	A	Year of plantation	Soil type	D	MD	MH
Tchorogo	419	1972	Ferruginous soil, sandy-silt structure	2600	21.8 ± 4.4	16.1 ± 1.7
Oyou	420	1966	Ferruginous soil clay, muddy sandy-structure	2600	23.4 ± 3.1	13.6 ± 0.6

### Decay measurements

After colour measurements, the wood samples were used to determine natural durability. The test was performed according to the European standards NF-EN 350-1 (AFNOR 1994) and NF-EN113 (AFNOR 1996) guidelines. Two species of basidiomycetes fungi were used; namely *Coriolus versicolor* (strain CTBA 863 A), a white rot and *Antrodia sp.* (strain CTFT 57 A), a brown rot. One hundred sixty one samples were used to test the natural durability against *Antrodia sp.* And 160 samples for *Coriolus versicolor*. Reference samples of beech and pine were used

as controls to test the virulence of the fungi. The sterilised wood samples from the outer, intermediate and inner heartwood were placed over 16 weeks in glass jars previously inoculated with a mycelia suspension of fungal mycelia (75 % RH and 27°C). At the end of the test, the mycelium was removed from the wood sample prior to drying at 103°C for 48 h. The mass loss was calculated and the durability rating against wood-destroying Basidiomycetes fungi based on the EN 350-1 standard (AFNOR 1994) was determined.

## Results

The total extractive content ranged from  $7.8 \pm 0.1$  to  $14.5 \% \pm 1.1$  for the tree samples from the Oyou site and from  $11.0 \pm 0.7$  to  $15.3 \% \pm 1.9$  for the trees of the Tchorogo site. For both sites, the variability between trees was high within the stands and explained 17% of the total extractive content variability. When taking into account the position in the tree (inner, intermediate or outer heartwood), the radial position of the wood sample explained only 3 % of the variation of the total extractive content in the Oyou site, however it explained 10 % of the variation in Tchorogo site. The variance analysis showed significantly higher extractive content for trees from drained ferruginous soil (Tchorogo site) than from the hydromorphic tropical ferruginous (HTF) soil (Oyou site) ( $F_{1,19} = 5.88$ ,  $P = 0.02$ ).

The mean mass loss in the beech and pine control samples were 54.9 % for *Antrodia* sp. and 38.0 % for *C. versicolor*. These values were higher than the minimal values given in the standards indicating that the fungi were very virulent under tropical conditions and validates the durability of the test results. All the trees were highly durable with regard to *C. versicolor*. The mass losses varied from 0.4 to 3.7 % when considering the tree. For individual samples, the mean mass loss varied from 0.0 to 8.4 % in the Oyou site and from 0.0 to 5.0 % in the Tchorogo site. Only four samples were durable. The radial position of the sample in the tree was found to have an influence on the degree of attack of *C. versicolor* in Tchorogo ( $F_{1,65} = 10.70$ ,  $P = 0.002$ ) and in Oyou sites ( $F_{1,58} = 10.15$ ,  $P = 0.002$ ). In both cases the outer heartwood was less resistant to *C. versicolor* than the inner heartwood (Fig.2). However the intermediate heartwood was not significantly different from inner and outer heartwood. A significant difference was observed in the degree of decay



of the teak wood, depending on the type of soil on which the trees grew, with regards to *C. versicolor*. Trees from hydromorphic tropical ferruginous (HTF) soil (i.e. the Oyou site) showed significantly higher mass losses ( $F_{1,19} = 6.96$ ,  $P = 0.02$ ). The mass losses obtained with *Antrodia sp.* were higher than those obtained with *C. versicolor* and ranged from 0.3 to 13.9 % in the Oyou samples and from 0.2 to 8.1 % in Tchorogo samples (Table 2). Out of 161 teak wood samples exposed to *Antrodia sp.*, 92 % were rated as very durable, 4 % were durable and 4 % were moderately durable for the Tchorogo site. However in the Oyou site, 89 % of samples were very durable, 4 % were durable and 7 % were moderately durable. The influence of the radial position on wood durability was not significant with the samples exposed to *Antrodia sp.* Trees from HTF soil showed higher mass losses than trees from drained ferruginous soil even though the difference between the sites was not statistically significant.

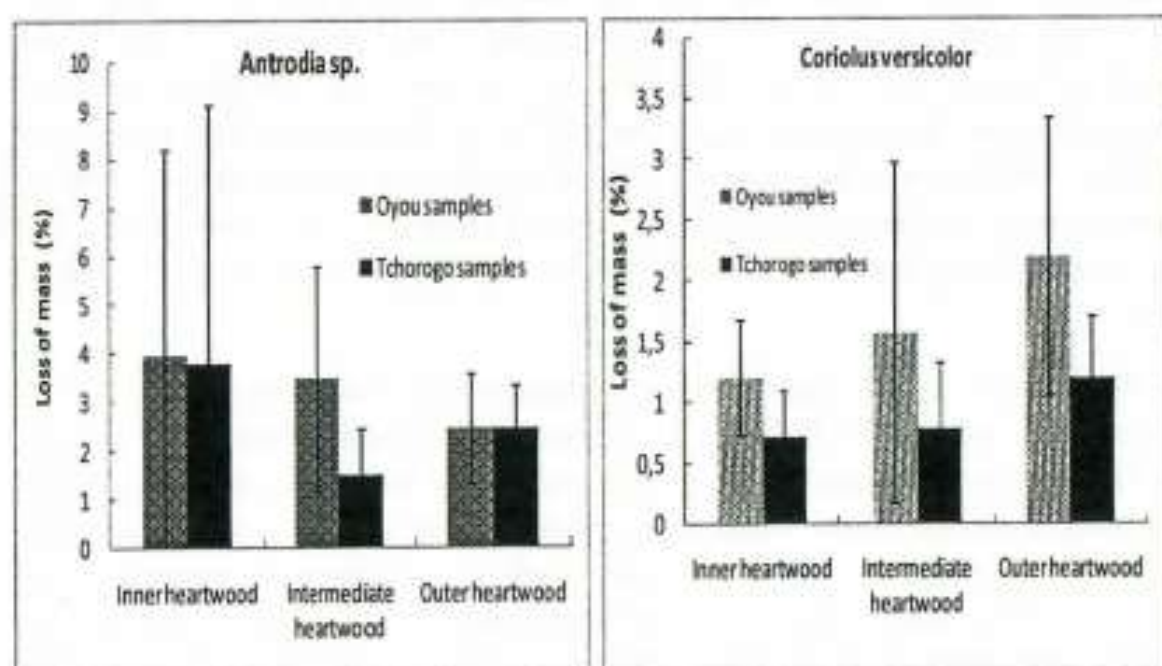
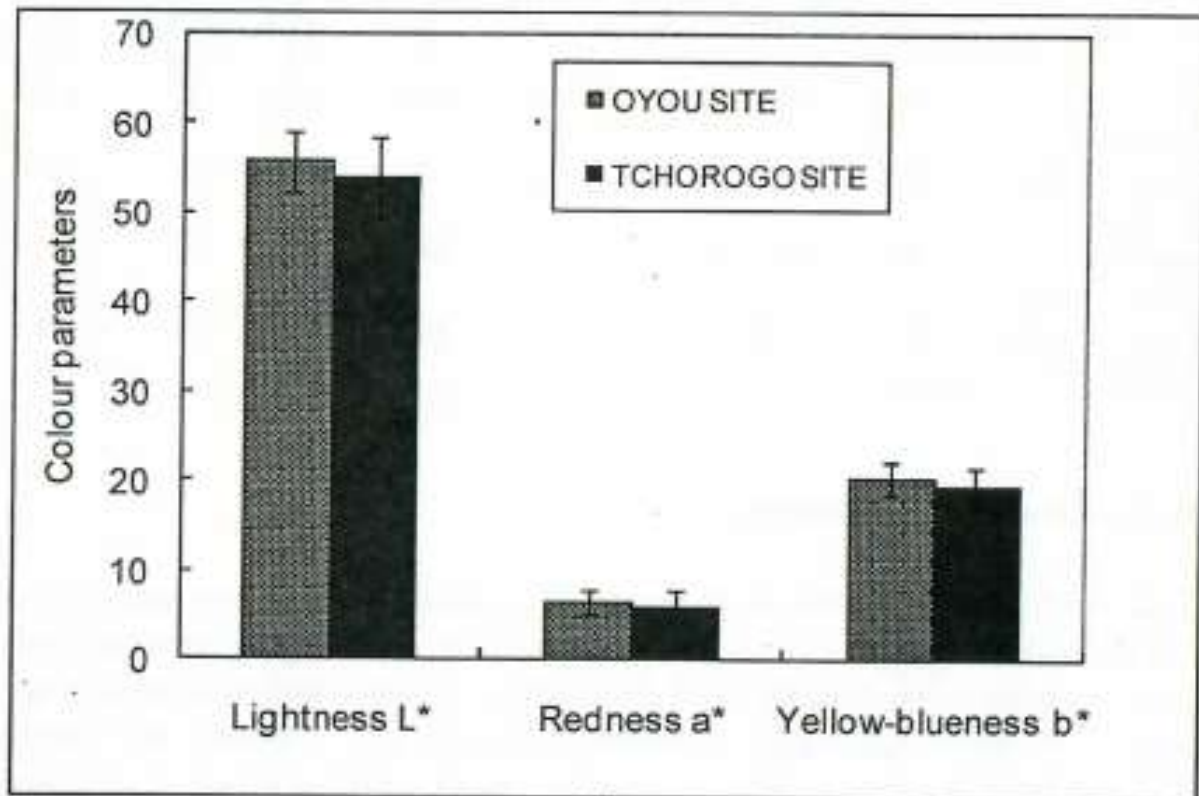


Fig. 2. Mean % mass loss due to fungal attack in teak heartwood differed depending on the radial position of the sample within the tree and the site characteristics

The lightness  $L^*$  parameter of wood samples ranged from  $54.0 \pm 0.4$  in Tchorogo site to  $54.8 \pm 0.2$  in the Oyou site. No significant differences were observed in the samples from Tchorogo and Oyou regarding to their light colour. When considering the redness  $a^*$  and the yellow-bluesness  $b^*$  of the wood samples, Oyou samples differed from Tchorogo samples

(Fig. 3). Samples from HTF soil (Oyou site) were significantly redder ( $F_{1,342} = 8.54$ ,  $P = 0.004$ ) and their yellow-blueness  $b^*$  value was significantly higher ( $F_{1,342} = 20.08$ ,  $P < 0.001$ ) than those from the drained ferruginous soil (Tchorogo site). The influence of the radial position on wood colour parameters was not significant in either site.



**Fig. 3.** Mean colour parameters - Redness  $a^*$  and Yellow-blueness  $b^*$  were significantly higher in teak trees from hydromorphic tropical ferruginous soil (white bars) than teak trees from drained ferruginous soil (black bars).



Table 2. Wood characteristics (Range, coefficient of variation CV%, and number of samples n)

	Oyou site				Tchorogo site			
	n	Min	Max	CV	n	Min	Max	CV
L*	203	44.0	63.5	15.9	140	45.8	64.8	11.9
a*	203	3.1	9.9	4.6	140	1.9	10.49	3.4
b*	203	16.0	26.0	11.0	140	10.5	24.2	8.7
<i>Antrodia</i> sp. (mass loss %)	86	0.33	13.9	115	75	0.2	8.1	77
<i>Coriolus</i> <i>versicolor</i> (mass loss%)	85	0.0	8.4	125	66	00	5.0	131
Total extractive content (%)	57	7.18	15.1	5.7	60	9.4	15.3	6.4

## Discussion and conclusions

This study confirmed the high decay resistance of plantation teak wood. All the wood samples exposed to *C. versicolor* were highly durable (only four samples were durable) and out of the 161 exposed to *Antrodia* sp., only 7 % were moderately durable. *Antrodia* sp., a brown rot fungus isolated from tropical regions caused the most damage to wood samples, with up to 0-14 % dry mass loss. The influence of the radial position on wood durability was significant in samples exposed to *C. Versicolor*. A significant difference was observed in the degree of decay on teak wood, according to the type of soil on which the trees grew. With regard to *C. versicolor* and *Antrodia* sp., the results showed that trees from hydromorphic tropical ferruginous soil were less durable compared to trees from drained soil. This loss of durability is reflected by the lower extractive content in trees grown on hydromorphic tropical soil. Many authors have found a direct relationship between wood durability and extractive content (e.g. Nelson and Heather 1972; Modesale et al. 1996; Haupt et al. 2003). Haupt et al. (2003) also showed that extractive content increased with tree age. In our study, trees from the Oyou site were older (40 years) than trees from the Tchorogo site (34 years old). Therefore, it can be expected that teak from Oyou site contained more extractives. However the results showed a significantly higher total



extractive content in trees from the Tchorogo site. A genetic diversity analysis carried out on the teak plantations from Togo has shown that the genetic variability between the populations is very weak (Logossa, 2006). Our results therefore imply that the higher decay resistance and extractive contents of teak wood from well drained soil was mainly due to the environmental factors, especially the soil conditions rather than genetic diversity.

Concerning the colour of the wood which is one of the most appreciated criteria by end-users, results showed that samples from HTF soil (Oyou site) were significantly redder and their yellow-blueness  $b^*$  value was significantly higher than those from drained ferruginous soil (Tchorogo site). The influence of site conditions on wood colour is still a controversial topic. According to Klumpers (1994), the wood is darker when the water content in the soil is high (wet site). Simatupang and Yamamoto (2000) have observed that teak trees from a wet site in Indonesia produced darker wood and were more susceptible to fungal decay. However, Bhat et al. (2005) studied home garden teak and found that a dry site produced darker coloured wood than a wet site. In the Ivory Coast, with similar ecological characteristics as Togo, Durand (1984) found that when the climate is humid and the soil is without hydromorphic traces, teak wood shows a greater brightness. In our study, teak from the hydromorphic Oyou and well drained Tchorogo sites, respectively, had similar lightness. However the redness and the yellow-blueness were different. Other studies on Togolese teak have showed that the plantations whose woods are redder are generally located on tropical ferruginous and ferrallitic soils which contain an important amount of clay (Adjonou et al. 2009). The existence of clay enables retention of water for a long time in the soil, leading to hydromorphy. This type of colouration is the most desirable for the end-users of teak wood, especially in Togo and in West-Africa. However, the plantations grown on hydromorphic soils are less durable, as shown by the present work. Further studies should be carried out on the mineral composition of the soils and their influence on wood colour. If the influence of the soil on wood colour and the extractive content as well as their interactions were better quantified, it may be possible to improve these characteristics through tree breeding and silviculture programs in Togolese teak plantations.



## Acknowledgements

Funding was provided by the International Foundation for Science (IFS), Sweden.

## References

- AFNOR. 1994. *Norme NF EN 350-1 Durability of wood based products—Natural durability of solid wood— part 1: Guide to principles testing and classification of the natural durability of wood*
- AFNOR. 1996. *Norme NF EN 113 Wood Preservatives—Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying Basidiomycetes—Determination of the toxic values*
- Adjonou, K., Kokutse, A.D., Kokou, K., Ganglo, J. And B. de Foucault. 2009. Environmental and wood biophysical variabilities in teak plantations in Togo (West Africa). *Acta Bot. Gallica (in press)*
- Bhat, K.M., Thulasidas, P.K., Florence, E.J.M. and K. Jayaraman, 2005. *Wood durability of home-garden teak against brown-rot and white-rot fungi*. *Trees* 19:654–660
- Durand, P.Y. 1984. *A technological survey of plantation-grown Teak in Ivory Coast*. IUFRO Meeting—Project Group P5.01. Manaus, Brasil.
- Ern, H., 1979. *Die Vegetation Togos. Gliederrung, Gefährdung*. *Willdenowia*, 9 : 295-312.
- Gierlinger N., Jacques D., Schwanninger M., Wimmer R., and Paques L. E. 2003. *Rapid predictions of natural durability of larch heartwood using Fourier transform near-infrared spectroscopy*. *Can. J. For. Res* 33: 1727-1736.
- Haluk, J.P., Roussel, C., and M. Thévenon. 2001. *Importance des quinones dans les propriétés antifongiques du Teck (Tectona grandis)*. *Les cahiers Scientifiques du Bois*. 2 : 77-83.
- Haupt, M., Leithoff, D. Meier, D., Puls, J., Richter, H.G., and O. Faix. 2003. *Heartwood extractives and natural durability of plantation-grown teakwood (Tectona grandis L.) – a case study*. *Holz als Roh- und Werkst* 61:473–474

- Klumpers, J. 1994. *Le déterminisme de la couleur du bois de chêne. Etude sur les relations entre la couleur et les propriétés physiques, chimiques et anatomiques ainsi que des caractéristiques de croissance*. Thèse de Doctorat de l'ENGREF, Nancy, France. 195 pp.
- Kokutse, A.D., Baillères, H., Stokes, A., and K. Kokou. 2004. *Proportion and quality of heartwood in Togolese teak (Tectona grandis L.f)*. Forest Ecology and Management. 189: 37-48
- Kokutse, A.D., Stokes, A., Baillères, H., Kokou, K. and C. Baudassé. 2006. *Decay resistance of Togolese teak (Tectona grandis L.f) heartwood and relationship with colour*. Trees: Structure and Function 20: 219 – 223
- Logossa, Z.T.2006. *Caractérisation génétique des Tecks (Tectona grandis L.f) provenant des plantations du Togo*. Mémoire de Master II, Sciences du Bois et Fibres, Université de Bordeaux 1, 29 p.
- Mosedale, J.R., Charrier, B. and G.Janin G .1996. *Genetic control of wood colour, density and heartwood ellagitannin concentration in European oaks (Quercus petraea and Q robur)*. Forestry 69:111–124
- Nelson, N.D. and W.A. Heather. 1972. *Wood colour, basic density and decay resistance in heartwood of fast grown Eucalyptus grandis Hill ex Maiden*. Holzforschung 26:54–60
- Pahup, S., Sunita, J. and B. Sangeeta..1989. *A 1, 4-Anthraquinone derivate from Tectona grandis*. Phytochemistry. 28, 1258-1259.
- Simatupang, H.M.and K.Yamamoto. 1999. *Properties of teakwood (Tectona grandis L.f) as influenced by wood extractives and its importance for tree breeding*. Regional seminar on site technology and productivity of teak plantations, Thailand.
- Simatupang, H.M.and K.Yamamoto. 2000. *Properties of teakwood (Tectona grandis L.f) and Mahogany (Swietenia macrophylla King) from manmade forest and influence on utilization*. Proceedings of the seminar on high value timber species for plantation establishment, Thailand.



- Tengué, K.M..1995.- *Examen mi-parcours de 1995, rapport interne de l'Office de développement et d'exploitation des forêts du Togo «l'objectif an 2000 de l'OIBT »*, Lomé (Togo). 10pp.
- Yamamoto, K., Simatupang, H., M., and R. Hashim. 1998. *Caoutchouc in teak wood (Tectona grandis L.f.) : formation, location, influence on sunlight irradiation, hydrophobicity and decay resistance*. Holz as Roh-und Werkstoff. 56: 201-209.

## Etablissement des normes du Système Intégré de Diagnostic et de Recommandation de la culture d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr) variété Pain de sucre en zone subéquatoriale du Bénin

C. E. Agbangba<sup>1,2</sup>, D. G.<sup>3</sup> Dagbenonbakin, V.<sup>4</sup> Kindomihou

<sup>1</sup> Institut National des Recherches Agricoles du Bénin, Centre de Recherche Agricole Plantes Pérenne de Pobè

<sup>2</sup>Département des Sciences et Techniques de Production Végétale, Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, Bénin ; E-mail : [agbaemile@yahoo.fr](mailto:agbaemile@yahoo.fr)

<sup>3</sup> Institut National des Recherches Agricoles du Bénin, Recherches Coton et Fibres, INRAB, Cotonou Bénin

<sup>4</sup> Département de Production Animale, Faculté des Sciences Agronomiques, UAC, Bénin.

### Abstract

The Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) provides a means of simultaneously identifying imbalances, deficiencies and excesses in crop nutrients, and ranking them in order of importance. Some proponents of DRIS claim it able to establish nutrient standards regardless of varietal or geographic variables or both. This study concerns the use of DRIS approach to assess pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) nutrient requirements of the variety Perola on ferrallitic soils in the Allada Commune, located in the coastal hinterland of Benin. The aim of this study is to: (1) evaluate pineapple nutrient status in the Commune of Allada; (2) compare the DRIS method with the critical value method (CVM) for foliar nutrients diagnosis of "Perola" variety; (3) develop DRIS norms for "Perola" pineapple variety; (4) evaluate the current fertilization practices on the nutritional status for that variety. To achieve this goal, sixty (60) plots of 16m<sup>2</sup> (4m x 4m) have been established in 60 farmers' pineapple fields, at the rate of 15 per districts. In each field a representative plot of 16 m<sup>2</sup> (4 m x 4 m) was established and 10 "D" leaves samples were taken at flowering stage in each plot. DRIS standards for pineapple were developed from 60 observations of nutrient composition. DRIS and CVM methods were able to correctly diagnose N, S and Mg for variety "Perola". However, Critical Value Method failed to make a correct diagnosis for P, K, Ca, and Zn for the pineapple variety "Perola". When DRIS revealed excess for Zn and deficiencies for K and Ca in variety "Perola", CVM indicated respectively adequation of Zn, K and Ca. As conclusion, superior precision is obtained with DRIS approach compared to CVM.

Key words: Benin, CVM, DRIS, nutrient indices, Pineapple.



## Résumé

Le Système intégré de diagnostic et de recommandation (DRIS) est un moyen de détection des déséquilibres, déficiences et excès de nutriments dans les plantes. Il permet leur hiérarchisation selon leur importance. Des études antérieures sur la théorie DRIS stipulent que les normes DRIS peuvent être utilisées sans conditions variétale ou géographique. L'approche du système intégré de diagnostic et de recommandation DRIS est utilisée pour étudier le bilan nutritionnel des plantations d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) variété "Pain de sucre" sur sol ferrallitique dans la Commune d'Allada située dans le Département de l'Atlantique au Sud du Bénin. Les objectifs poursuivis étaient: (i) d'évaluer le statut nutritionnel de la culture d'ananas variété " Pain de sucre " à Allada ; (ii) de comparer la méthode du système intégré de diagnostic et de recommandation (DRIS) à la méthode de la valeur critique (CVM) dans le diagnostic foliaire de l'ananas "Pain de sucre"; (iii) d'établir les normes DRIS de cette variété d'ananas (iv) et enfin d'évaluer les pratiques actuelles de fertilisation de la culture d'ananas variété "Pain de sucre" dans la Commune d'Allada. Ainsi, chez les producteurs d'ananas 60 placettes de 16 m<sup>2</sup> (4 m x 4 m) chacun ont été installées dans 60 parcelles d'ananas. Dix feuilles de stade D ont été échantillonnées dans chacune de ces placettes. Les résultats montrent des normes du Système Intégré de Diagnostic et de Recommandation (DRIS) sur l'ananas établies à partir de 60 observations de nutriments et de rendements pour la variété "Pain de sucre". DRIS de même que la CVM sont capables de faire des diagnostics corrects pour le N, S et Mg sur cette variété. Cependant DRIS décèle un excès de Zn et une déficience en N et Ca alors que la CVM diagnostique des teneurs satisfaisantes en Zn, K et Ca. Par conséquent, la méthode DRIS accroît la précision dans le diagnostic par rapport à la CVM.

Mots clés : Bénin, CVM, DRIS, indice de nutriments, Ananas

## Introduction

L'ananas est le deuxième fruit tropical, après la banane, concerné par le commerce mondial (Tropical, 1970). Les gros importateurs sont l'Union Européenne (41%) et l'Amérique du nord (33 %). Les principaux fournisseurs sont l'Amérique latine et les Caraïbes (40 %). L'Afrique représente 14 % de ce marché avec notamment la Côte d'Ivoire, le Cameroun, le Kenya, et l'Afrique du sud. L'ananas s'inscrit en tête de liste parmi les fruits avec 44 % du volume total des ventes, suivi de la mangue (27 %), l'avocat (12 %) et la papaye (7 %) (INSAE, 2001). La



contribution du Bénin est estimée à 1 % de la production mondiale (Tropagri, 1998), avec la plus grande part provenant du Département de l'Atlantique. L'ananas du Bénin est réputé pour ses qualités organoleptiques. La production d'ananas au Bénin s'accroît de 53,56 tonnes à l'hectare en 2000 à 68,31 t.ha-1 en 2007 (INSAE 2007). La détermination des normes du système intégré de diagnostic et de recommandation (DRIS) de la variété "Pain de sucre" est une base pour le calibrage des recommandations d'apport de nutriments.

## **Matériel et méthodes**

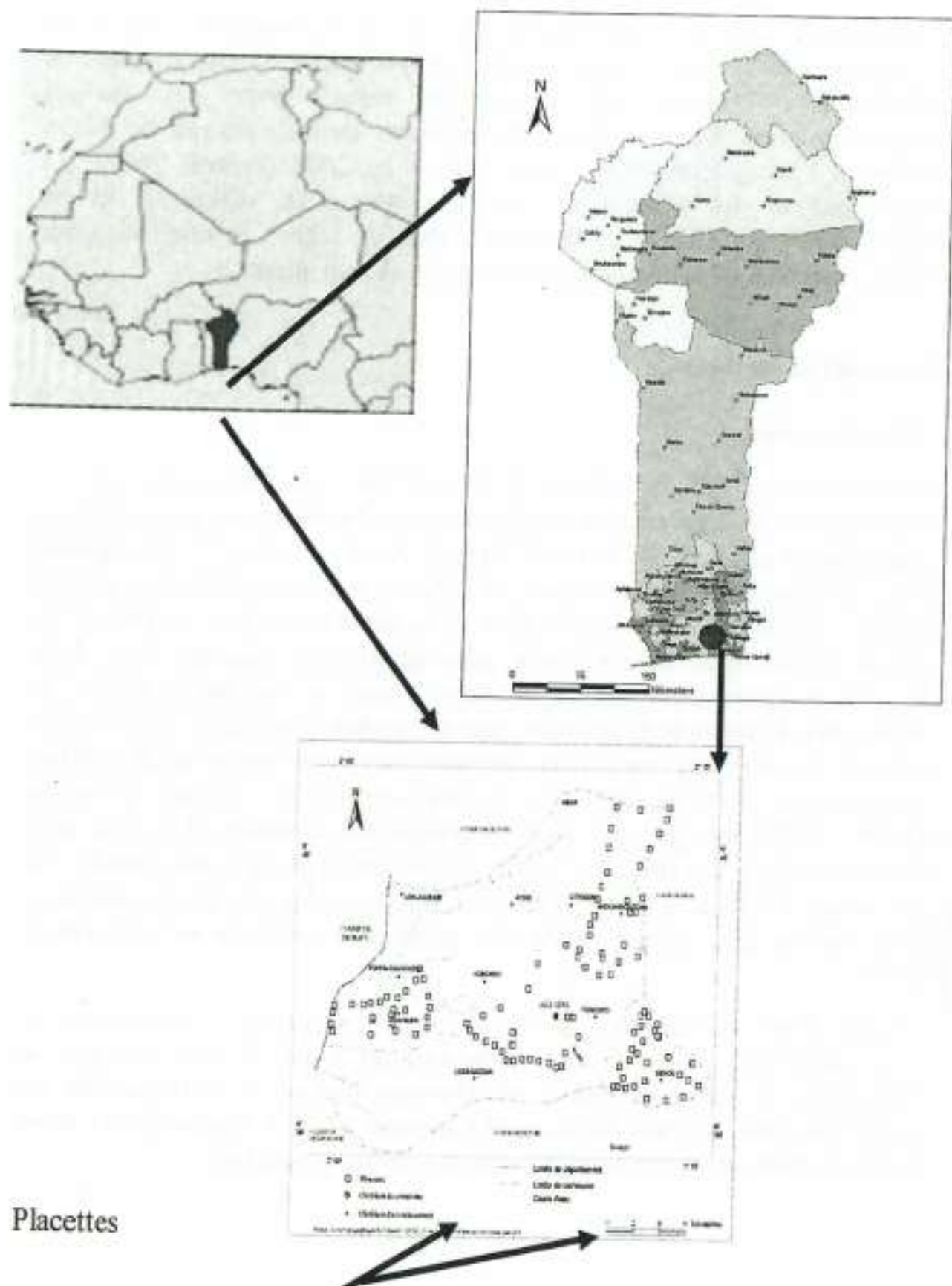
### **Choix du site**

La commune d'Allada (Figure 1) est l'un des huit (08) communes du Département de l'Atlantique au Sud-Bénin. Elle est située au nord de ce département entre 6° 34' et 6°47' latitude Nord, 1°59' et 2°15' longitude Est à environ 54 km de Cotonou, la capitale économique du Bénin. Elle couvre environ 381 km<sup>2</sup> soit 0,34% de la superficie totale du Bénin. Le climat est de type subéquatorial avec quatre (04) saisons dont deux saisons de pluie (une grande de mars à juin et une petite saison de septembre à novembre) et deux saisons sèches (de juillet à septembre puis de novembre à mars). Les hauteurs moyennes annuelles des pluies varient entre 1100 et 1400 mm et sont voisines des valeurs optimales (1200 - 1500 mm/par an) pour la production d'ananas. Les sols sont essentiellement ferrallitiques sur la grande partie de la zone d'étude. La commune d'Allada a été retenue pour l'étude puisque la filière ananas y embrasse le plus grand nombre de producteurs (Ouinkoun et Lalèyè, 2004).

Quatre (4) arrondissements ont été choisis sur la base de l'importance de la production et de la situation géographique en vue d'avoir une grande variabilité. Il s'agit de Sékou et Ahouananonzoun à forte production respectivement en Pain de sucre et Cayenne lisse; d'Allada-Centre dont la production est moyenne et d'Avakpa à faible production.



Etablissement des normes du Système Intégré de Diagnostic et de Recommandation de la culture d'ananas  
 (*Ananas comosus* (L.) Merr) variété Pain de sucre en zone subéquatoriale du Bénin



Placettes

Figure 1. Carte de localisation de la commune d'Allada avec les différentes placettes

## **Dispositif expérimental et prélèvements foliaires**

Le dispositif expérimental est constitué de 60 placettes de 16 m<sup>2</sup> (4m × 4m), installées à l'aide de cordeau dans les parcelles des paysans. Des prélèvements de feuilles de stade D ont été réalisés à la floraison. Dix (10) feuilles au stade D ont été prélevées par placette et respectivement sur les 5<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup>, 20<sup>ème</sup>, 25<sup>ème</sup>, 30<sup>ème</sup>, 35<sup>ème</sup>, 40<sup>ème</sup>, 45<sup>ème</sup> et le 50<sup>ème</sup> plants à partir de la ligne de l'extrême gauche.

Le tiers (1/3) inférieur de chaque feuille D a été échantillonné (Siebeneichler *et al.*, 2002), séché à l'étuve à 65°C jusqu'à obtention de poids sec constant.

## **Prélèvement des échantillons de sols**

Des échantillons composites de sol ont été prélevés à l'aide de la tarière hollandaise dans les 20 premiers centimètres. Cinq échantillons composites de sol ont été constitués à partir de 10 échantillons mélangés dans chacun des arrondissements de Sékou, Ahouannonzoun et Avakpa. Deux échantillons composites ont été constitués à Allada en raison du plus grand nombre de producteurs d'ananas dans cette commune. Les caractéristiques de ces échantillons de sols prélevés sous culture de "Pain de sucre" sont présentés dans le tableau I. La texture des sols est limono-sableuse à sablo-limoneuse avec des taux de sable et limon, variables respectivement entre 78,9 et 84,8 pour le sable et 4,2 et 6,8 pour le limon. La teneur en azote varie de 0,07 à 0,08 % avec un pH acide (6,1) à faiblement acide (6,5) est moyenne à bonne. Le rapport carbone/azote varie de 10 à 10,3. Le taux de matière organique (1,31-1,43%) est faible. La teneur en potassium (0,03 à 0,14 méq/100g) est faible. La teneur en phosphore assimilable selon Bray 1, critique (4 ppm) à Sékou et à Ahouannonzoun est bonne dans les autres localités (10 ppm). Les sols sont pauvres en Ca et Mg échangeables (1,8 à 3 méq/100g). La somme des bases et la CEC sont faibles (3,06 à 5,29 méq/100g).

## **Analyses des échantillons de sols et de végétaux au laboratoire**

L'azote a été déterminé par la méthode KJELDAHL. Le calcium et le magnésium ont été dosés par titration à l'EDTA, le zinc par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (AAS) et le soufre par



précipitation au sulfate de baryum ( $\text{BaSO}_4$ ). La lecture du potassium est faite au photomètre à flamme et celle du phosphore à la spectrophotométrie 1100.

Les fruits ont été manuellement récoltés dans chaque placette et leur poids frais avec couronne a été pris à l'aide d'une balance de portée maximale 10 kg, le jour de la récolte. Le rendement fruit a été ensuite estimé.

### **Méthodologie du système intégré de Diagnostic et de Recommandation (DRIS)**

La population de rendement (fruit avec couronne) a été séparée en sous-populations des rendements élevés (rendement  $> 65,7 \text{ t.ha}^{-1}$ ,  $n = 18$ ) et rendements faibles (rendements  $< 65,7 \text{ t.ha}^{-1}$ ;  $n = 42$ ).

Les rapports entre les nutriments deux à deux et leurs inverses sont calculés pour chacune des sous-populations, par exemple N/P et P/N. Pour chaque rapport, la variance dans les deux sous-groupes a été calculée. Les ratios de variances des deux formes de rapport de nutriments sont calculés en divisant la variance du ratio de la population de rendement faible par celle de la population de rendement élevé pour la même forme de rapport (Elwali *et al.*, 1985; Amundson, 1987; Payne *et al.*, 1990). Pour chaque paire de ratio, celui qui donne la plus grande variance de rapport de variance est retenu pour l'évaluation des normes DRIS.

Les moyennes et l'écart-type des paramètres de référence du sous-groupe de rendements élevés sont utilisés dans la formule ci-dessous pour calibrer le modèle (Hallmark, 1987; Rathfon et Burger, 1991; Bailey *et al.*, 1997).

$$X_{\text{indice}} = [f(X/A) + f(X/B) + \dots f(M/X) - f(N/X) - \dots] \text{ Où}$$

$$f(X/A) = 100[(X/A)/(x/a) - 1]/CV$$

$$\text{Si } (X/A) > (x/a) + SD$$

$$f(X/A) = 100[1 - (X/A)/(x/a)]/CV$$

$$\text{Si } (X/A) < (x/a) - SD$$

$X/A$  est le ratio des concentrations des nutriments X et A dans

l'échantillon,  $\bar{x}/a$ ,  $CV$  et  $SD$ , sont respectivement la moyenne, le coefficient de variation, et l'erreur standard du paramètre  $X/A$  dans la sous-population de rendement élevé. Les autres ratios de nutriments  $X/B$ ,  $M/X$ ,  $N/X$  ...etc. sont calibrés par rapport aux paramètres,  $x/b$ ,  $m/x$ ,  $n/x$ , de référence du DRIS correspondant.

### Interprétation des indices de nutriments

Selon Kelling *et al.* (1986), un indice de nutriment entre -15 et 15 indique un bon équilibre nutritionnel, entre -15 et -25 une probable déficience et inférieur à -25, une déficience du nutriment. Wadt (1996) propose une méthode d'interprétation qui a l'avantage de détecter même les excès de nutriments. Il compare l'indice du nutriment ou de sa valeur absolue à l'indice d'équilibre nutritionnel (NBI). L'indice d'équilibre nutritionnel est la moyenne de la distance à zéro de tous les indices de nutriments. Soit pour N indices, on a

$$NBI_a = (| \text{Index A} | + | \text{Index B} | + \dots + | \text{Index N} |) / N.$$

Selon cet auteur, pour un nutriment Nut, on pourrait faire les conclusions suivantes :

- 1 Déficience =  $I_{Nut.} < 0$  et  $|I_{Nut.}| > NBI_a$
- 2 Adéquat =  $|I_{Nut.}| < NBI_a$
- 3 Excès =  $I_{Nut.} > 0$  et  $|I_{Nut.}| > NBI_a$

### Analyses statistiques

Le test de normalité de Ryan -Joiner des deux populations de rendement de "Pain de sucre" a été fait avec le logiciel Minitab 14. Les tests de comparaison de moyenne et de variance des concentrations des différents nutriments ont été effectués au seuil de 5% avec le logiciel Statistix8.1. Les teneurs des nutriments ont été comparées aux normes établies par Dalldorf et Langenegger (1978) et Jones *et al.* (1991). Les indices de nutriments ont été générés par le logiciel Minitab et interprétés selon Kelling *et al.* (1986) et Wadt (1996).



## Résultats et discussion

### Bilan nutritionnel par la Méthode de la Valeur Critique

Le tableau 2 présente les teneurs en nutriments dans les tiers inférieurs des feuilles D récoltées dans les plantations d'ananas "Pain de sucre". La population de rendement (fruit avec couronne) a été séparée en sous-populations des rendements élevés (rendement  $> 65,7 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) et rendements faibles (rendements  $< 65,7 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$ ). Les rendements varient de 66,7 à 93,7  $\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$  dans la sous-population de rendements élevés. Ils sont compris entre 30,2 à 65,6  $\text{t} \cdot \text{ha}^{-1}$  dans celle de rendements faibles.

Les teneurs moyennes en N, K, Ca, Mg, Zn et S ne sont pas significativement différentes dans les deux sous-populations. Une différence significative à 5 % a été observée pour le P.

Jones *et al.* (1991) ont établi des normes de nutriments en utilisant des échantillons foliaires d'*Ananas comosus* privés de leur base chlorophyllienne tandis que Dalldorf et Langenegger (1978) ont utilisé des feuilles D entières dans leur étude. Cependant, selon Py et Tisseau (1965), quelque soit le type d'échantillon, prélevé au tiers médian de la partie non chlorophyllienne ou au niveau de la feuille entière, la feuille D, la seule facilement repérable est celle qui est la plus représentative qui rend compte avec fidélité et sensibilité de l'état nutritionnel de la plante. C'est pour cette raison que les feuilles D ont été prélevées pour le présent diagnostic. Les teneurs en N, K et Zn dans la variété "Pain de sucre", sont inférieures aux normes proposées par Jones *et al.* (1991) pour les deux sous-populations. Les teneurs en N et K comparées aux normes de Dalldorf et Langenegger (1978) sont inférieurs aux valeurs critiques alors que la teneur en Zn est satisfaisante pour les deux sous-populations. Il ressort des normes établies par ces auteurs que les feuilles présentent des teneurs faibles en N et K. Par contre, les niveaux de Ca et Mg sont satisfaisants dans les deux sous-populations de rendement. La teneur en P est élevée dans les deux sous-populations, donc P est en excès.

Tableau 1. Moyenne, coefficient de variation (CV) et variance (VAR) des nutriments des feuilles D d'ananas "Pain de sucre" dans les deux sous-populations de rendement (faible et élevé) et les valeurs critiques de nutriments

Rendement [t ha <sup>-1</sup> ]	Sous population de rendements faibles [n=42]				Sous population de rendements élevés [n=18]				Ratio VAR	Normes	Normes
	Mean	SD	CV	VAR	Mean	SD	CV	VAR		selon Jones et al. (1991)	selon Dalidoef et al. (1978)
	54,6	9,2	16,9	84,8	79,3	9,0	11,3	79,3	1,07	-	-
Nutriments [g kg <sup>-1</sup> ]											
N	6,7	0,2	32,5	0,0	5,9	0,2	35,4	0,6	0,08	15-17	15 à 17
P	1,9	0,1	54,5	0,0	2,6**	0,1	46,3	0,3	0,04	<1	+1
K	8,7	0,5	54,5	0,2	11,0	0,6	51,1	1,1	0,20	22-30	22-30
Ca	8,7	0,2	20,3	0,0	8,7	0,1	15,9	0,9	0,04	8-12	8 à 12
Mg	3,4	0,1	27,1	0,0	3,6	0,1	27,5	0,4	0,02	<3	+3
S	0,6	0,0	54,6	0,0	0,6	0,0	27,0	0,1	0,02	-	-
Nutriments [mg kg <sup>-1</sup> ]											
Zn	11,6	10,6	91,3	113,0	11,2	5,1	45,7	11,2	10,07	>20	+10

\*\* significatif à 5%

## Bilan nutritionnel de la culture d'ananas par le Système Intégré de Diagnostic et de Recommandation (DRIS)

### Sélection des normes DRIS

La moyenne, le coefficient de variation, la variance des ratios de tous les nutriments des sous-populations de rendements faibles ( $S^2_f$ ) et élevés ( $S^2_e$ ) sont présentés par le tableau 2. Presque tous les ratios de nutriments sélectionnés comme normes DRIS ne présentent aucune différence significative entre les moyennes dans les deux sous-populations de rendements. Seulement 4 sur 21 (N/P, N/K Ca/P, Ca/K) des normes DRIS présentent de différence significative entre les moyennes dans les deux sous-groupes de rendements.

Au total, 13 sur 21 ratios sélectionnés comme normes DRIS ont une



variance de ratio supérieure à 2. Onze (11) sur vingt un (21) ratios sélectionnés comme normes DRIS incluant le Ca/N, N/S, N/Zn, P/S, P/Zn, Ca/K, K/Zn, Ca/S, Ca/Zn, Mg/S, et Mg/Zn présentent des coefficients de variation faibles par rapport à celui de leur forme analogue. La plupart des variances sont significativement différentes dans les deux sous-populations.

La sélection des formes de ratios utilisés pour les normes DRIS (c-à-d N/P ou P/N) a été effectuée en considérant le rapport de variance  $S^2_f/S^2_e$  de la population de rendements faibles à la population de rendements élevés pour les deux formes de ratios (Hartz *et al.*, 1998). Plus grand est le rapport de variance entre les sous-populations de rendements faibles et élevés, plus importants sont les nutriments dans ce rapport pour obtenir un rendement élevé (Payne *et al.*, 1990). Cependant, Beaufils (1973) suggère que toutes les formes de ratios qui révèlent une différence significative de ratio de variance entre les deux sous-populations peuvent être utilisées comme des normes DRIS. D'autres recherches ont préconisé par contre le ratio de nutriment qui maximise la variance entre les deux sous-populations (Payne *et al.*, 1990). L'objectif de cette sélection de ratio est d'avoir une plus grande précision (Caldwell *et al.*, 1994).

Tableau 2. Moyenne (Moy.), coefficient de variation (CV), variance (VAR) des pairs de ratio de nutriments des sous - populations des rendements (faibles et élevés) de la variété "Pain de sucre", ratio de variance et forme de ratio choisie. ET (Ecart type)

	Sous population de rendements faibles [n=42]				Sous population de rendements élevés [n=18]					
	Moy	ET	CV	VA	Moy	ET	CV	VAR		
N/P	4,6	2,8	61,0	7,7	2,7	1,4	51,9	2,7	2,86	X
P/N	0,3	0,2	56,3	0,0	0,5	0,2	47,4	0,5	0,06	
N/K	1,0	0,7	70,0	0,5	0,6	0,3	44,5	0,6	0,82	X
K/N	1,3	0,7	49,8	0,5	1,9	0,9	44,3	1,9	0,23	
N/Ca	0,8	0,2	29,0	0,1	0,7	0,2	30,4	0,7	0,07	
Ca/N	1,4	0,4	30,3	0,2	1,6	0,5	30,0	1,6	0,11	X
N/Mg	2,0	0,7	33,6	0,5	1,7	0,6	37,9	1,7	0,27	X
Mg/N	0,6	0,2	30,7	0,0	0,7	0,2	30,4	0,7	0,04	
N/S	20,2	27,9	138,	780	9,6	3,2	32,7	9,6	80,94	X
S/N	0,1	0,1	55,5	0,0	0,1	0,0	40,3	0,1	0,03	
N/Zn	796,8	538,3	67,6	289	595,4	264,0	44,3	595,4	486,73	X
Zn/N	0,0	0,0	111,	0,0	0,0	0,0	53,4	0,0	0,00	

Tableau 2 (suite) . Moyenne (Moy.), coefficient de variation (CV), variance (VAR) des paires de ratio de nutriments des sous - populations des rendements (faibles et élevés) de la variété "Pain de sucre", ratio de variance et forme de ratio choisie. ET (Écart type)

	Sous population de rendements faibles [n=42]				Sous population de rendements élevés [n=18]					
	Moy.	ET	CV	VA	Moy.	ET	CV	VAR		
P/K	0,3	0,2	85,8	0,1	0,3	0,1	54,4	0,3	0,20	
K/P	5,5	2,8	51,4	7,9	5,0	2,8	56,7	5,0	1,59	X
P/Ca	0,2	0,1	53,6	0,0	0,3	0,1	49,3	0,3	0,04	
Ca/P	6,2	3,9	61,8	14,	4,3	2,5	59,0	4,3	3,47	X
P/Mg	0,6	0,3	61,7	0,1	0,7	0,4	49,3	0,7	0,16	
Mg/P	2,4	1,4	56,8	1,9	1,7	1,0	59,4	1,7	1,08	X
P/S	7,4	10,5	141,	111,	3,9	0,4	10,1	3,9	28,28	X
S/P	0,1	0,2	236,	0,0	0,0	0,1	231,1	0,0	0,54	
P/Zn	207,3	131,6	63,5	173	250,4	114,4	45,7	250,4	69,21	X
Zn/P	0,0	0,0	157,	0,0	0,0	0,0	72,3	0,0	0,04	
K/Ca	1,0	0,6	54,1	0,3	1,3	0,7	53,2	1,3	0,24	
Ca/K	1,5	1,2	84,1	1,5	0,9	0,4	38,6	0,9	1,58	X
K/Mg	2,6	1,3	49,7	1,6	3,1	1,4	44,6	3,1	0,51	X
Mg/K	0,5	0,4	68,1	0,1	0,4	0,2	42,9	0,4	0,34	
K/S	26,8	29,7	110,	885	14,3	8,4	59,0	14,3	61,91	X
S/K	0,1	0,1	84,8	0,0	0,1	0,0	45,2	0,1	0,06	
K/Zn	987,5	640,9	64,9	410	1101,2	626,5	56,9	1101,2	372,97	X
Zn/K	0,0	0,0	121,	0,0	0,0	0,0	64,2	0,0	0,00	
Ca/Mg	2,7	0,8	28,9	0,6	2,6	0,9	33,1	2,6	0,23	X
Mg/Ca	0,4	0,1	25,7	0,0	0,4	0,1	23,3	0,4	0,03	
Ca/S	26,4	30,7	116,	942	15,7	3,8	24,3	15,7	59,88	X
S/Ca	0,0	0,0	224,	0,0	0,0	0,0	234,7	0,0	0,10	
Ca/Zn	1021,3	516,4	50,6	266	893,4	335,0	37,5	893,4	298,46	X
Zn/Ca	0,0	0,0	88,2	0,0	0,0	0,0	46,6	0,0	0,00	
Mg/S	8,4	6,8	80,5	45,	5,0	0,9	18,8	5,0	9,17	X
S/Mg	0,0	0,1	218,	0,0	0,0	0,1	233,1	0,0	0,19	
Mg/Zn	410,0	248,1	60,5	615	361,9	140,4	38,8	361,9	170,03	X
Zn/Mg	0,0	0,0	84,8	0,0	0,0	0,0	44,0	0,0	0,00	
S/Zn	11,6	25,8	223,	668	12,1	28,1	231,3	12,1	55,01	X
Zn/S	0,0	0,0	108,	0,0	0,0	0,0	12,0	0,0	0,10	



La discrimination entre plants ayant un bon statut nutritionnel et plants nutritionnellement déséquilibrés est maximisée quand la variance de ratios de nutriments entre les deux sous-populations est maximisée (Walworth *et al.*, 1986). Très peu de normes présentent de différence significative entre les deux sous-populations. La même observation a été faite par Dagbenonbakin (2005) qui a trouvé en première et en deuxième année de culture du maïs respectivement 2 et 5 sur respectivement 21 et 28 normes DRIS dont les moyennes présentent une différence significative entre les deux sous-populations. Les moyennes des ratios sont parfois similaires dans les deux sous-populations (Beaufils et Sumner 1977). Une grande variabilité des ratios de nutriments entre les sous-populations traduit une différence de l'équilibre nutritionnel entre elles. Ceci justifie dans une certaine mesure la fiabilité des normes DRIS développées dans cette étude. En effet, les normes DRIS ayant un faible coefficient de variation et une valeur élevée de ratio de variance impliquent que l'équilibre entre les nutriments est important pour l'obtention de rendement élevé (Bailey *et al.*, 1997). De plus, les formes qui maximisent le ratio de variance entre les deux sous-populations de rendements et dont les coefficients de variation sont faibles indiquent qu'une petite variation autour de ces ratios engendrait des rendements élevés.

#### Indices de nutriments et statut nutritionnel

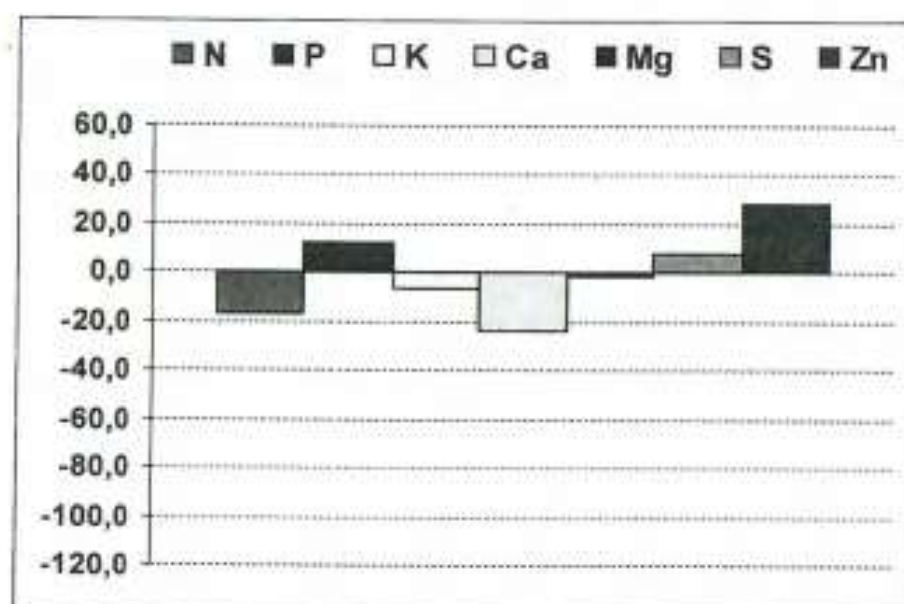


Figure 2. Indices DRIS pour "Pain de sucre" dans la commune d'Allada



La figure 2 présente les indices de nutriments de l'ananas variété "Pain de sucre". Ces indices DRIS ont été générés à partir des normes DRIS. Plus la valeur de l'indice d'un nutriment est négative, plus limitant est l'élément. L'équilibre d'un élément nutritif avec les autres éléments est meilleur lorsque la valeur de l'indice du nutriment tend vers zéro. Le Mg est le seul élément apparemment en équilibre avec les autres éléments. Selon Kelling *et al.* (1986), les indices de N et de Ca situés entre -15 et -25, indiquent une probable déficience des plants en ces éléments. Par contre les indices de P, S, Mg et K peuvent être rangés entre -15 et +15, ce qui indique un bon équilibre de ces éléments nutritifs. Ces résultats sont conformes à l'interprétation des indices de nutriments selon Wadt (1996). Mais pour le Zn, l'analyse selon Wadt (1996) révèle un excès de l'élément, ce que l'interprétation de Kelling (1986) ne peut permettre d'appréhender.

En résumé, les concentrations en P, K, S, Mg sont satisfaisantes selon DRIS. Par contre le calcium et l'azote sont déficients et le zinc est en excès.

La déficience en N et le bon équilibre nutritionnel de S et Mg établis par DRIS sont conformes aux résultats obtenus par la CVM. Cependant, alors que le Ca est déficient et le P adéquat selon DRIS, une bonne teneur en Ca et un excès en P ont été observées par la CVM. La quantité de calcium qu'apporte indirectement l'hormonage au carbure de calcium dilué à froid serait insuffisante pour satisfaire les besoins de la plante. Ceci est pareil pour le K qui présente un bon équilibre, le Zn étant en excès selon DRIS mais tous deux déficients selon la CVM.

Toutes ces différences observées seraient dues au fait que la CVM ne tient pas compte de l'équilibre entre les éléments nutritifs mais tient compte seulement des nutriments isolément. Or la valeur critique d'un nutriment peut varier avec l'âge de la plante et avec les concentrations des autres nutriments (Tyner, 1946; Bailey *et al.*, 1997).

Si l'on devrait s'en tenir à ce que plus la valeur de l'indice d'un nutriment est négative, plus limitant est l'élément, on serait tenté de déceler une déficience ou du moins une déficience latente pour le Mg et le K. En effet, aucune quantité de Mg n'est apportée aux plantes par les engrais, la teneur satisfaisante diagnostiquée par DRIS et la CVM ne serait en réalité qu'une compensation des déficits de charges positives créée dans la plante par une déficience en K. Le même phénomène a été observé par Bailey *et al.* (1997) qui constate une accumulation du calcium et du magnésium dans les tissus des herbes d'une prairie dans les



conditions de déficience en potassium.

Par ailleurs, K est étroitement lié à N, les deux éléments étant importants pour la production de fruits. Il semblerait que si N est faible, K l'est également (Tran *et al.*, 1979). En accélérant la croissance de l'ananas, N augmente les besoins en K et en Mg principalement (Py et Tisseau, 1965). Il est donc clair que la déficience en azote pourrait influencer l'absorption du potassium et du magnésium. Il apparaît alors eu égard à tout ce qui précède qu'il existerait une déficience latente pour le potassium et le magnésium.

La déficience en N pourrait s'expliquer non seulement par les apports faibles d'urée, mais aussi par le fait que la plupart des producteurs, surtout les petits producteurs qui sont d'ailleurs majoritaires, sèment le maïs entre les interlignes ou sur les chemins des champs d'ananas. Or, les besoins du maïs en azote sont très élevés ; ce qui pourrait limiter la disponibilité de cet élément à la culture principale les 3 ou 4 mois de cycle du maïs.

Le phosphore dans la feuille est plutôt directement conditionné par la teneur en N dans la feuille. L'excès de P dans la feuille a comme effet compensatoire la déficience en N. Observant ce phénomène, dans le diagnostic foliaire de l'anacardier, Tran *et al.* (1979) affirment que P est un indicateur de la carence de N. L'excès de N dans la plante pourrait être aussi imputable à la faible mobilité du P dans le sol qui se lixivie lentement offrant toujours une disponibilité permanente quoique faible à la plante de puiser l'élément.

Six (6) sur les 13 ratios sélectionnés qui ont une variance de ratio supérieure à 2 contiennent le Zn. Dagbenonbakin (2005) suggère l'importance possible d'utiliser les normes DRIS des micronutriments qui maximisent le ratio de variance entre les sous-groupes des rendements faibles et élevés, car les besoins en micro-éléments ne sont pas facilement déterminés par les analyses de sol. Les normes contenant le Zn sont encore plus importantes car cet élément fait souvent défaut dans de nombreux sols (Py et Tisseau, 1965). Elles peuvent donc être utilisées dans le calibrage du taux de Zn dans les formules d'engrais à appliquer.

L'indice positif du Zn obtenu dans les conditions d'excès du phosphore est contraire aux observations de Navvabzdeh *et al.* (1993) ; en effet ces auteurs, en développant les normes DRIS de la pomme de terre sur sol calcaire en Iran, ont trouvé que la déficience en Zn est liée à des apports élevés de phosphore à la plante. Les fortes teneurs de cet élément dans la



lante étaient associées aux teneurs faibles du Zn. La même remarque a été faite par Malakouti (1992) sur le maïs qui associat la déficience du Zn en présence d'excès du phosphore à une forte saturation du sol en base, une teneur élevée en phosphore et à un pH élevé. Ce dernier élément paraît important pour justifier l'équilibre du Zn révélé par DRIS. En effet, Py et Tisseau (1965) trouvent que le contrôle du pH est le moyen le plus efficace pour éviter la dégradation des sols et assurer la nutrition optimale de la plante en oligo-éléments. Les pH obtenus sous "Pain de sucre" dans ces travaux se trouvent favorables à la culture de l'ananas selon Py et Tisseau (1965) et Dalldorf et Langenegger (1978); donc contribueraient à une bonne nutrition en oligo-éléments dont le Zn. De tout ce qui précède, le diagnostic établi sur "Pain de sucre" par DRIS a révélé que les teneurs, en P et en S sont adéquates tandis que le Zn est en excès. Par contre, les plants sont déficients en Ca et en N et on pourrait parler de déficience latente pour le K et le Mg.

#### **Comparaison des normes DRIS calculées avec les normes DRIS de Angeles *et al.* (1990)**

Les tests de conformité des normes DRIS retenues réalisés avec les trois normes DRIS (P/N, K/N, K/P) de Angeles *et al.* (1990) (tableau IV) au seuil de 5%, montrent que les normes sont différentes de celles obtenues dans la présente étude. Ces résultats sont contraires aux théories de DRIS qui indiquent que les variabilités de l'âge du tissu, à la position des feuilles et aux cultivars et qui faussent la précision des diagnostics peuvent être minimisées par l'utilisation du DRIS (Beaufils et sumner, 1977; Sumner 1979; Sumner et Beaufils, 1975; Hallmark *et al.* 1985). Dagbenonbakin (2005) développant des normes DRIS pour le maïs dans l'Ouémé Supérieur (République du Bénin) trouve des différences significatives entre la plupart de ces normes et celles établies antérieurement (Sumner 1977b, Elwali *et al.* 1985). Cet auteur a expliqué ce fait par les différences de conditions pédologique, climatique, variétale et la position de la feuille prélevée. Pourtant, Angeles *et al.* (1990) établissant des normes DRIS de N, P et K trouvent que les normes établies ne dépendent pas de la saison d'échantillonnage foliaire, la date de plantation, la portion de la feuille utilisée, la variété, le lieu de prélèvement, la position de la feuille échantillonnée sur la plante, ni du stade phénologique de la plante. Ces différences pourraient s'expliquer par la taille relativement faible de la population utilisée dans cette étude comparée à celle étudiée par Angeles *et al.* (1990), c'est-à-dire 60 versus



1185 échantillons.

Elwali et Gascho (1983; 1984) ayant utilisé une petite base de données (90 échantillons dans chacune des sous-populations de rendement) conclut que le calibrage local des normes DRIS est important pour accroître la fiabilité du diagnostic par DRIS.

Cette étude diagnostique de nutriments utilisant DRIS et la CVM révèle que l'approche DRIS basée sur l'équilibre des nutriments est la plus précise et efficiente. Dans ce contexte, les teneurs en P, Mg et S sont satisfaisantes. Le diagnostic de N, K, et Zn varie suivant les méthodes. Un apport supplémentaire de N, de Ca, de K et de Mg pourrait être envisagés pour une meilleure production.

Tableau 3. Normes DRIS de "Pain de sucre" et comparaison avec les normes de Angeles *et al.* (1990)

Ratios choisis	Normes "Pain de sucre"	Ratios de nutriments	Normes de nutriments selon Angeles <i>et al.</i> (1990)
N/P	2,7	P/N	0,18
N/K	0,6	K/N	2,3
Ca/N	1,6	-	-
N/Mg	1,7	-	-
N/S	9,6	-	-
N/Zn	595,4	-	-
K/P	5	K/P	13,9
Ca/P	4,3	-	-
Mg/P	1,7	-	-
P/S	3,9	-	-
P/Zn	250,4	-	-
Ca/K	0,9	-	-
K/Mg	3,1	-	-
K/S	14,3	-	-
K/Zn	1101,2	-	-
Ca/Mg	2,6	-	-
Ca/S	15,7	-	-
Ca/Zn	893,4	-	-
Mg/S	5	-	-
Mg/Zn	361,9	-	-
S/Zn	12,1	-	-

## Références bibliographiques

- Amundson, R. L. and Koehler F. E., 1987: Utilisation of DRIS for diagnosis of nutrient deficiencies in winter wheat. *Agronomy Journal* (79) 472-476.
- Angeles, D.E.; Sumner, M.E.; Barbour, N.W., 1990. Preliminary nitrogen, phosphorous, and potassium DRIS norms for pineapple. *HortScience* (25) 652-655.
- Bailey, J.S.; Beattie, J. A. M. and Kilpatrick, D. J., 1997. The diagnosis and recommendation integrated system (DRIS) for diagnosing the nutrient status of grassland swards: Model establishment. *Plant Soil* 197: 127-135.
- Beaufils, E. R. and Sumner M. E., 1977. Effect of time sampling on the diagnosis of the N, P, K, Ca and Mg requirement of sugarcane by the DRIS approach. *Proc. S. Afr. Sugar. Tech. Assoc.* 51: 62-67.
- Caldwell, J.O.; Sumner, M.E.; Vavrina, C.S., 1994: Development and testing of preliminary foliar DRIS norms for onions. *HortScience* 29: 1501-1504.
- Dagbenonbakin, G. D., 2005. *Productivity and water use efficiency of important crops in the Upper Oueme Catchment: influence of nutrient limitations, nutrient balances and soil fertility*. Ph-D Thesis, Bonn.
- Dalldorf D. B., Langenegger W., 1978. Macroelement fertilization of Smooth cayenne pineapples. Farming in South Africa. *Pineapple Ser.* E. 2.
- Elwali, A.M.O.; Gascho, G.J., 1983. Sugarcane response to P, K and DRIS corrective treatments on Florida Histosols. *Agronomy Journal* 75: 79-83.
- Elwali, A.M.O.; Gascho, G.J., 1984. Soil testing, foliar analysis, and DRIS as guide for sugarcane fertilization. *Agronomy Journal* 76: 466-470.
- Elwali, A.M.O; Gascho, G.J.; and Sumner, M.E., 1985. DRIS Norms for 11 nutrients in maize leaves. *Agronomy Journal* 77: 506-508.
- Hallmark, W. B.; Adams J. F. and Morris H. F., 1985: The use of plant analysis to diagnose nutrients limiting yield for the subsequent year. *J. Fert. Issues.* 2 (3): 66-73.
- Hallmark, W.B.; de Mooy C.J. and John Pesek., 1987. Comparison of two DRIS methods for diagnosing nutrients deficiencies. *J. Fert. Issues* 4 (4): 151-158.



- Hartz, T.K.; Miyao, E.M.; Valência, J.G., 1998. DRIS evaluation of the nutritional status of processing tomato. *HortScience*, 33: 830-832.
- INSAE, 2001. Données climatologiques, Bénin.
- INSAE, 2007. Données climatologiques, Bénin.
- Jones Benton J., Benjamin Wolf Jr., Harry A. Mills., 1991. a practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. *Plant Analysis Handbook...*
- Kelling, K. A., Shulte, E. E., 1986. Review DRIS as part of a routine plant analysis program. *J. Fert. Issues* 3(3): 107-112.
- Malakouti Mohammad J., 1992. Determination of the diagnostic norms for corn on the calcareous soils of Iran. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 23 (Issue 17-20): 2687-2695.
- Navvabzdeh, M.; Malakouti, M.J., 1993. Development of DRIS norms for potato in the calcareous soils of Iran. *Journal of Plant Nutrition* 16: 1409-1416.
- Ouinkoun G. et Lalèyè. P., 2004. *La traçabilité des produits agricoles: cas de l'ananas, quels enjeux pour le Bénin?* Acte 5 de l'Atelier Scientifique National du 14 au 17 décembre 2004 à Abomey-Calavi. p.190-201.
- Payne, G. G.; Rechcigl J. E. and Stephenson R. J., 1990. Development of diagnosis and recommendation integrated system norms for Bahiagrass. *Agronomy Journal* 82: 930-934.
- Py et Tisseau M. A., 1965. L'ananas. Techniques agricoles et productions tropicales. G. P. Moissonneuve et Larose.
- Rathfon, R.A.; Burger, J.A., 1991. Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) norms for Fraser Fir Christmas trees. *Forest Science*, 37: 998-1010.
- Siebeneichler, Susana Cristine, Monnerat, Pedro Henrique, Carvalho, Almy Junior Cordeiro De., 2002. Mineral composition of the leaf in pineapple: effect of the part of the analysed leaf. *Rev. Bras. Fruitic.* 24 (1) : 194-198.
- Sumner, M. E. and Beaufils, E. R., 1975. Diagnosis of the NPK requirements irrespective of plant age and season using Beaufils' system (DRIS) preliminary observation. *Proc. S. Afr. Sugar Tech. Assoc.* 49: 137-141.

- Sumner, M. E., 1977b. Use of the DRIS system in foliar diagnosis of crops at high yield levels. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 8: 251-268.
- Sumner, M. E., 1979. Interpretation of foliar analysis for diagnosis purposes. *Agronomy Journal* 71 : 343-348.
- Tran Vinh An, Berding F. Agossou V., et Boko Adrien., 1979 . Contribution à l'étude de la fertilité des sols et du diagnostic foliaire de l'anarcardier de la plantation de Logozohe. *Etude n°209. Projet d'Agro-Pédologie.*
- Tropagri, 1998 . Etude de la filière ananas au Bénin. Tome IV: pp. 1-10.
- Tropical, 1970. Tome 25, pp. 250-543.
- Tyner, E. H., 1946. The relation of maize yields to leaf nitrogen, phosphorous and potassium content. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 11: 317-323.
- Wadt, P.G.S., 1996. *Os métodos da chance matemática e do sistema integrado de diagnose e recomendação (DRIS) na avaliação nutricional de plantios de eucalipto*, Tese - Doutorado. Viçosa: UFV. 123p.
- Walworth, J. L.; and Sumner M. E., 1986. Foliar diagnosis- a review. *In Advances In Plant Nutrition* 3: 193-241.



## Caractéristiques épidémiologiques de l'association bursite infectieuse - colisepticémie chez les poulets de chair «broiler-6»

E. Y. Attakpa<sup>1</sup>, M. S. Hounzangbe-Adote<sup>2</sup>, B. P. Bessarabov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, BP 123 Parakou, Bénin. Tel. 0022997680635, E-mail : [attakpavae@yahoo.fr](mailto:attakpavae@yahoo.fr).

<sup>2</sup>Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, (FSA/UAC) 01 BP 526 Cotonou, Bénin.

<sup>3</sup>Académie d'Etat de Médecine Vétérinaire et de Biotechnologie de Moscou, Russie

### Abstract

The epidemiology of infectious bursal disease associated to the colisepticaemia at chickens of flesh "Broiler-6" has been studied on a strip of 23350 chicks in the Luch poultry farm (suburb of Moscow, Russia) at the time of an infectious bursal disease epizooty. The diagnosis was made mainly based on epidemiological data, clinical signs, autopsy results, detection and measurement of antiviral antibodies and on isolation and identification of the bacterium *Escherichia coli* in the pathological materials of chickens died or sacrificed for colisepticaemia. Results showed that 41.8 % of autopsied chicks had lesions characteristic of infectious bursal disease only whereas 58.2 % showed lesions of both diseases. Infectious bursal disease raged in its most severe form of chicks already 4 days old and has fostered the development of colisepticaemia. An average of 34 colonies of *E. coli* were isolated of the heart, 28 colonies of the spleen, 17 colonies of the liver, 8 colonies of the bony marrow, 9 colonies of the vitellin and 11 colonies of the yolk of the egg shell. This demonstrated the systemic nature of the colisepticaemia. The serological typology of these enteric brief revealed the presence of three highly pathogenic serotypes of *E. coli*: O2, O78 and O111 with respective prevalence rates of 57.0 %, 35 % and 8 %. The combination of the two diseases caused more death therefore economic loss in the poultry husbandry. The optimum age for vaccination of chickens against infectious bursal disease determined by the level of maternal antibodies was 14-16 days with the vaccine virus «Winterfield® 2512». In conclusion prophylactic measures often deserve to be better redefined because of potential interactions between some bacterial and viral diseases.

Key words: Gumboro disease, *Escherichia coli*, broiler, colisepticaemia, Moscow.



## Résumé

L'épidémiologie de la bursite infectieuse associée à la colisepticémie chez les poulets de chair «Broiler-6» a été étudiée sur une bande de 23350 poussins à la ferme avicole Luch (banlieue de Moscou, Russie) lors d'une épizootie de bursite infectieuse. Le diagnostic a été posé sur la base des données épidémiologiques, des signes cliniques, des résultats d'autopsie, du dosage des anticorps antiviraux et par l'isolement et l'identification de *Escherichia coli* dans les matériels pathologiques des poulets morts ou sacrifiés. Les résultats ont montré que 41,8 % des poussins autopsiés ont présenté les lésions caractéristiques de la bursite infectieuse seule alors que 58,2 % d'entre eux ont présenté les lésions des deux maladies à la fois. La bursite infectieuse a sévi sous sa forme la plus sévère déjà chez des poussins âgés de 4 jours et a favorisé le développement de la colisepticémie. En moyenne 34 colonies de *E. coli* ont été isolées du cœur, 28 colonies de la rate, 17 colonies du foie, 8 colonies de la moelle osseuse, 9 colonies du vitellus et 11 colonies de la coquille d'œuf. Ce qui a démontré le caractère systémique de la colisepticémie. Le typage sérologique succinct de ces entéropathogènes a révélé la présence de trois sérotypes hautement pathogènes de *E. coli* : O2, O78 et O111 avec des taux de prévalence respectifs de 57,0 %, 35 % et 8 %. L'association des deux pathologies a causé plus de mortalité donc de perte économique en aviculture. L'âge optimal de vaccination des poussins contre la bursite infectieuse déterminé en fonction du niveau des anticorps maternels était de 14-16 jours avec le virus vaccin «Winterfield® 2512». En conclusion, les mesures prophylactiques méritent souvent d'être mieux redéfinies en raison des interactions potentielles entre certaines maladies virales et bactériennes.

Mots clés: Maladie de Gumboro, *Escherichia coli*, poulet de chair, colisepticémie, Moscou.

## Introduction

La bursite infectieuse (maladie de Gumboro) est une maladie très contagieuse des gallinacés et surtout des poulets, due à un virus de la famille des Birnaviridae qui se localise et se réplique dans la bourse de Fabricius (Becht, 1977 ; Vindevogel, 1992). Ce virus détruit le tissu lymphoïde de la glande réduisant ainsi la synthèse par cette dernière des immunoglobulines A(IgA) qui protègent la volaille contre divers agents pathogènes viraux et bactériens (Rosenberger, 1981; Montiel, 2000; Kariyawasam *et al.*, 2002).



La bursite infectieuse n'est pas une maladie spécifique à certaines régions du monde ou à des types d'élevage puisqu'on la retrouve sur tous les continents aussi bien dans les élevages traditionnels que modernes (Hastenreiter, 1977 ; Cardinale *et al.*, 1998). Selon Dossa *et al.* (2005), la prévalence de la maladie de Gumboro dans les élevages traditionnels au Bénin est de 84,72 % contre 47 % au Niger (Courtecuisse *et al.*, 1990). Elle est de 26 % chez les poulets de chair et de 7 % chez les poulettes en élevage semi-industriel au Sénégal (Cardinale *et al.*, 1998)

L'immunodéficience due à l'attaque des lymphocytes B de la bourse de Fabricius par le virus de la bursite infectieuse crée le risque d'apparition dans l'élevage d'infections secondaires telles que la salmonellose, la coccidiose et surtout la colisepticémie (Wyeth 1975; Igbokwe et Salako, 1996; Cardinale *et al.*, 1998).

La colisepticémie est considérée comme l'une des principales causes de pertes économiques dans l'industrie avicole mondiale (Zanella *et al.*, 2000). Elle est causée par les sérotypes pathogènes de la bactérie *Escherichia coli*, un agent de surinfection par excellence (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Stordeur et Mainil, 2002; Giovanardi *et al.*, 2005; Guérin et Boissieu, 2008). Elle est caractérisée par une morbidité, une mortalité (subite) variables et des lésions non exsudatives telles que la péricardite, la périhépatite, l'aérosaculite, la pneumonie l'infection du sac vitellin, l'ostéomyélite (Guérin et Boissieu, 2008). Les risques d'apparition de cette infection secondaire augmentent potentiellement avec la bursite infectieuse (Ibrahimov, 1983). Certains auteurs ont montré que la monoinfection de *E. coli* a engendré une mortalité de 40% chez les poussins de 7 jours alors que l'association bursite infectieuse.-colisepticémie a engendré une mortalité de 90 % dans les conditions expérimentales (Nakamura *et al.*, 1990 ; Lagoutkine, 1995)

Cependant les caractéristiques épidémiologiques de cette association bursite infectieuse-colisepticémie ne sont pas encore assez connues (Bessarabov, 1998).

L'objectif de l'étude a été d'analyser les particularités épidémiologiques de la bursite infectieuse associée à la colisepticémie et de déterminer l'âge optimal de vaccination des poulets de chair, comme point de départ d'une prophylaxie des deux pathologies mises en cause.



## **Matériel et méthodes**

### **Milieu d'étude**

Cette étude a été réalisée à la ferme «Luch» de poulet de chair de Voskresensk, située à 45 km au Sud Est de Moscou (55°65' latitude Nord et 37°75' longitude Est). C'est une ferme avicole d'une capacité de 160.000 poulets. Le climat de type continental de la zone est dû à la latitude et surtout à l'éloignement de l'océan et à la disposition du relief. L'hiver est très rigoureux et long (de novembre à mars), l'été est chaud et de courte durée (juin à août). Les saisons intermédiaires (printemps et automne) sont réduites. Les moyennes annuelles des températures minimales et maximales sont respectivement de -15°C et + 25°C.

Les précipitations sont réparties sur toute l'année. La pluviométrie mensuelle moyenne est de 62 mm avec un maximum en mars (88 mm) et un minimum en juillet (36 mm) (Wikipédia, 2010). Les travaux de laboratoire ont été réalisés dans le laboratoire du département d'aviculture et de pathologies aviaires de l'Académie de Médecine Vétérinaire et de Biotechnologie, et au laboratoire vétérinaire de bactériologie de Moscou.

### **Matériel animal**

L'étude prospective a porté sur une bande de 23350 poussins du cross «Broiler-6» issu du croisement de quatre lignées de base. Les hybrides obtenus ont un poids corporel vif de 1,7 à 1,6 kg en 7 semaines avec un indice de consommation de 2,63 kg. Le cross est autosexable, et les poussins sont de couleur blanche (Ficinine et Tardatiane, 1985).

### **Suivi sanitaire**

Dans la ferme d'élevage Luch les mesures de prophylaxies sanitaire et médicale ont été utilisées. La prophylaxie sanitaire était basée sur la désinfection des locaux, des matériels d'élevage, le vide sanitaire après chaque bande, la dératisation, la désinsectisation, l'installation de pédiluves à l'entrée de la ferme et dans chaque poulailler, et le contrôle de la qualité des aliments pour volaille. La prophylaxie médicale consistait en la vaccination des poussins contre la bursite infectieuse et la maladie de Marek à l'âge de 1 jour sans tenir compte du niveau d'anticorps maternels avec une revaccination contre Gumboro à 30 jours



d'âge. La vaccination contre la maladie de Newcastle se faisait entre 15-20 jours avec le vaccin Lassota puis une revaccination à 45-50 jours d'âge. Des traitements anticoccidiens, antibactériens et antiparasitaires internes étaient organisés.

### **Méthodes de diagnostic de la bursite infectieuse**

Le diagnostic de la bursite infectieuse a été posé par une approche holistique incluant des données épidémiologiques, des signes cliniques, des lésions caractéristiques dans la bourse de Fabricius sur les oiseaux morts dans une bande de 23350 poulets de chair lors d'une épizootie de bursite infectieuse. L'indice de la bourse (IB) de Fabricius qui traduit l'état du développement physiologique de la bourse des poulets a été utilisé pour diagnostiquer la bursite infectieuse. L'IB a été déterminé aux âges de 5, 15, 25 et 30 j sur un échantillon de 10 poulets par tranche d'âge choisis au hasard parmi ceux présentant des lésions caractéristiques dans leur bourse, soit un total de 40 poussins de chair. L'IB est calculé par la formule mathématique de Glick (1956) et s'interprète en fonction de l'âge, sa valeur étant comprise entre 0 et 1.

$$IB = \frac{\text{Poids de la bourse (mg)}}{\text{Poids du poulet (g)}} \times 1000, \text{ où (IB est le poids relatif de la bourse de Fabricius)}$$

### **Méthodes de diagnostic de la colisepticémie**

Le diagnostic de la colisepticémie a été posé sur la même bande de poulets par des examens cliniques, des autopsies et analyses bactériologiques complètes réalisées en trois étapes (autopsies et prélèvement d'organes lésionnels, isolement et identification des sérotypes de *E. coli* et différenciation des souches de *E. coli* des autres Entérobactéries) selon Kassouk et Papov (1991). L'isolement des colonies de *E. coli* a été effectué à partir de prélèvements faits sur le cœur, le foie, la rate et la moelle osseuse de 8 cadavres de poulets présentant des lésions caractéristiques de la colisepticémie, de 8 coquilles d'œuf et 8 vitellus d'embryons issus de l'écloserie. Les sérums polyvalents des groupes 1, 2, 3, 4 et monovalents O correspondants de *E.*

*coli* dans la réaction d'agglutination sur lame ont été utilisés pour l'identification des sérotypes de *E. coli*. Les Enterotests 1 et 2 ont été utilisés pour différencier les colonies de *E. coli* des autres Entérobactéries.

La pathogénicité des colonies de *E. coli* isolées est testée sur trois souris blanches de laboratoire d'un poids corporel de 18 g chacune. A chaque souris fut inoculé 0,3 cm<sup>3</sup> d'une suspension de cultures microbiennes dans le péritoine.

Détermination de l'âge optimal de vaccination contre la bursite infectieuse.

La détermination de l'âge de la vaccination contre la bursite infectieuse a reposé sur l'étude de la dynamique des anticorps maternels qui a consisté à déterminer la baisse de ces anticorps dans la période post natale chez les poussins. Cette dynamique des anticorps maternels a été étudiée à partir du sang prélevé de la veine alaire de 30 poussins aux âges de 5, 11 et 16 j. Ces poussins ont été réceptionnés directement de l'incubateur à l'âge d'un jour et maintenus dans les conditions de laboratoire jusqu'aux âges de prélèvement susmentionnés. Après la coagulation à la température ambiante, le sérum sanguin extrait a été conservé à la température de -20 °C, et par la suite, analysé à l'aide de la technique ELISA (Kit Biotek -Hollandais) à la dilution de 1/500. L'âge à la première vaccination correspond à l'âge où la concentration des anticorps maternels est  $\leq 1:1000$ , suivant les instructions du fabricant du Kit.

### **Analyses statistiques**

Le poids vif des poulets, le poids des bourses de Fabricius, l'indice de la bourse de Fabricius et les taux de mortalités ont été soumis à l'analyse descriptive à l'aide du logiciel SAS (1990). Le nombre de colonies de *E. coli* déterminé dans les matériels pathologiques a subi l'analyse de la variance à un critère de classification (organe de localisation). La structuration des moyennes a été effectuée avec le test de Newman et Keuls (SAS, 1990). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type.



## Résultats

### Situation épidémiologique de la ferme

#### Signes cliniques et lésions observés

Les signes cliniques observés chez les poussins malades, lors de l'épizootie de la bursite infectieuse sur une bande de 23350 poussins ont été l'apathie, l'anorexie, la réaction lente aux existants extérieurs, la soif vive, la diarrhée et les troubles nerveux. Les poussins malades avaient une matière fécale liquide et de couleur jaune, un signe pathognomonique de la bursite infectieuse. Ils présentaient un état flegmatique, dépressif et une prostration profonde jusqu'à ce que la mort s'en suive avec des plumes ébouriffées et sales.

L'autopsie de 141 poussins morts ou sacrifiés a révélé une diathèse hémorragique des organes internes, de la peau et un dépôt de fibrines sur les membranes séreuses du cœur et du foie. Les muqueuses de l'intestin grêle et du gros intestin étaient hyperémiées. Chez 50 poussins de 4 jours d'âge, il a été remarqué des pétéchies dans le rectum et dans la bourse de Fabricius. Les reins étaient œdémateux, de couleur cendre et les tubes urinaires remplis d'urates. La rate a été légèrement hypertrophiée. La bourse de Fabricius était hypertrophiée, œdémateuse et hémorragique avec dépôt de fibrine et de sang dans sa cavité. Par contre, l'atrophie de la bourse a été notée chez des poussins âgés de 25 à 30 jours.

Distribution de mortalité, des poids vif corporel et de la bourse de Fabricius.

La tendance des mortalités suite aux infections mixtes (figure 1) a montré que les mortalités étaient élevées du 3<sup>ème</sup> au 6<sup>ème</sup> jour. La courbe de mortalité obtenue a montré que la maladie a duré 3-4 jours, (c'est-à-dire du 3<sup>ème</sup> au 6<sup>ème</sup> jour d'âge des poussins), avec un pic de mortalité au 6<sup>ème</sup> jour de vie des poussins suivi d'une baisse brutale de la mortalité.

Caractéristiques épidémiologiques de l'association bursite infectieuse - colisepticémie chez les poulets de chair «broiler-6»

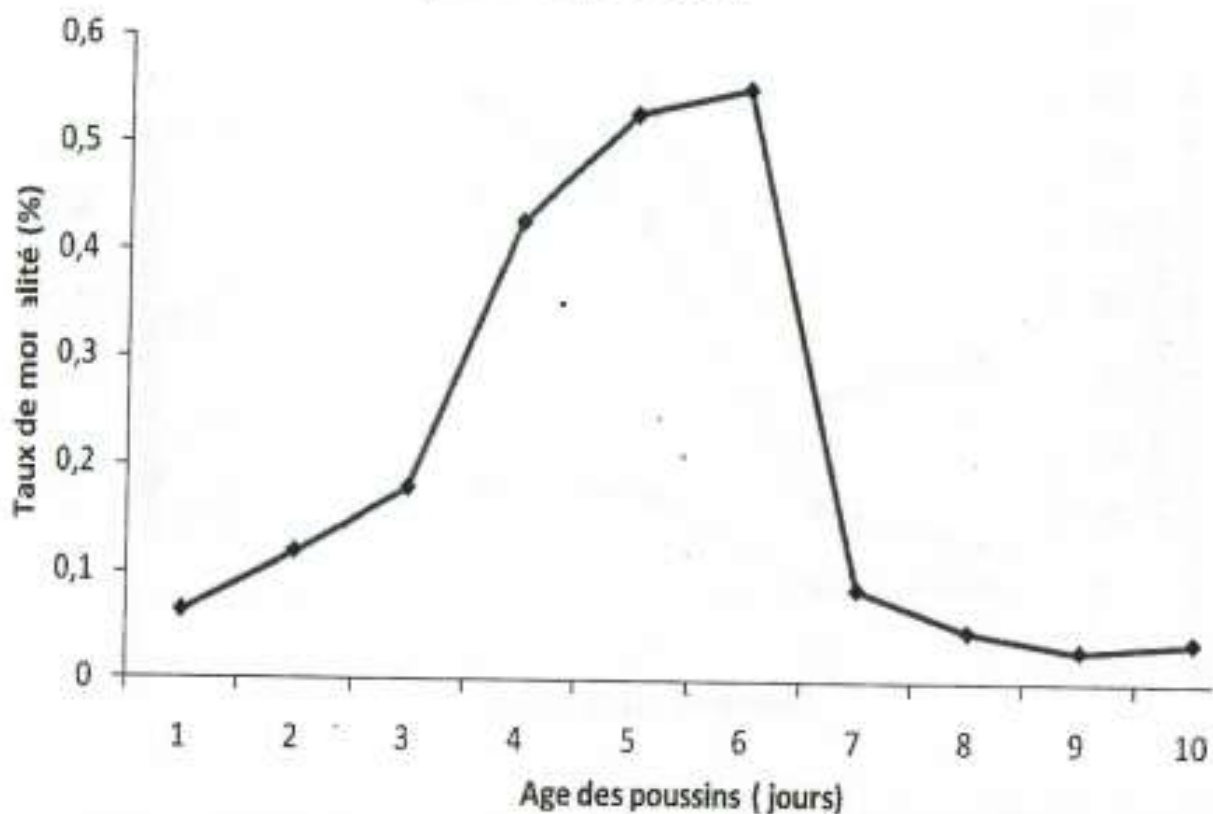


Figure 1. Evolution de la mortalité des poussins due à la bursite infectieuse

La figure 2 illustre la dynamique de développement de la bourse de Fabricius. De façon globale, le poids moyen des poulets (D1) et celui de la glande (D2) ont connu un accroissement. Par contre, l'indice de la bourse de Fabricius (D3) a chuté au 15<sup>ème</sup> jour et au 30<sup>ème</sup> jour, avec un pic au 25<sup>ème</sup> jour.



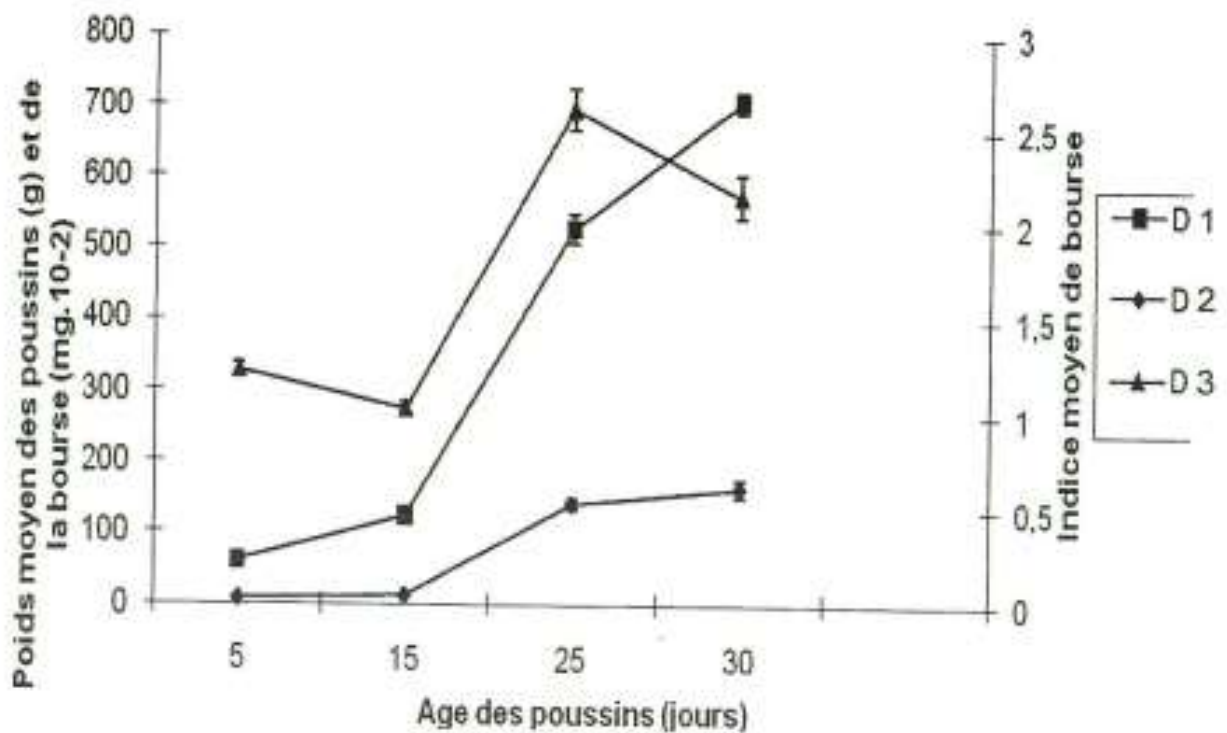


Figure 2. Evolution des poids moyens des poulets (D1), de la bourse de Fabricius (D2) et de l'indice de la bourse de Fabricius (D3) en fonction de l'âge des poulets lors de la bursite infectieuse.

La détection des anticorps contre le virus de la bursite infectieuse avec la réaction ELISA a confirmé la circulation du virus de la bursite infectieuse dans la ferme Luch.

### Distribution de la bursite infectieuse et de la colisepticémie

Pendant les 10 premiers jours, il y avait plus de poussins morts présentant à la fois les lésions de l'association colisepticémie et de la bursite infectieuse que de poussins ne présentant que les lésions de la bursite infectieuse parmi ceux autopsiés (82 vs 59,  $p < 0,05$ ) (tableau 1). Ce qui a confirmé le caractère associatif de la bursite infectieuse et de la colisepticémie. La bursite infectieuse est apparue comme l'infection principale et la colisepticémie, l'infection secondaire et opportuniste.

Tableau 1. Résultats d'autopsie des poulets morts au cours de l'épizootie de la bursite infectieuse et de la colisepticémie

Age des poussins (Jours)	Nombre de cadavres disséqués	Cadavres avec lésions caractéristiques pour :			
		Bursite infectieuse		Colisepticémie + bursite infectieuse	
		Nombre	%	Nombre	%
5	51	18	35,3	33	64,7
15	30	9	30,0	21	70,0
25	30	20	66,6	10	33,3
30	30	12	40,0	18	60,0
Total	141	59	41,8	82	58,2

### Isolement et identification de *E. coli*

Le tableau 2 a présenté la localisation des 107 colonies de la bactérie *E. coli* dans les organes des poulets. Il a révélé la présence de *E. coli* dans les organes internes et la moelle osseuse dans toutes les tranches d'âge de 1 à 35 jours, dans les embryons (cœur et vitellus) et à la surface des coquilles d'œufs incubés.

Tableau 2. Nombre et localisation des colonies de *E. coli* dans les divers organes en fonction de l'âge des poulets.

Matériels pathologiques	Nombre de colonies	Age des poussins (jours)					
		0	1	12	15	21	35
Cœur	34 ± 2 <sup>a</sup>		+	+	+	+	+
Rate	28 ± 3 <sup>b</sup>		+	+	+	+	+
Foie	17 ± 1 <sup>c</sup>		+	+	-	+	+
Moelle osseuse	8 ± 1 <sup>d</sup>		-	+	-	+	+
Embryons	9 ± 1 <sup>d</sup>	+					
Coquille d'œuf	11 ± 1 <sup>e</sup>	+					

*a, b, c* : Les valeurs moyennes suivies de lettres différentes sur la même colonne sont significativement différentes au seuil de 5 % ;  
+ Isolement de *E. coli* ; - Pas d'isolement de *E. coli*



La plus grande concentration de *E. coli* a été observée dans le cœur, suivie de la rate et du foie. Le nombre de *E. coli* dans la moelle osseuse était semblable dans la coquille des œufs incubés et le vitellus et cela dans toutes les tranches d'âge de 1 à 35 jours.

### Propriétés biochimiques des colonies isolées

La plupart des colonies isolées, de par leurs propriétés biochimiques dans 23 réactions (tableau 3), ont été identifiées comme des représentants typiques de *E. coli*. Elles ont fermenté le glucose, le lactose, la mannite et même le saccharose pour certains et étaient des bacilles Gram négatif.

Tableau 3. Description des propriétés biochimiques des colonies de *E. coli* isolées suite au micro-test

ENTEROtest1	Type de réaction											
Stamm Strain	H <sub>2</sub> S	MAN	LYS	IND	ORN	SCL	URE	ONP	VPT	INO	LIP	FEN
No. :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>E. coli</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-

ENTEROtest2	Type de réaction										
Stamm Strain	MAL	ADO	CEL	RHA	ARG	SUC	SOR	ESL	TRE	DUL	GLU
No. :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

+ réaction positive ; - réaction négative

**Légende :** H<sub>2</sub>S : Hydrogène sulfuré; MAN : Mannitol ; LYS : lysine ; IND : Indole ; ORN: Ornithine; SCI: Citrate de Simmons; URE : Urée; ONP : Ortho-Nitro-Phényl; VPT : Pyruvate de sodium; INO : Inositol; LIP : Lipidure; FEN : Nitrite ferreux; MAL: Maltose; ADO: Adonitol; CEL: Cellobiose; RHA: Rhamnose; ARG : Arginine; SUC :Sucrose ; SOR :Sorbitol ; ESC :Esculine ; TRE :Tréhalose ;DUL: Dulcitol ; GLU : Glucose.

### **Pathogénicité et typage sérologique des colonies de *E. coli* isolées.**

Les colonies de *E. coli* isolées des poulets morts s'étaient révélées pathogènes pour les souris blanches de laboratoire de 18 g chacune, suite à leur injection intra péritonéale à ces souris à la dose de 0,3 cm<sup>3</sup> par animal. Des trois souris expérimentales infectées, deux étaient mortes, l'une après 24 h et l'autre après 48 h.

Le typage sérologique des 107 colonies d'entéropathogènes isolées, avait permis d'identifier trois sérotypes pathogènes de *E. coli* à savoir : O2 avec la fréquence de 57,0 %; O78 avec la fréquence de 35 % et O111 avec la fréquence de 8 %.

### **Détermination de l'âge optimal à la première vaccination des poussins**

La figure 3 illustre la cinétique des anticorps maternels chez les poussins expérimentaux âgés de 5, 11 et 16 jours issus de poules vaccinées contre la bursite infectieuse avec le vaccin «Winterfield® 2512». Les titres des anticorps maternels chez ces poussins avaient chuté assez rapidement entre le 5<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour, atteignant moins de 11,5 fois sa valeur initiale. A 16 jours d'âge, 14,3 % des poulets expérimentaux avaient perdu leur immunité passive, avec un titre géométrique moyen du groupe de 1 : 989



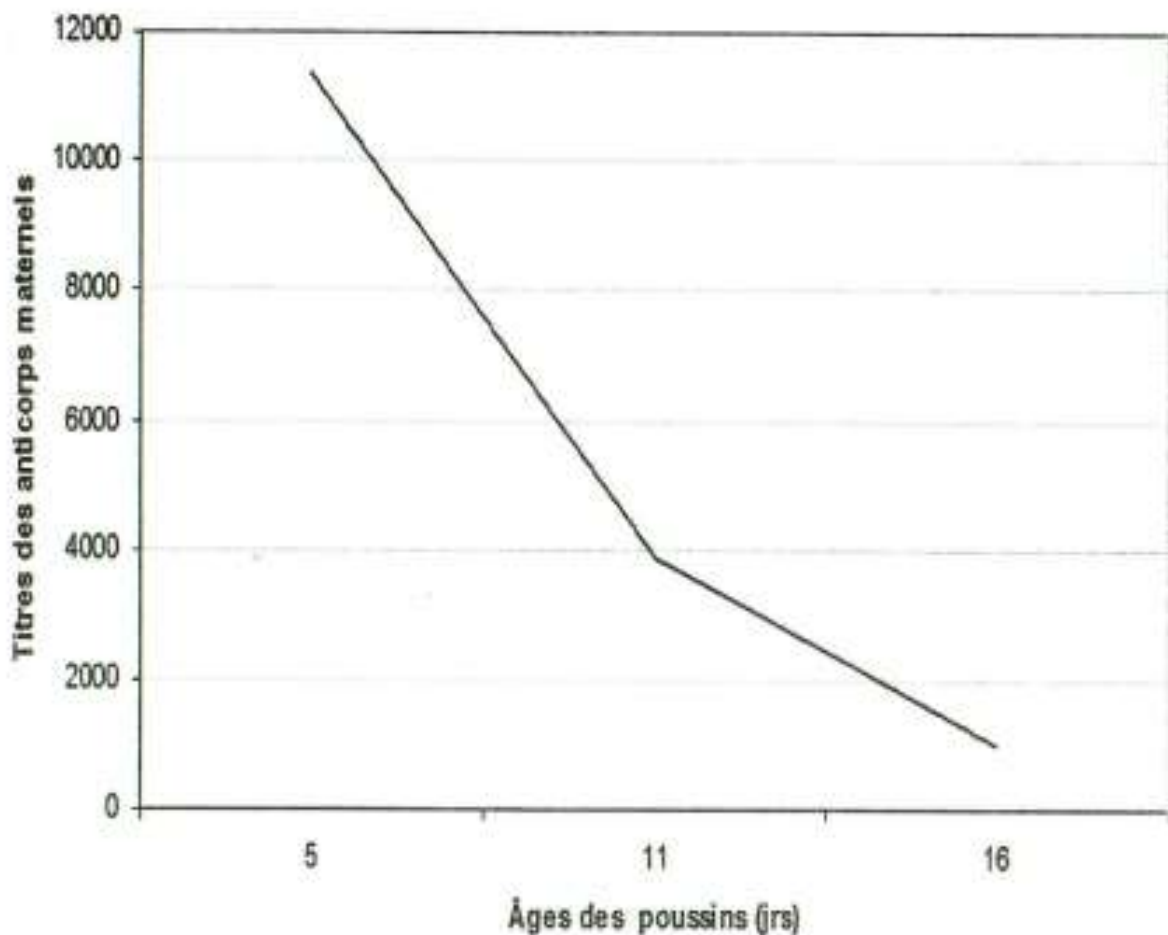


Figure 3. Cinétique des titres des anticorps maternels en fonction de l'âge des poussins.

### Discussion

L'infection précoce survenue chez des poussins de 4 jours peut s'expliquer par leur contact avec le virus sauvage virulent de la maladie de Gumboro les toutes premières heures de leur installation dans les batteries et aussi par l'absence éventuelle d'anticorps maternels chez certains poussins. Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par Cosgrove (1962) et Aliev (1991) qui estiment que les poulets de 3-6 semaines sont les plus sensibles à la bursite infectieuse. Par contre nos résultats se rapprochent de ceux d'Onunkwo (1981) qui a signalé la maladie chez des poussins de 10-14 jours. Des cas d'infection précoce des poussins sont assez fréquents dans les élevages à situation

épidémiologique complexe et se rencontrent dans 5 à 10 % des fermes avicoles des Etats-Unis d'Amérique (Giambrone, 1983).

Le taux de mortalité de 30 % induit par les deux maladies au cours d'une infection naturelle dans cette ferme est inférieur à celui de 90 % enregistré au cours d'une infection expérimentale avec le virus de la bursite infectieuse et les sérotypes pathogènes de *E. coli* par Lagoutkine (1995). La mono infection de *E. coli* dans les mêmes conditions avait causé seulement une mortalité de 40 % des sujets (Lagoutkine, 1995)

La courbe de mortalité réalisée s'accorde avec celle décrite par Cosgrove (1962), Adewuyi et Durojaiye (1989). La bursite infectieuse associée à la colisepticémie a été aussi diagnostiquée sur des poulets de 15 semaines d'âge avec un taux de mortalité de 16,6 % au huitième jour de la maladie (Igbokwe et Salako, 1996). L'absence d'une deuxième vaccination contre la bursite infectieuse favoriserait la forme subclinique de la maladie, ce qui expose les poulets à d'autres infections notamment la colisepticémie (Igbokwe et Salako, 1996).

En effet le développement de la bourse de Fabricius occupe une place prépondérante dans la mise en place de la réponse immunitaire chez les oiseaux (Sayegh *et al.*, 2000). Les lésions observées au niveau de la bourse de Fabricius des poulets malades s'accordent avec celles faites par Edgar et Cho (1976) qui affirment que la présence de grain de fibrine et de sang dans la cavité de la bourse de Fabricius signale la forme aiguë de la bursite infectieuse. De plus les poids moyens de la bourse de Fabricius de ces poulets à 5, 15, 25, et 30 jours d'âge ont été tous inférieurs à ceux des poulets sains des mêmes tranches d'âge (Belabbas, 2007). Le virus provoque l'atrophie progressive de la glande immunitaire due à la nécrose des lymphocytes et à la déplétion lymphoïde avec la destruction des lymphocytes (Montiel, 2000 ; Khatri *et al.*, 2005). Des poussins avec de telles bourses de Fabricius ont une faible résistance vis-à-vis des autres infections et présentent une faible réactivité immunologique à l'introduction de vaccins (Nawathe et Lamorde, 1982).

Par contre le taux de mortalité relativement faible induit par la colisepticémie seule peut être expliqué par la différence de vitesse de propagation du virus et de la bactérie mis en cause au sein de l'élevage. Et de ce fait tous les poulets infectés par le virus de la bursite infectieuse



ne sont pas infectés par la bactérie *E. coli*. L'isolement de la bactérie *E. coli* de tous les organes et en particulier du sang du cœur et de la rate traduit le caractère systémique, généralisé de la colibacillose dans toutes les tranches d'âge. Ces résultats s'accordent avec ceux de Grochova (1970), de Guérin et Boissieu (2008). La présence de *E. coli* sur les coquilles des œufs incubés peut s'expliquer par le possible transfert de cette bactérie des fermes productrices de ces œufs (Giovanardi *et al.*, 2005) et aussi par l'inefficacité des désinfectants utilisés ou tout simplement par le non respect des règles d'hygiène dans les couvoirs.

Les trois sérotypes O2, O78, et O111 identifiés comme responsables de la colisepticémie dans la zone d'étude concordent en partie avec les résultats de Dho-Moulin et Fairbrother (1999), et de Vandekerchove *et al.*, (2004) qui ont trouvé que les sérotypes O1, O2 et O78 étaient les plus présents et les plus pathogènes de *Escherichia coli* pour les poulets. Zanella *et al.*, (2000) ont identifié le sérotype O111 comme étant responsable de la colisepticémie sévère de volaille.

Les propriétés biochimiques des souches de *E. coli* isolées indiquent qu'elles sont des représentants typiques de *Escherichia coli*. Elles sont pathogènes pour les souris de laboratoire et cela confirme les résultats de Ibrahimov (1983), selon lesquels les souches de *E. coli* pathogènes pour les poulets le sont également pour les souris blanches de laboratoire.

La première tentative de lutte contre la bursite infectieuse a commencé par la vaccination (Edgar et Cho, 1965). La réponse à la vaccination contre la bursite infectieuse est d'autant plus efficace que si la date à la première vaccination tient compte du niveau des anticorps maternels (Yamada, 1989 ; Ferré et Belloe, 2005). Cette opération est d'autant plus facile lorsque les reproducteurs sont régulièrement vaccinés. Elle est par contre très complexe lorsque les poussins sont issus de reproducteurs à statut sérologique inconnu (Guitett *et al.*, 1982). En effet, l'âge des poussins à la première vaccination dépend de plusieurs facteurs comme la situation épidémiologique de la ferme, la virulence du virus sauvage, la nature du vaccin à utiliser, et le type de poussins tels que poussin ponte ou poussin chair (Ferré et Belloe., 2005) et doit être déterminé pour chaque élevage avicole.

La cinétique des anticorps maternels a révélé que, l'âge optimal à la première vaccination des poulets de chair dans cette ferme est de 14-16 jours. Ce résultat s'accorde avec ceux de Mouliak et Smolenski (1996), qui en vaccinant à 14 jours avec le même vaccin ont pu stabiliser le taux de mortalité des poussins à 0,07-1,73 %.

### **Conclusion**

La forme sévère de la bursite infectieuse associée à la colisepticémie est diagnostiquée chez des poussins de quatre jours à faible ou sans immunité maternelle.

Les sérotypes O2, O78 et O111 de la bactérie *Escherichia coli* sont pathogènes pour les poulets de chair, envahissent tous les viscères et provoquent une colisepticémie aigue.

L'âge optimal indiqué pour la première vaccination des poulets dans cet élevage expérimental est de 14-16 jours pour des poussins issus de reproducteurs constitués et vaccinés contre la bursite infectieuse avec le virus vaccin «Winterfield® 2512» après l'épizootie de la bursite infectieuse.

Les résultats de l'étude montrent la nécessité d'envisager des mesures prophylactiques plus adaptées à chaque élevage et basées sur la vaccination pour sa double protection contre la bursite infectieuse et la colisepticémie. Il s'avère cependant indispensable d'identifier les souches du virus mis en cause pour un choix judicieux du vaccin à utiliser et de déterminer le niveau des anticorps maternels des sujets à vacciner pour une efficacité maximale de la vaccination contre la bursite infectieuse dans les élevages modernes.

### **Remerciements**

Les auteurs remercient le Dr Akossou A. pour les analyses statistiques et le Dr Alkoiret T. I. pour la lecture critique de ce document.



## Références bibliographiques

- Adewuyi O. A., Durojaiye O. A. 1989. The status of guinea fowls (*Numida meleagris*) in the epidemiology of IBD of Poultry in Nigeria. *J. Vet. Med.*, 36, 1, 43- 48.
- Aliev A.S. 1991. Diagnostika infectionovo bursita // *Ptisevodstva*, N 10, 22-24.
- Becht H. 1977. Etiologie et prophylaxie de la bursite infectieuse. *Bull. Of. intern. Epizoot.*, 88, 4, 231-241
- Belabbas H. 2007. *Dynamique de croissance des organes chez le poulet de chair*. Mémoire de Magister en Anatomie Vétérinaire, Université de Batna, Algérie, 97p.
- Bessarabov B P., Melnikova I. I. 1998. *Infectionnaya bursalnaya bolezn (bolezni Gumboro)*: Leksia – 2. izdanie, pererab.i dop.,M.: MGAVMIB IM K.I Skriabina, stranitsa 16
- Cardinale .E., Arbelot B., Kaboret Y., Dayon J.F., Biauou C., Bada Algon O. 1998. La maladie de Gumboro dans les élevages semi- industriels de la region de Dakar. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 51, 4, 293-296.
- Courtecuisse C., Japiot F., Block N., et Diallo L.1990. Enquête sérologique sur les maladies de Newcastle et de Gumboro, la pasteurellose et la pullorose chez les poulets de race locale au Niger. *Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop.*43 (1): 27-29
- Cosgrove A. S. 1962. An apparently new disease of chickens( avian nephrosis). *Avian dis.*, 6, 2, 385- 389.
- Dho-Moulin M., Fairbrother J. M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 30, 299-316.
- Dossa S. C., Savi R. A.Salifou S., Dossou-Gbete G.S.O, Mensah S.E.2005. Profils sérologiques des poulets d'élevages traditionnels au Bénin. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales (RASPA)* Vol.3, N°1, p 27-31.
- Edgar S. A, Cho Y. 1965. Avian nephrosis (Gumboro disease) and its control by immunization. *Poultry Sci.*, 44, 136.

- Edgar S. A, Cho Y. . 1976. Epizootology of IBD and prevention of it by immunization. *Dev. Biol. Stan.*, 33 , 349- 356.
- Ferrè J.Y., Belloe C. 2005. Détermination de la date de vaccination contre la maladie de Gumboro en élevage de poulets label. In : Sixièmes journées de la Recherche Avicole, St Malo, 30-31 Mars 2005 p.370-374.
- Ficinine V.I, Tardatiane G. A. 1985. *Promechlenoe ptisevodstvo*. Moskva, Agropromom-izdate p 85-86
- Giambrone J.J. 1983. Experience with Gumboro disease. *Broiler Industry*, 10, 3, 80-87.
- Giovanardi D., Campagnari E., Sperati Ruffoni L., Pesente P., Ortali G., Furlattini V. 2005: Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in nitrated poultry production chain. *Avian Pathology* 34, 4, pp.313-318.
- Glick B. 1956. Normal growth of the bursa of Fabricius in chickens. *Poultry Sci.*, 35, 843
- Grochova G.A. 1970. Colisepticemia ptise i metodika ivo diagnostiki. . *Veterinaria*, 2, 65-66.
- Guerin J. L., et Boissieu C. 2008. Les colibacilloses ou infections à *Escherichia coli*. *AVIcampus, ENVV*, p 1-3.
- Guittet M., Picault J.P., Bennejean G. 1982 . Maladie de Gumboro: Immunité maternelle transmise aux poussins issus de reproducteurs vaccins. *Dev.Biol.stand.*, 51, 221-223.
- Hastenreiter H. 1977. La maladie de Gumboro au Bresil. *Bull.Off. intern. Epizoot.*, 88, 4, 323-325.
- Ibrahimov A.A. 1983. Infectionoi bursite // patologuicheskaya diagnostika bolezni ptise. M. *Koloss*, stranitsa .95-100.
- Igbokwe I.O., Salako M.A. 1996 . Outbreak of infectious bursal disease associated with acute septicaemic colibacillosis in adult prelayer hens. *Rev. Elev. Med. Vet.*, 49, 2, 110-113.
- Kariyawassam, S., Wilkie B. N, Hunter D.B, Gyles C.L. 2002. Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of



- avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, 46, 668-678.
- Kassouk V.I., Papov E.I. 1991. Metodicheskie ukazaniya po diagnostike kolibacteriosa (*Echerichiosa*) jivotne. Moskva , stranitsa: 25.
- Kathri M. Palmquist J.M., Char. M., Sharma J.M. 2005. Infection and activation of bursal macrophages by virulent infectious bursal disease virus. *Virus Research*, 113, 44-50.
- Lagoutkine H. 1995. Prophylaktika infectionoi bolezni ptise. *Ptisevodstva*, 5, 16-20.
- Montiel E. 2000. Importance du système immunitaire en aviculture industrielle. *Merial Avian Business*, Gainesville GA 30501, U.S.A, p. 2-3.
- Mouliak C.B., Smolenski B. I. 1996. Vaccinoprofylaktika infectionoi bursalnoi bolezni vneblagopalouchnoi xoziaistva // *Ptisevodstva*, 7, 29-34.
- Nakamura K., Cook J.K., Frazier J. A., Narita M. 1990. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculated infectious bronchitis virus and/or *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 36 ,881-890
- Nawathe D.R. , Lamorde A. G. 1982. Gumboro disease : problems of control in Nigeria. *Rev. Sci. Tech. Off. intern. Epizoot.*, 1, 4, 1163-1168.
- Onunkwo O. 1981. Studies on the control of infectious bursal disease in Nigeria. *A. Prelim. Rep. Zootech.intern.*, 7, 20-22.
- Rosenberger J. K. 1981. Better vaccines soon for Gumboro control program // *Broiler Ind.*, 100, 1, 90-94.
- SAS. 1990. *SAS User's guide: Statistics version 6 edition*. Cary, SAS institute, 846 p.
- Sayegh C. E., Demaries S. L., Pike K.A., Friedman J.E., Ratcliffe M.J. 2000. The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell developpement. *Immunol. Rev.*, 175, 187-200.

- Stordeur P., Mainil J. 2002. La colibacillose aviaire- article de synthèse. *Ann. Med. Vet.*, 146, 11-18.
- Vandekerchove D., De Herdt P., Laevens H., Pasmans F. 2004 Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. *Avian Pathology* 33, 2, pp.117-125.
- Vindevogel H. 1992. *La maladie de Gumboro*. In: Brugère-Picoux J., Silim A. ed., Manuel de pathologie aviaire. Maisons-Alfort, France, Ecole nationale vétérinaire, Chaire de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour, p. 155-163.
- Wyeth P.J. 1975. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *S. Typhimurium* and *E. Coli* infections. *Vet.Rec.*, 96, 11, 238-243.
- WIKIPEDIA. L'encyclopédie libre : géographie de la Russie. Consultation 21 Janvier 2010.
- Yamada S. 1989. The antibody's distribution of infectious bursal disease and the immunization method by vaccination. *Niwatory-No-Kenkyu.*, 64, 3, 89-94.
- Zanella A., Alorali G.L., Bardotti M., Candotti P., Gandagnini P. F., Martino P. Anna And Stonfer M. 2000 Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at start of lay. *Avian pathology*, 29, pp. 311-317.



## **Comparative study of the resistance of broilers to colisepticaemia after vaccination against infectious bursal disease and *Escherichia coli* inoculation**

E.Y. Attakpa<sup>1</sup>, P. A. Olounlade<sup>2</sup>, R. H. Bosma<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, BP 123 Parakou, Bénin. Tel. 0022997680635, E-mail : [attakpayae@yahoo.fr](mailto:attakpayae@yahoo.fr).

<sup>2</sup>Laboratoire d'Ethnopharmacologie et de Santé Animale/Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi, (FSA/UAC) 01 BP526 Cotonou, Bénin.

<sup>3</sup>Animal Sciences Group, Wageningen University

### **Résumé**

La bursite infectieuse et la colisepticémie font partie des principales causes de mortalité des poulets de chair, même en élevage moderne. Une étude bactériologique réalisée sur des poulets a permis d'isoler trois sérotypes pathogènes de *E. coli* avec les prévalences respectives O2- 57 %, O78- 35 %, et O111-8 %. La pathogénicité comparée des deux sérotypes dominants O2 et O78 a été réalisée sur des poulets âgés de 35 jours divisés en 4 groupes G0, G1, G2, G3, non vaccinés G0 et G1, vaccinés une fois G2 ou vaccinés deux fois G2 contre la bursite infectieuse, suite à l'inoculation ou non de ces souches pathogènes de *E. coli*. Le sérotype O78 a été plus virulent pour les poulets que le sérotype O2. Les résultats d'autopsie réalisée sur les oiseaux morts et ceux sacrifiés à la fin de l'expérience ont montré différents degrés de septicité dans les groupes de poulets selon qu'ils soient vaccinés ou non contre la bursite infectieuse. L'analyse biochimique des sera prélevés sur ces poulets expérimentaux a révélé des variations quantitatives à différents degrés, relatives à la quantité de protéines totales (26 à 36 g/l), l'albumine (12,2 à 24,6 %), et les globulines  $\alpha$  (9,2 à 23,9 %),  $\beta$  (13,6 à 35,0 %), et  $\gamma$  (39,5 à 48,0 %). Le pourcentage accru des  $\gamma$  globulines indique une amélioration de la résistance naturelle des poulets contre des sérotypes pathogènes de *E. coli*. L'autopsie a montré la chronicité de la colisepticémie chez les oiseaux vaccinés deux fois.

Mots- clés : Poulets de chair, colisepticémie, résistance, maladie de Gumboro, pathogénicité.

### **Abstract**

Infectious bursal disease and colisepticaemia are two main causes of mortality of broilers, even in modern husbandry. A bacteriological experiment with poultry



allowed isolating three pathogenic serotypes of *Escherichia coli* O2, O78, and O111 with prevalence score 57 %, 35 % and 8 %, respectively. The pathogenicity of dominant strains O2 and O78 was compared on broilers of 35 days old using 4 groups G0, G1, G2, G3, non- vaccinated, vaccinated once, or vaccinated twice against the infectious bursal disease, and inoculated or not with these strains. The strain O78 was more virulent for chickens than the strain O2. Results of autopsy realized on dead birds and others slaughtered at the end of the experiment showed different levels of septicity for the infectious bursal disease vaccinated or non-vaccinated chickens. The biochemical analysis of blood sera taken from these experimental chickens revealed different directions of the variations in total protein (26 to 36 %), albumin (12.2 to 24.6 %), globulin  $\alpha$  (9.2 to 23.9 %), globulin  $\beta$  (13.6 to 35.0 %), and globulin  $\gamma$  (39.5 to 48.0 %). The increased percentage of  $\gamma$  globulin indicated an improved natural resistance of the chickens against pathogenic serotypes of *E. coli*. Autopsy showed that the colisepticaemia was chronic in the group of chicken vaccinated twice against the infectious bursal disease or Gumboro.

Keywords: broilers, colisepticaemia, disease resistance, Gumboro, pathogenicity.

## Introduction

The infectious bursal disease (IBD) or Gumboro, a contagious viral disease is the most common of the viral pathogens of chicken. It is one of the diseases that threatens the poultry industry by the scale of the disasters to which it often leads (Cardinale *et al.*, 1998). The Gumboro disease is often associated with secondary infections such as colisepticaemia, salmonellosis, coccidiosis and others (Faragher, 1972; Igbokwe and Salako, 1996; Cardinale *et al.*, 1998; Giovanardi *et al.*, 2005). The virus lodges itself and may destroy the lymphoid tissues of the Fabricius gland (Montiel, 2000). Thus reduces the synthesis of the immunoglobulin (IgA) which protects the poultry against various viral and bacterial pathogens (Rosenberger, 1981; Kariyawasam *et al.*, 2002). Consequently the vulnerability of the chickens to secondary infection such as by *E. coli* increases (Wyeth, 1975). Both infectious agents cause similar degenerative modifications of Fabricius gland and in the thymus (Carol-Dmitriu, 1978). Thus decreases the resistance and the immunological ability of the chickens to react on infections and on the introduction of vaccines (Nawathe and Lamorde, 1982). This study aims



to assess the effect of the vaccination against Gumboro disease on the capacity of chickens' natural defence system to prevent the opportunist secondary infections in particular the colisepticaemia.

### Material and methods

Straight from the incubator, day old broilers were distributed in four groups G0, G1, G2 and G3, and maintain under laboratory conditions until day 45. Each group was kept in separate cages and fed with the same diet. At day 15, G2 and G3, were vaccinated with Winterfield<sup>(R)</sup> 2512 (a commercial vaccine against Gumboro disease). At day 30, G3 received a second dose of the vaccine. At day 35, G1, G2, and G3 were inoculated via intraperitoneal injection with  $1 \times 10^9$  cfu/ml of *E. coli* serotypes O2 and O78 and followed for 10 days (Table1). The control group (G0) was not vaccinated and not infected with *E. coli*. The experiment was ended 10 days after *E. coli* inoculation. Mortalities and clinical signs were daily recorded. Chicken died during the experimental period and those remaining at the end were all autopsied.

Table 1. Experimental design for the vaccination and inoculation of chickens

Experimental groups	Number of chickens	Number of vaccinations	Inoculated Serotypes	
			O2	O78
G0	4	0	-	-
G1	4	0	+	-
	4	0	-	+
G2	4	1	+	-
	4	1	-	+
G3	4	2	+	-
	4	2	-	+

+ Group infected with *E. coli*.

- Group not infected with *E. coli*.

The effect of the *E. coli* infection on the blood protein spectre of the chickens was determined after 10 days, the incubation period of avian colibacillosis (Safarov et Djavadov, 1968). Then blood samples were collected from each chicken for biochemical analysis, via wing vein and stored in vacuum sterile tubes. Biochemical parameters (protein, albumin, globulin) and some biological constants (phosphor, total calcium, glucose, bicarbonates, total bilirubin, creatinine, cholesterol and

urea) were determined from freshly collected serum using colorimetric methods. The values of the parameters (mean  $\pm$  s d) were calculated and compared between groups using Newman-Keuls test (Dagnelie, 1998).

## Results

### Survival pattern and clinical signs

The survival rate in G0 and G3 was 100 %. In G1, infected but not vaccinated, the first mortality was recorded within 24 and 48 hours after inoculation with serotypes O78 and O2 respectively. The survival rate of G1 was 75 %; the chickens were little active, anorexic. The body temperature reached 44 °C and the signs of respiratory problems more pronounced with chicken infected with O78. In G2, the only mortality recorded on day 8 was among chicken infected by serotype O78, showing diarrhoea on day 3 and day 4. The average rate of survival in G2 was 87.5 %; and the body temperature of 43 °C. In G3, vaccinated twice and infected, the chickens presented no apparent clinical signs of colisepticaemia and the rate of survival was 100 %.

### Autopsy of chickens

In G1, internal examination of the dead chickens revealed pathological signs of a pointed blood-poisoning such as a hydropericarditis, a congestion of the capillaries of the small intestine and the mesenterium; a mixture of the blood, the mucus and digested feedstuffs in the intestines; an accumulation of the blood in the caecum which is a sign of a pointed hemorrhagic process. In G2 and G3, vaccinated against the infectious bursal disease, we observed lesions of the chronic colisepticaemia. In G2, vaccinated once, 50 per cent of the surviving chickens showed clear pathological changes such as fibrinous perihepatitis, fibrinous pericarditis without a pointed hemorrhagic process in other internal organs. Characteristic lesions of *E. coli* infection such as a hydro pericarditis, a liver depigmentation with petechiae on its edges and the hyperaemia of the mucous membrane were observed in the internal organs of 75 % of the chickens in G3, vaccinated twice against the infectious bursal disease. No mortality was however recorded in this group.



### Biochemical parameters

Protein profile of the blood sera differed significantly in the 4 groups (Table 2). Total protein content of the blood sera in vaccinated and infected chickens was 9-10 g/l higher than the control group ( $p < 0.01$ ). As for the albumin, its content non-significantly increased from 12.2 to 18.7 % for the non-vaccinated chickens and from 10.6 to 24.6 % for those vaccinated. At the same time, a non-significant decline of the  $\alpha$  globulin content in the blood sera of infected chickens compared to the control group was observed. The decline of the  $\beta$ -globulin content in G1 and G3, as well as the increase in G2, were significant. The  $\gamma$ -globulins content of the blood sera of chickens of all infected experimental groups slightly increased from 3.9 % to 8.5 % compared to this of the control group ( $p < 0.01$ ). The effect of the vaccination was revealed by the lower content of  $\beta$  and  $\gamma$  globulin in the blood sera of chickens vaccinated twice (G3) compared to that of G2 vaccinated once against the infectious bursal disease with the vaccine "Winterfield<sup>(R)</sup> 2512" after the infection by *E. coli*.

Table 2. Protein profile of the blood sera of the experimental chickens infected or not by *E. coli*

Experimental groups	Total protein (g l <sup>-1</sup> )	Albumin	Protein fractions %		
			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
G <sub>0</sub> : Not vaccinated, not infected	26,0±0,17 <sup>a</sup>	12,2±0,16 <sup>b</sup>	23,9±0,29 <sup>d</sup>	24,5±0,18 <sup>c</sup>	39,5±0,17 <sup>a</sup>
G <sub>1</sub> : Not vaccinated, infected	35,0±0,10 <sup>b</sup>	18,7±0,22 <sup>c</sup>	13,2±0,14 <sup>h</sup>	20,2±0,23 <sup>b</sup>	48,0±0,10 <sup>d</sup>
G <sub>2</sub> : Vaccinated 1x, infected	36,0±0,06 <sup>c</sup>	10,6±0,17 <sup>a</sup>	9,2±0,30 <sup>a</sup>	35,0±0,32 <sup>d</sup>	45,3±0,24 <sup>c</sup>
G <sub>3</sub> : Vaccinated 2x, infected	35,0±0,06 <sup>b</sup>	24,6±0,23 <sup>d</sup>	18,4±0,22 <sup>c</sup>	13,6±0,20 <sup>a</sup>	43,4±0,19 <sup>b</sup>

a, b, c: mean values on the same column with different letters are significantly different ( $p < 0.01$ )

### Biological constants

The phosphorus content in the serum slightly (0.32 mmol/l) but significantly ( $p < 0.05$ ) decreased in G1, infected but not vaccinated, compared to the control (Table 3). The serum calcium content declined in G3, inoculated twice against the infectious bursal disease ( $p < 0.05$ ).

The serum glucose content slightly increased in all the experimental groups, but the increase is significant in G1 only ( $p < 0.01$ ). As for bicarbonates their content significantly increased in infected groups. A significant decline of serum bilirubin in G2 and G3, vaccinated once or twice, contrasted with the significant increase observed in G0 and G1 ( $p < 0.001$ ). The serum creatinine content significantly declined in G1, not vaccinated and infected by *E. coli* ( $p < 0.01$ ). The serum' cholesterol content significantly declined in all infected chickens. The serum' urea content was significantly lower in the infected but not vaccinated G1 in comparison with G0, G2 ad G3.

Table 3. Biological constants of the blood sera of chickens infected by *E. coli*

Biological constants	Groups			
	G <sub>0</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>
Phosphor (mmol l <sup>-1</sup> )	1.15 0.08 <sup>b</sup>	0.83 0.06 <sup>a</sup>	1.16 0.08 <sup>b</sup>	1.07 0.05 <sup>b</sup>
Total calcium (mmol l <sup>-1</sup> )	2.40 0.04 <sup>b</sup>	2.39 0.8 <sup>b</sup>	2.26 0.08 <sup>b</sup>	2.08 0.08 <sup>a</sup>
Glucose (mmol l <sup>-1</sup> )	4.78 0.15 <sup>a</sup>	5.96 0.07 <sup>b</sup>	5.93 0.29 <sup>b</sup>	5.37 0.31 <sup>ab</sup>
Bicarbonates (vol % CO <sub>2</sub> )	29.40 1.06 <sup>a</sup>	35.27 0.37 <sup>b</sup>	40.41 0.32 <sup>c</sup>	44.82 1.41 <sup>d</sup>
Total bilirubin (μmol l <sup>-1</sup> )	5.50 0.17 <sup>c</sup>	10.50 0.25 <sup>d</sup>	3.0 0.17 <sup>b</sup>	0.50 0.01 <sup>a</sup>
Creatinine (mmol l <sup>-2</sup> )	55.43 2.80 <sup>bc</sup>	33.07 0.52 <sup>a</sup>	51.54 0.79 <sup>b</sup>	63.21 1.33 <sup>c</sup>
Cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> )	5.12 0.14 <sup>c</sup>	4.90 0.11 <sup>b</sup>	4.25 0.30 <sup>a</sup>	4.90 0.15 <sup>b</sup>
Urea (mmol l <sup>-1</sup> )	10.13 0.43 <sup>b</sup>	7.24 0.24 <sup>a</sup>	15.35 1.18 <sup>c</sup>	9.85 0.93 <sup>b</sup>

*a, b, c: mean values on the same row with different superscripts are significantly different (p < 0.05)*

## Discussion

The reaction of chickens on the infection with the pathogenic serotypes O2 and O78 of *E. coli* varies for the different experimental groups; O78 turns out more virulent than O2. Already within 24 hours after the inoculation mortality occurred in G1 infected by O78 and within 48



hours in those infected with O2. These results confirm that both serotypes of *E. coli* are very pathogenic for broilers (Ewers *et al.*, 2004), in particular for those not vaccinated against the infectious bursal disease (Onunkwo, 1981; Blanco *et al.*, 1998; Dho-Moulin and Fairbrother, 1999; Dziva and Steven, 2008). In G2, vaccinated once against IBD, the effects of *E. coli* infection are more chronic and mortality occurred only among those infected with O78 after 8 days. In G3 vaccinated twice against IBD no loss is recorded and 75 % of the subjects present the characteristic lesions in the internal organs to a lesser degree, testifying the chronic character of the disease. The double vaccination has even better protected chickens against the coli infection. Our results confirm Rosenberger (1981) who stated that the IBD vaccination preserves the gland of Fabricius which continues to secrete immunoglobulin (IgA) against secondary infections.

The acute hemorrhagic lesions observed upon internal examination of the dead experimental chickens are in agreement with those described by Pourbakhsh *et al.* (1997) and Dozois *et al.* (2000). The hemorrhagic lesions are more pronounced in the chickens not vaccinated against IBD and infected with *E. coli*.

The infection with *E. coli* strongly increase the level of serum  $\gamma$ -immunoglobulin, but lower in vaccinated chicken, especially if vaccinated twice. Other blood serum parameters may explain this improved resistance to *E. coli* after vaccination against IBD.

### Conclusion

The serotype O78 of *Escherichia coli* was more virulent for the chickens than the serotype O2. The colisepticaemia was acute in chickens not vaccinated against IBD, contrary to those vaccinated once or twice showing a chronic infection. The vaccination increases the resistance of broilers to colisepticaemia and the double vaccination of broilers confers them a stronger resistance to these secondary infections.

Obtained results show the positive effect of vaccination against Gumboro disease on the capacity of chickens' natural defence system to prevent colisepticaemia. However other studies should explain the lower level of  $\gamma$ -immunoglobulin responsible for immunity better, at chickens



vaccinated twice against Gumboro disease and more resistant to colisepticaemia than those vaccinated once against that disease.

## References

- Blanco, J.E., Blanco M., Mora M., Jansen W.H., Garsia V., Vazquez M.L., Blanco J. ; 1998.- Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Microbiology*, 61, 229-235.
- Cardinale E., Arbelot B., Kaboret Y., Dayon J.F., Biauou C., Bada algon O. ;1998.- The disease of Gumboro in the breedings half industrialists of the region of Dakar. *Rev. Elev. Med. Vet. Country excess*, 51, 4, 293-296.
- Carol-Dmitriu E.; 1978. - Bursita infectiosa (boala de Gumboro puii de carne).*Rev. Crestere anim an.* 28, 4, 41- 45.
- Dagnelie P. 1998. *Statistique théorique et appliquée. Tome 2. Inférence statistique à une et à deux dimensions*, De Boeck Université, 659 p.
- Dho-Moulin M., Fairbrother J. M. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 30, 299-316.
- Dozois C.M., Dho-Moulin M., Bree A., Fairbrother J. M, Desautels C., Curtis III R. 2000.-Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localisation and analysis and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.*, 68, 4145-4154.
- Dziva F., Stevens M. P.; 2008.- Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian pathology*, 37, 4, 355-366.
- Ewers C., Jassens T., Kiessling S., Philipp H.C., Wieler L. ; 2004.- Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticaemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104, 91-101.
- Faragher J. T. 1972.-Infectious bursal disease of chickens: *Vet. Bull.*42, 6., 361-369.
- Giovanardi D., Campagnari E., Sperati ruffoni L., Pesente P., Ortali G., Furlattini V. ; 2005.- Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in nitrated poultry production chain. *Avian Pathology* 34, 4, pp.313-318



- Igbokwe I.O., Salako M.A.; 1996.-Outbreak of infectious bursal disease associated with acute septicaemic colibacillosis in adult prelayer hens. *Rev. Elev. Med. Vet.*, 49, 2, 110-113.
- Kariyawasam S, Wilkie B.N., Hunter D.B., Gyles C.L. ; 2002.- Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, 46, 668-678.
- Montiel E. 2000. - Importance of the immune system in industrial aviculture. *Merial Avian Business*, Gainesville GA 30501, U.S.A, p. 2-3.
- Nawathe D.R., Lamorde A. G. 1982. - Gumboro disease: problems of control in Nigeria. *Rev. Sci. Tech. Off. Intern. Epizoot.* 1, 4, 1163-1168.
- Onunkwo O. 1981. - Studies on the control of infectious bursal disease in Nigeria. *A. Prelim. Rep. Zootech. intern.* 7, 20-22.
- Pourbakhsh S.A., Boulianne M., Martineau B., Dozois C.M., Desantets C. and Fairbrother J.M.1997 Dynamics of *E. coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis.*, 41:221-223
- Rosenberger J. K. 1981- Better vaccines soon for Gumboro control. *Broiler Ind.*, 100, 1. 90-94.
- Safarov U.B., Djavadov S.A. 1968. Particularity of avian colisepticaemia. *Vet. Rec.*4, 40-42.
- Wyeth P.J. 1975. - Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to *S. Typhimurium* and *E. coli* infections. *Vet. Rec.*, 96, 11, 238-243.

## **Instructions aux auteurs**

Les articles soumis pour publications seront examinés par le Comité de Lecture des ANNALES DE L'UNIVERSITE DE PARAKOU. La décision finale d'acceptation ou de rejet de l'article sera prise par le Comité de Publication des ANNALES DE L'UNIVERSITE DE PARAKOU.

Tous les manuscrits doivent être conformes aux instructions suivantes avant d'être examinés.

### **Manuscrit**

1. Les manuscrits seront rédigés sur du papier de bonne qualité, au recto seulement, en double interligne avec marge sur les bords. Les ANNALES DE L'UNIVERSITE DE PARAKOU seront publiées en noir et blanc aussi, aucune autre couleur n'est acceptée dans les manuscrits. Chaque manuscrit revu et corrigé sera accompagné d'une version numérique saisie en Word ou autre logiciel de traitement de texte mais dans ce dernier cas, le texte doit être sauvegardé en ASCII. Les logiciels utilisés doivent être compatibles avec Windows.
2. Les manuscrits seront envoyés en trois (03) copies au secrétariat du Conseil Scientifique.
3. Le Texte doit être rédigé en caractère normal sans gras, sans italique et sans aucun mot souligné. Toutefois, une copie du texte-type pourra accompagner les trois (03) copies requises.
4. Les manuscrits seront subdivisés en diverses parties sur des pages séparées :
  - a) Page 1, Le titre (20 mots au maximum). Cette page doit indiquer clairement :
    - \* le titre de l'article : objet, taxon s'il y en a avec les noms scientifiques sans auteur (s),
    - \* les noms des auteurs de l'article précédés de leurs prénoms ou de la première lettre de leurs prénoms,



b) Page 2, Le résumé

Un bref résumé dans la langue de l'article est nécessaire. Ce résumé sera précédé d'un résumé détaillé dans la seconde langue (français ou anglais selon le cas), le titre sera traduit dans cette seconde langue. Cinq (5) mots clés suivront chaque résumé.

c) Le texte

Tous les articles originaux doivent être structurés de la manière suivante : Introduction, Matériel et méthodes, Résultats, Discussion, Conclusion, Remerciements (si nécessaire) et Références bibliographiques.

L'introduction doit poser clairement la problématique avec des citations scientifiques les plus récents et les plus récentes et les plus pertinentes (les objectifs de l'étude doivent être clairement énoncés). Au besoin, Résultats et Discussion peuvent aller de pair.

Le texte doit être rédigé dans un langage simple et compréhensible. On utilisera le Système International pour les symboles. Les abréviations internationales sont acceptées (FAO, DDT, etc.). Les auteurs des noms scientifiques seront cités seulement la première fois que l'on écrira un nom scientifique dans le texte. Les fractions seront présentées sous la forme "7/25" ou "(a + b)/c". Les places des figures et Tableaux seront indiquées au crayon sur la marge. Les notes infra- paginales ne sont pas acceptées.

d) Les références bibliographiques

Les auteurs sont responsables de l'orthographe des noms cités dans les références bibliographiques. Dans le texte, les références sont citées en précisant les noms des auteurs et la date de publication de la manière suivante : Dupont (1995) ou Dupont & Dupont (1990) ou dans le cas de plus de deux (2) auteurs, Dupont *et al.* (1978). Dans la liste des références bibliographiques, les noms d'auteurs seront rangés par ordre alphabétique. Selon les ouvrages, les références bibliographiques seront présentées de la manière suivante :

**\* Pour les revues**

- Adjanooun E. 1962. Etude phytosociologique des savanes de la basse Côte-d'Ivoire (savanes lagunaires). *Vegetatio* 11 : 1-38.
- Grönblad R. Prowse G. A. & Scott A. M. 1958. Sudanese Desmids. *Acta Bot. Fenn.* 58: 1-82.
- Thomasson K. 1965. Notes on algal vegetation of lake Kariba. *Nova Acta R. Soc. Sc. Upsal.*, ser. 4, 19 (1) : 1-31.
- Poche R. M. 1974a. Notes on the roan antelope (*Hippotragus equinus* (Desmarest)) in West Africa. *J. Applied Ecology*, 11: 963 – 968.
- Poche R. M. 1974b. Ecology of the African elephant (*Loxodonta a. Africana*) in Niger, West Africa. *Mammalia*, 38: 567 – 580.

**\* Pour les contributions dans les livres**

- Whitton B.A. & Potts M. 1982. Marine littoral: 515 – 542. *In*: Carr N.G. & Whitton B. A. (eds.), *The biology of cyanobacteria*. Oxford, Blackwell.
- Annerose D. & Cornaire B. 1994. Approche physiologie de l'adaptation à la sécheresse des espèces cultivées pour l'amélioration de la production en zones sèches: 137-150. *In* Reyniers F. N. & Netoyo L. (eds). *Bilan hydrique agricole et sécheresse en Afrique tropicale*. Ed. John Libbey Eurotext. Paris.

**\* Pour les livres**

- Zryd J. P. 1988. Cultures des cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, Suisse.



- Stuart S. N., Adams R. J. & Jenkins M. D. 1990. Biodiversity in sub-Saharan Africa and its islands. IUCN- The World Conservation Union, Gland, Switzerland.

**\* Pour les communications**

- Viera da Silva J. B., Naylor A. W. & Kramer P. J. 1974. Some Ultrastructural and enzymatic effects of water stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. Proceedings of Nat. Acad. Sci. USA: 3243-3247.

- Lamachere J. M. 1991. Aptitude du ruissellement et de l'infiltration d'un sol sableux fin après sarclage. Actes de l'Atelier sur Soil water balance in the Sudano- Sahelian Zone. Niamey, Niger, IAHS n°199 : 109-119.

**\* Pour les abstracts**

- Takaiwa F. & Tanifuji S. 1979. RNA Synthesis in embryo axes of germination pea seeds. Plant Cell Physiol., 20 (5): 875-884. In: Crop Physiology Abstracts, 1980, 4533.

**Les tableaux et figures**

Chaque tableau ou figure doit avoir un titre. Les figures doivent monter à la lecture visuelle suffisamment d'informations compréhensibles sans recours au texte. Leur place doit être indiquée avec précision dans le texte et ils seront numérotés et commentés dans un ordre chronologique. Seules les illustrations au laser seront acceptées dans le cas de celles dessinées à l'ordinateurs, autrement, les illustrations seront faites sur du papier calque à l'encre de chine. Les tableaux et figures originaux seront envoyés avec deux photocopies. Seules les photocopies en noir et blanc et de bonne qualité sont acceptées.

Les titres des tableaux seront écrits en haut de chaque tableau de données, et ceux des figures seront écrits en bas des illustrations. Les

titres et autres légendes seront écrits sur une feuille séparée avec les numéros correspondant aux tableaux de données et aux illustrations. Ces numéros seront écrits au crayon sur les originaux.

### **Intructions to Authors**

The "Annales de l'Université de Parakou" publishes the results of original applied research articles and scientific reviews in the fields plant sciences, soil sciences, animal sciences, ecology, food technology, nutrition, in tropical and subtropical areas. Short notes covering current topics are also given consideration.

The Editoe-in-Chief acknowledges receipt of the manuscripts and submits them to the editorial Board. The manuscripts may then be accepted, rejected or revisions may be requested. These must have been addressed when submitting a new version.

- The Editor Board may return without refereeing any manuscript that does not comply to the following guidelines.

- French is mandatory for French and Francophone authors. English may be used in all other cases.

- Complete manuscripts are submitted in *triplicate*, including one original. The text is typed, double-space, the pages are numbered.

The text and tables are in separate files saved under Microsoft Word.

- *First and second page contents*: 1) a precise, complete title in English and French; 2) a running title not exceeding 60 characters or spaces in English and French; 3) author's names, postal office box and fax numbers, E-mail address; 4) abstracts: in English and in French, 250 words at most, and both contain the same information; 5) five key words.

- *Article structure*: Introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion, acknowledgements (when appropriate), references.



Note: In the materials and methods, and results sections the past tense is mandatory. In the discussion the present tense may be used when refereeing to already published results, but the past tense is mandatory when refereeing to results of the present study.

*Tables:* Arabic numerals are used, in the order they appear in the text.

- *Figures:* (photos, graphs, drawings, maps): origins submitted on paper only, separate from the text, numbered (Arabic num) in the order they appeared in the text: legend are listed separately, meaningful by themselves; high-quality is required from the start as they may be reproduced without any modification (except in size); photos; contrasted, in black and white if the subject justifies it.

- *References* presented as below. A very special care is given to their presentation and no item may be omitted (e.g. do not forget the publisher's city and country when quoting a book), using the following examples as guidelines.

Berthe D. 1987 Epidémiologie et prophylaxie des maladies infectieuses majeures: bilan et perspectives. Thèse doct. Vét. EISMV, Dakar, Sénégal.

Denis J. P. 1971. L'intervalle entre les vèlages chez le zébu Gobra (Peul sénégalais). *Revue Elev ; vét ; pays trop.*, 24 : 635-647.

Guyot B. Tobar M. & Vincent J. C. 1988. Essai de détermination de la couleur verte du café en système modèle. *In* : XIIe colloque scientifique international sur le café. Montreux, Suisse, 28 juin-3 juillet 1987. Paris, France, ASCI, pp. 143-147.

Ricordeau G. 1981. Genetics: breeding plants. *In*: Gall C., (ed) Goat production. London, UK, Academic Press, pp. 111-161. *Anonymous* Publications are listed under the title first word.

The complete guidelines are available upon request.

International ISO norms are used to abbreviate journal names.

Proofs are sent to first author or to the correspondent who then has a few days to return the corrections.

10 reprints free of charge are sent solely to the first author or to the designated correspondent.





**Editeur :**  
**Vice Rectorat Chargé de la Recherche Universitaire**  
**Université de Parakou – B.P. 123 Parakou, Bénin**