DK525480

CD_RP14868

CIRAD-CA
UPR RELIER

Rapport d'une mission d'appui technique auprès de :
PT SMART RESEARCH INSTITUTE
(PEKANBARU-RIAU INDONESIE)
dans le cadre de :
ATP CIRAD : NEUCAPALM

Mise en place des essais ^{15}N de quantification de la fixation symbiotique par *Pueraria phaseoloides* dans les plantations de palmier à huile (*Elaeis guineensis*).

Robert OLIVER
Février 2005

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

4868

CIRAD
000068034

Remerciements

Au moment de mettre la dernière main à ce rapport, je tiens à remercier tous ceux qui, à Sumatra ou à Montpellier m'ont aidé dans la réalisation de ce travail:

- Les chercheurs, les responsables et agents du laboratoire d'analyses de la station de Libau : Mr Abdulah, Mme Lilik, Mr Pujianto
- Mr Prasetya responsable de la recherche sur la palmeraie de Indra-Lestari et les agents qui nous ont aidé lors de la réalisation des expérimentations ;
- Les agents du CIRAD en poste à Pekanbaru ;

avec une mention particulière pour Ignacio et Fabiana ainsi que Jean Pierre que je remercie chaleureusement pour leur accueil.

Quantification de la fixation biologique de N par le Pueraria par la technique de mesure indirecte à l'aide d'engrais ^{15}N

Cette détermination est censée être effectuée sur des parcelles d'âge différents pour couvrir toute la période de « vie » de la légumineuse dans les plantations de palmier. Compte tenu de la durée du projet, il a été décidé de réaliser cette mesure à partir de trois parcelles différentes de palmiers : *

- une parcelle nouvellement implantée sur défriche récente, où le pueraria est semé au moment de la mise en place des palmiers issus de pépinières et qui correspondra à une phase dite d'implantation des cultures ;
- une parcelle de palmiers âgée de 2 ans ½ où le pueraria est censé avoir atteint un développement optimal et maximum ;
- une parcelle âgée de 5 ans où le pueraria entre dans une phase de dégénérescence du fait, principalement de la compétition pour la lumière du palmier.

Ces parcelles ne sont disponibles sur un même type de sol que dans la région d'Indra-giri (figure 1 en annexe) et plus précisément dans la zone d'Indra-lestari, zone qui où les plantations sont la propriété de petits exploitants gérant chacun des parcelles de 2 ha dans des champs de 30 ha de surface.

L'agencement des arbres dans une plantation de palmiers est pratiquement systématique et conforme au schéma de la figure 2.

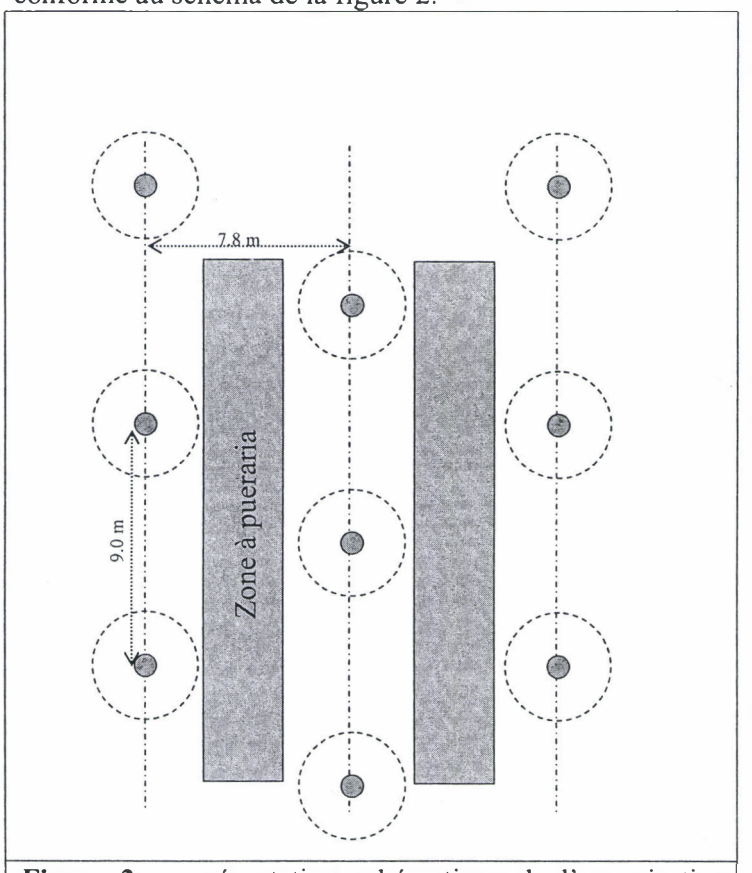


Figure 2 : représentation schématique de l'organisation des zones dans une parcelle de palmiers à huile.

Même si, pour des parcelles nouvellement plantées, le pueraria pourra coloniser assez rapidement l'ensemble de l'espace disponible en dehors des « ronds » réservés autour de l'arbre et dont le rayon est d'environ 2m, cette colonisation, dont la dynamique d'installation reste à préciser ne durera pas puisque le temps d'installation des plantes semées dans l'interligne des arbres n'est pas négligeable et que la fermeture du couvert entraîne la dégénérescence du pueraria. Dans ces conditions, pour conserver une géométrie des parcelles identique pour toutes les situations, on limitera la largeur utile des parcelles d'étude à 3m centrés sur l'interligne des palmiers.

Proposition de schéma général pour l'installation des parcelles ^{15}N.

Certaines considérations doivent être prises en compte pour installer ces parcelles :

- La nature de la plante à étudier : Le pueraria (figure 3) est une légumineuse rampante qui émet des racines à partir des tiges à intervalles divers et dont l'extension peut être importante. Dans les plantations de palmier elle peut être considérée comme vivace et des plantes d'âges différents coexistent sur le terrain ainsi que de la litière, des parties sénescentes et des parties juvéniles. Ceci nous a imposé de définir une « zone de garde » pour chaque prélèvement de 1m*1m ;
- L'espace disponible pour la légumineuse à l'échelle de la durée de l'étude que l'on s'est fixée à 24 mois et qui sera de 3m en largeur centrée sur l'inter-rang des palmiers ;
- La quantité d'azote enrichi ^{15}N disponible (l'équivalent de 20 g d'urée 15N d'abondance isotopique approximative 10%) ;
- Le nombre de placettes élémentaires par parcelle qui est au minimum de quatre compte tenu du nombre de prélèvements prévus ;
- La nécessité de marquer le sol à travers un épais tapis de pueraria (litière et parties vivantes de la plante.

Dans ces conditions, on a choisi de mettre en place des parcelles de 33 m^2 (3m * 11 m) centrées sur l'inter-rang de palmier selon le schéma présenté à la figure 4a ce qui autorise 5 prélèvements de 1m*1m avec une zone de garde de 1m de tous côtés entre deux placettes de prélèvement. Cette même parcelle de base peut être aussi utilisée pour 6 placettes de 1m*1m si on se réserve une zone de garde de 1m par rapport à toute bordure non ^{15}N et de 60 cm pour une zone contiguë ^{15}N (figure 4b)

3a) Colonisation de l'inter-rang par le pueraria **3b)** émission de racines à partir des tiges

Figure 3 : *Pueraria phaseoloides* en palmeraie de 4 ans environ à Sumatra

Situation des parcelles expérimentales

Les parcelles expérimentales sont situées sur la plantation d'Indra-Lestari qui est en fait constitué de champs divisés en parcelles de 2 hectares cultivées par des planteurs encadrés par les responsables de la plantation. Cette plantation se situe près de la ville d'Indra Guéri-Oulou soit à environ 350 km de Pekanbaru (soit au minimum 5 heures de route) et la zone où ont pu être réunies les conditions initialement définies pour implanter les parcelles d'essais se trouve à environ 30 kms (1H 30) environ de la base de vie.

La parcelle en plantation nouvelle (2004) (PN) est située tout près de la base de management de la station sur un terrain en assez forte pente (~10%). La couverture en pueraria est assez fournie mais de nombreuses espèces d'adventices sont présentes. La situation en assez forte pente de cette parcelle peut générer d'assez forts épisodes de ruissellement ce qui est gênant pour les études à l'aide de ^{15}N (doses d'engrais peu fiables) et nécessitera impérativement la mise en place de tôles de protection autour des parcelles ;

La parcelle de « plantation récente » (2001) (PR) est située à environ 20 minutes de route de cette base sur un terrain plat, la couverture de pueraria est importante et par conséquence la présence d'adventices y est limitée ;
La parcelle de « plantation ancienne » (1999) (PA) est située à environ 40 minutes de route de la parcelle 2001, sur terrain quasiment plat. La couverture de pueraria y est rare et les adventices assez fréquentes. Il n'a pas été possible de trouver, sur cette parcelle une zone suffisamment couverte en continu pour y placer la parcelle standard de 3m * 11m et une zone pouvant convenir pour l'objet de l'étude de dimensions 5m * 5m y a été identifiée.
Marquage des parcelles en ^{15}N urée.
La méthode est décrite en détail en annexe I. A cette heure, seules les parcelles PN et PR ont été enrichies. Si l'opération de marquage a été relativement aisée sur la parcelle PR, elle a été beaucoup plus délicate à mettre en œuvre sur la parcelle PN. En effet, cette parcelle est de défriche récente (avril 2004) et de nombreux débris ligneux y sont présents. Ces débris, non visibles, lors du choix de la zone choisie pour y implanter la parcelle d'essai, car cachés par la couverture de purearia, ont très fortement gêné l'opération de marquage. De plus, la surface de cette parcelle, toujours en raison de sa mise en place récente, est assez ondulée ce qui a gêné l'utilisation du système de localisation des points d'injection de l'urée ^{15}N dans sa conception actuelle.

Remarques sur les objectifs et la stratégie de l'étude.

Cette étude est, en principe conçue pour quantifier, depuis sa mise en place jusqu'à sa disparition naturelle la quantité d'azote fixée par la couverture de pueraria d'où le découpage de l'étude sur trois parcelles d'ancienneté différente. Toutefois, compte tenu des moyens mobilisés, aucune répétition n'a été prévue et il est à craindre que la variabilité naturelle et la difficulté à identifier une plante de référence fiable pour chacun des quatre prélèvements prévus ne conduise à une dynamique peu logique, aussi serait'il préférable de ne pas mettre en place la parcelle PA et de doubler l'expérimentation sur la parcelle PR. Cette solution permettrait d'envisager la publication des résultats obtenus dans une revue scientifique alors que cela ne sera certainement pas le cas si le dispositif ne comporte aucune répétition.
L'abandon des mesures de fixation sur PA est aussi justifiée par le faible taux de couverture de cette parcelle par le pueraria (à confirmer par l'étude en cours sur le sujet) et par le faible nombre de nodules présents (en première estimation) sur les zones échantillonnées pour les mesures d'ARA.

La plante de référence et évolution souhaitable du dispositif.

L'hypothèse de base de la technique de détermination de la fixation par la méthode d'enrichissement ^{15}N spécifie que la plante fixatrice dont on désire déterminer la fixation et la plante non fixatrice qui doit servir de plante de référence doivent avoir, pendant toute la durée de la mesure intégrée de la fixation un enracinement et un rythme de prélèvement de N similaires (cf annexe II). Cette hypothèse sera très difficile à satisfaire car il est impossible de garantir que, parmi les adventices présentes au moment de la mise en place de l'essai certaines puissent encore être présentes sur le terrain 24 mois après ce qui est nécessaire pour intégrer la mesure sur cette durée. Dans ces conditions, il n'est même pas certain que le recours à un échantillonnage multi espèces pour pouvoir apprécier la valeur Ndff% de la plante de référence puisse permettre d'obtenir des résultats fiables pour la mesure de la proportion d'azote fixée par le pueraria.
A notre avis, les ambitions de l'étude devraient être revues à la baisse, du moins pour les activités menées sur le terrain, et ne porter que sur une période restant à définir mais relativement courte (2 à 4 mois au maximum) suivant l'application de l'urée ^{15}N. Le renouvellement de l'application deux fois par an sur des surfaces adaptées pour réaliser deux répétitions par période de mesure (soit une surface de 9 m^2 pour une parcelle utile de 1m de coté entourée de 1m de zone de garde) permettrait alors de couvrir toute la période souhaitée. La délimitation, dés maintenant, de trois

zones d'implantation des parcelles 15N (blocs) pour chacune des deux parcelles à suivre (PR et PN) et, à l'intérieur de chaque zone l'emplacement d'autant de parcelles 15N que de dates de marquage prévues soit quatre dates supplémentaires par rapport à celle déjà mise en place (figure 5) permettrait de travailler sur un dispositif expérimental beaucoup plus conforme aux règles de mise en place des expérimentations de terrain que le dispositif initialement prévu. Dans le cas de la parcelle PN, il serait important que les blocs soient disposés perpendiculairement à l'inter-rang des palmiers qui correspond aussi approximativement à la ligne de plus grande pente de la parcelle (figure 6)
En attendant, la récolte de trois placettes après deux mois de marquage ^{15}N et de deux autres après quatre ou six mois sur les deux parcelles déjà en place permettrait d'obtenir des résultats utilisables dans le cas ou on choisit de se référer à un schéma général de parcelle 15N conforme à la figure 4a. Ce prélèvement pourrait être de 2 fois 3 placettes de 1m*1m si on se réfère à un schéma général de parcelle ^{15}N correspondant à la figure 4b.

Appréciation de l'efficience de la fixation par mesure de l'Activité Réductrice de l'Acétylène (ARA).

Le protocole utilisé pour cette mesure est conforme à celui préconisé par A. Galiana (Annexe) mais, dans le cas du pueraria cette mesure présente une particularité, dans la mesure où la plante émet des racines à intervalles plus ou moins réguliers dés que la tige est en contact avec la litière (figure 3b). On ne peut pas donc considérer une plante comme enracinée dans une zone précise et donc délimiter une surface associée à une plante. Dans ces conditions, on a défini une surface de prélèvement élémentaire de 20 cm * 20 cm sur 6 à 10 cm de profondeur (la limite exacte est difficile à définir à cause de l'étroite imbrication de la litière, du système racinaire du pueraria et de l'horizon superficiel du sol). Ces prélèvements ont permis de constater que beaucoup de nodules sont localisés pratiquement niveau de l'insertion des racines sur la tige.
Les mesures effectuées sur un échantillon de nodules attachés aux racines sont exprimées par rapport au nombre et/ou au poids sec (72 heures à 40°C) de nodules présents dans le flacon de mesure de l'activité réductrice puis ramenées à l'unité de surface en tenant compte du nombre et du poids de nodules présents dans l'échantillon prélevé.

Proposition complémentaire pour l'appréciation de l'efficience de la fixation par la mesure de l'ARA.

La technique utilisée pour la mesure de l'efficience de la fixation par ARA est destructive, elle peut être complétée par une mesure non destructive faisant appel à la mise en place sur le terrain d'une cloche de piégeage constituée d'une base fixe (ce qui permet faire un suivi dynamique exactement sur les mêmes zones) et d'un couvercle amovible. Ceci permet d'isoler une surface de terre sur lequel on pose un système produisant du C_2H_2 (CaC_2 et eau) qui, en diffusant dans le sol est réduit par l'activité des rhizobiums en C_2H_4. Les échantillons de l'atmosphère sous cloche sont prélevés dans des vénojects après 1 heure et 2 heures et la teneur en C_2H_4 des échantillons est déterminée (cf Balandreau et Villeminreveco10_1.pdf). Cette méthode n'est aussi pas exempte d'écueils et de critiques , en particulier les résultats sont très dépendants de la « qualité » de la diffusion du C_2H_2 dans le sol et la mise en place d'une cloche peut engendrer, selon la localisation, un microclimat sous la cloche gênant pour la réalité des résultats relativement aux conditions réelles de la parcelle. Les résultats sont ensuite exprimés relativement à l'unité de surface.

Propositions complémentaires :

La quantification de l'azote fixé par le pueraria n'est qu'un des volets de la gestion de la fertilisation azotée des palmiers. Deux pratiques culturales essentielles peuvent être une source non négligeable d'azote (et autres éléments) pour le palmier : la restitution des régimes après

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

extraction de l'huile et la décomposition des andains constitués par les feuilles de palmiers placés dans un inter-rangs sur deux lorsque les feuilles deviennent âgées.
- Dans les deux cas, divers types d'études sont à envisager, si les résultats attendus ne sont pas disponibles, (i) une analyse approfondie des produits ou parts de produits concernés, pour ce qui est de la composition minérale et des caractéristiques classiques de biodégradabilité (composition pariétale selon Van-Soest), polyphénols totaux, lipides éventuels ;
(ii) une étude cinétique in vitro de décomposition des produits associé au sol d'apport (ou parties constitutives des produits) avec un suivi dynamique de la décomposition par la production de CO_2 et de la minéralisation de l'azote par la dynamique de production de N minéral y compris éventuellement les pertes par volatilisation lors de apports d'engrais et celles de N_2O lors des restitutions des co-produits d'extraction de l'huile ;
(iii) une ou des études in situ par la technique des cages d'exclusion et/ou des litterbags avec ou sans intervention de la mésofaune du sol (litterbags à maile de 200 µm et litterbags à maille de 3 à 5 mm).
Ces études de décomposition in vitro et in situ sont aussi envisageables pour le pueraria en distinguant les feuilles vertes, les tiges, la litière et les feuilles sénescentes.

Conclusion

Les difficultés pour mener à bien l'expérimentation prévue sont de deux types : (i) l'éloignement des parcelles du lieu de résidence (Pekanbaru) et encore plus de la station de Recherches de la société Petersmart (Libau) ne facilite pas le suivi des parcelles d'essais même si, sur place, le personnel associé à l'expérimentation paraît compétent et motivé par les enjeux de l'essai ; (ii) la méthodologie utilisée est ambitieuse mais comporte de nombreux écueils qui ont été soulignés au fil du texte. Les propositions de modification par l'implantation programmée tout au long des deux ans d'étude prévus des parcelles ^{15}N devrait sécuriser les résultats obtenus. Il n'empêche que le choix d'une plante de référence de biologie similaire au Pueraria reste posé. La meilleure solution étant de disposer de pueraria non nodulant ou, à défaut d'une autre légumineuse non nodulante comme le niébé par exemple.
Des études complémentaires semblent utiles pour mener à bien l'étude prévue : (i) une étude de la dynamique de colonisation des parcelles par le pueraria ; (ii) une étude phénologique du peuplement de pueraria dans une plantation de palmiers. Cette étude demanderait la mise en place de parcelles spécifiques ; (iii) une étude de la composition floristique et de la dynamique des adventices associées au pueraria.
Le protocole expérimental de terrain devrait être complété par un protocole plus artificialisé qui permettrait d'isoler selon un dispositif statistiquement acceptable, à l'intérieur d'une parcelle uniformément enrichie en ^{15}N, des placettes de surface approximative $1m^2$ destinées à recevoir une plante de référence acceptable (si possible une légumineuse non nodulante) et des placettes de pueraria. Ces placettes devraient être physiquement isolées les unes des autres par une barrière empêchant la colonisation réciproque des zones réservées à chaque plante. L'effet de la lumière sur le développement des couvertures pourrait éventuellement être pris en compte par la mise en place d'un ombrage approprié.

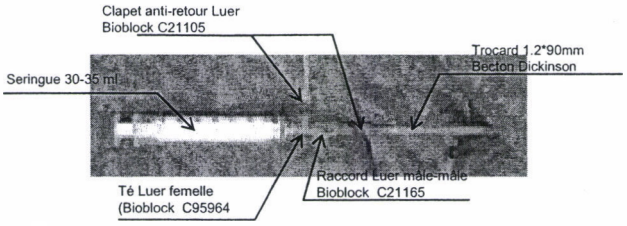
Annexe I

Protocole de marquage des parcelles sous couverture végétale ou sous mulch par de l'urée enrichie en ^{15}N.

Matériel :

* Gabarit destiné à localiser les points d'injections de la solution d'engrais 15N : plaque de contreplaqué de 8 ou 10 mm d'épaisseur et 1m*1m de côté percé à intervalles réguliers de 20 cm (en commençant à 10 cm du bord) par un trou de diamètre 5 ou 10 mm.

* Seringue de capacité 20 à 35 ml munie d'un dispositif anti-retour (photo)



Cette seringue est à relier à un réservoir de 2 litre environ par un tube permettant ainsi un remplissage automatique de la seringue et de se prémunir contre les pertes de solution sur le terrain. Cette seringue est équipée à son extrémité d'un trocard à ponction lombaire de longueur appropriée (Becton Dickinson). On peut trouver des trocards de 10 à 20 cm au maximum. La taille choisie dépend de la profondeur d'injection souhaitée (en général entre 2 et 10 cm.

Mode opératoire : (adapté à des conditions rustiques de marquage).

* Au laboratoire, avant de partir sur le terrain préparer une solution concentrée, par exemple occupant un volume de 2 litre au maximum du produit que l'on veut injecter. Placer cette solution dans un flacon qui sera conservé dans une glacière jusqu'au moment de l'injection.

* Sur le terrain diluer cette solution avec un volume approprié d'eau distillée (une quantité suffisante aura été prévue pour cela). Cette dilution sera faite du mieux possible avec les instruments dont on pourra disposer sur le terrain pour apprécier les volume (bouteille dont le volume aura été déterminé par avance, balance de terrain...). Prélever immédiatement une aliquote de 200 à 500 ml de cette solution qui sera réservée pour une analyse exacte de la teneur en N et de l'abondance isotopique ^{15}N de cette solution.

* Délimiter si cela n'a pas déjà été fait les limites de la parcelle destinée à être enrichie en ^{15}N (prévoir dans les protocoles expérimentaux une zone de garde suffisante mais raisonnable). Placer le gabarit d'injection sur la parcelle et, à l'aide d'un clou de taille appropriée faire un avant trou dans le sol où sera faite l'injection. Injecter 20 ml de solution dans chaque avant trou.

L'opération de marquage des points d'injection à l'aide d'un avant trou fait au fur et à mesure à travers le gabarit d'injection pourra avantageusement être remplacée par, à l'aide d'aiguilles de taille et de diamètre approprié, un marquage de l'ensemble des points d'injection. La planche sera ensuite retirée alors que toutes les aiguilles sont plantées en terre et l'injection pourra ensuite être faite dans le trou laissé par chaque aiguille qui sera enlevée juste avant l'injection. Cette façon d'opérer garanti une injection correcte quel que soit l'état de surface du terrain (micro relief).

Une fois la parcelle implantée, il est très fortement recommandé, surtout pour les parcelles en pente, d'isoler la zone 15N par la mise en place d'une tôle enfoncée verticalement dans le sol sur 10 cm environ et dépassant de 10 cm environ du sol pour éviter les pertes par ruissellement et/ou érosion d'engrais15N. Les plants de pueraria la parcelle ^{15}N devront être, dans la mesure du possible, confinés son espace.

Dans la parcelle 15N les interventions et le piétinement devront être les plus limités possibles

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

Conditions de réalisation du marquage sur la plantation d'Indra Lestari :

Solution mère d'urée : 48.7 g d'urée d'abondance isotopique ^{15}N estimée à 10.2%
+ 437 g d'urée « commerciale » ^{14}N
+ H_2O QSP 2 litres environ.

Eau de dilution pour application sur le terrain : environ 55 litres
Injection : 25 fois 20 ml de solution diluée par m^2 de sol.
Profondeur d'injection : estimée à 2 à 8 cm au maximum.

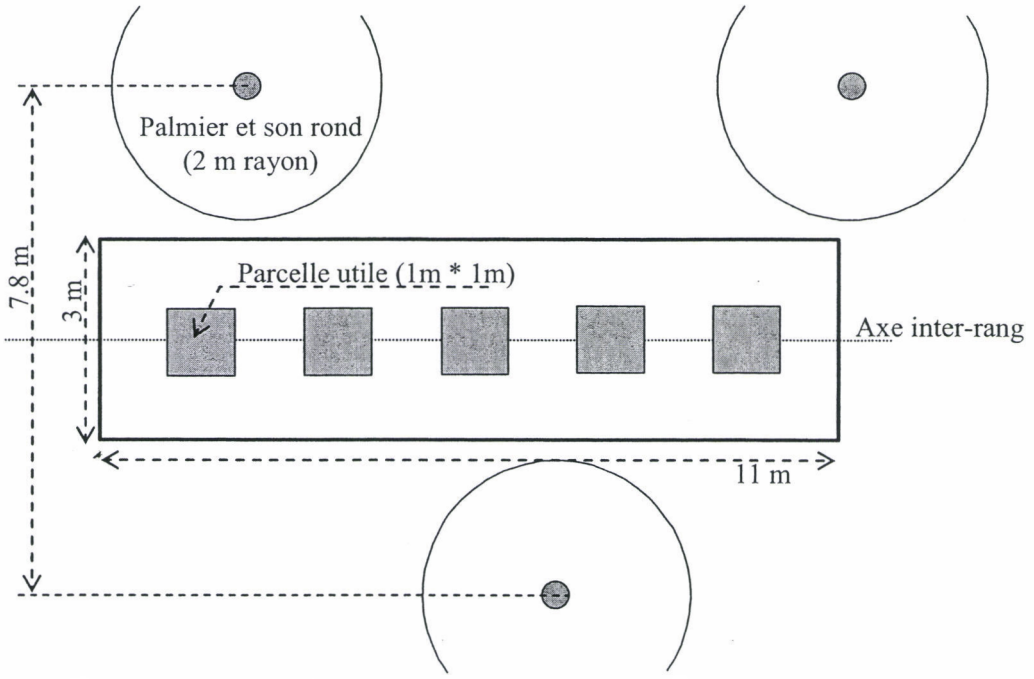


Figure 4a : Schéma d'une parcelle ^{15}N avec 5 placettes de prélèvement.

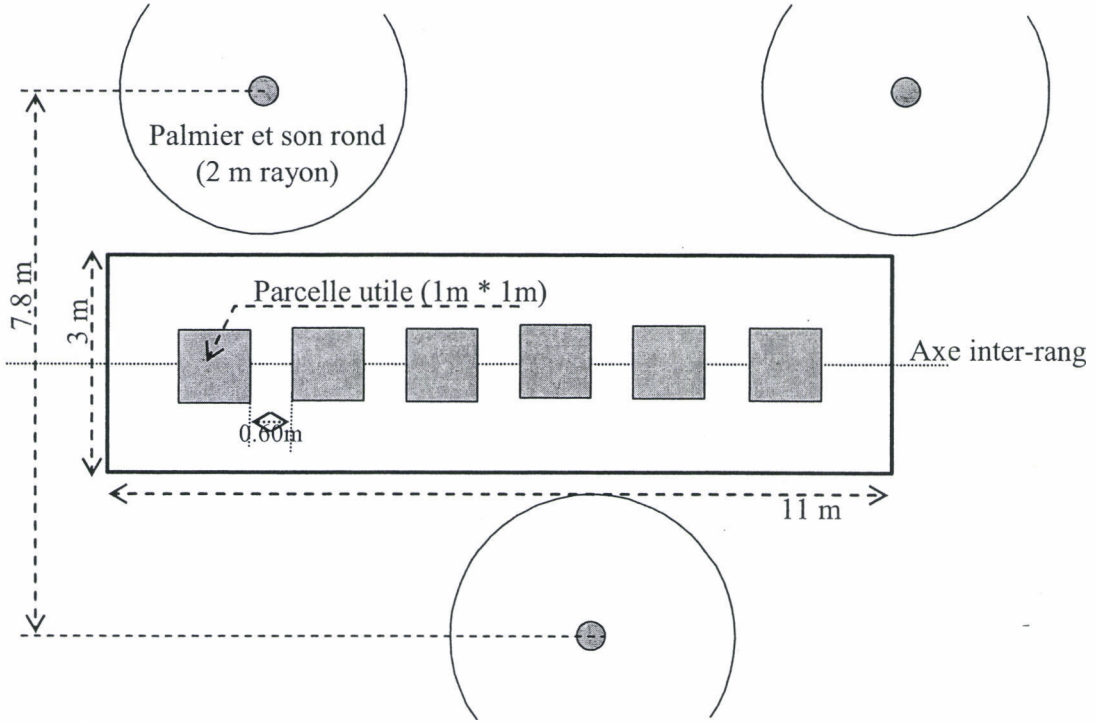


Figure 4b : Schéma d'une parcelle ^{15}N avec 6 placettes de prélèvement.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette

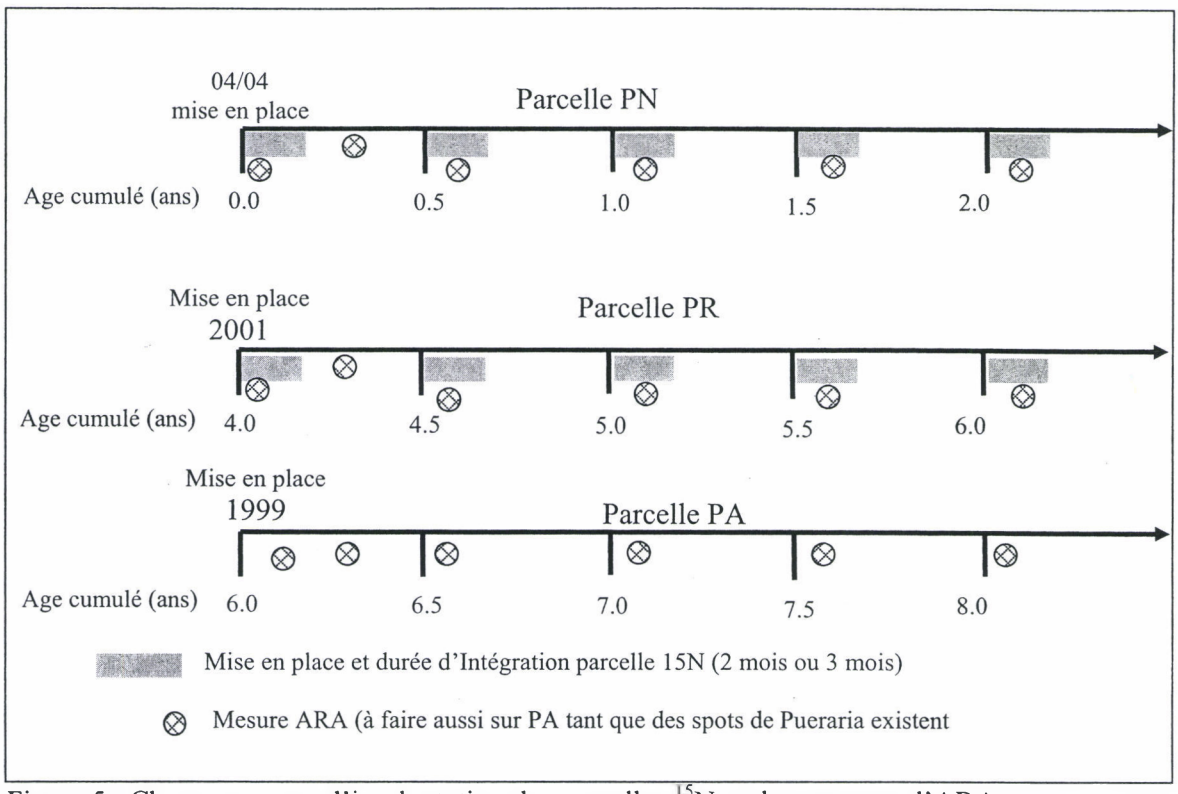


Figure 5 : Chronogramme d'implantation des parcelles ^{15}N et des mesures d'ARA

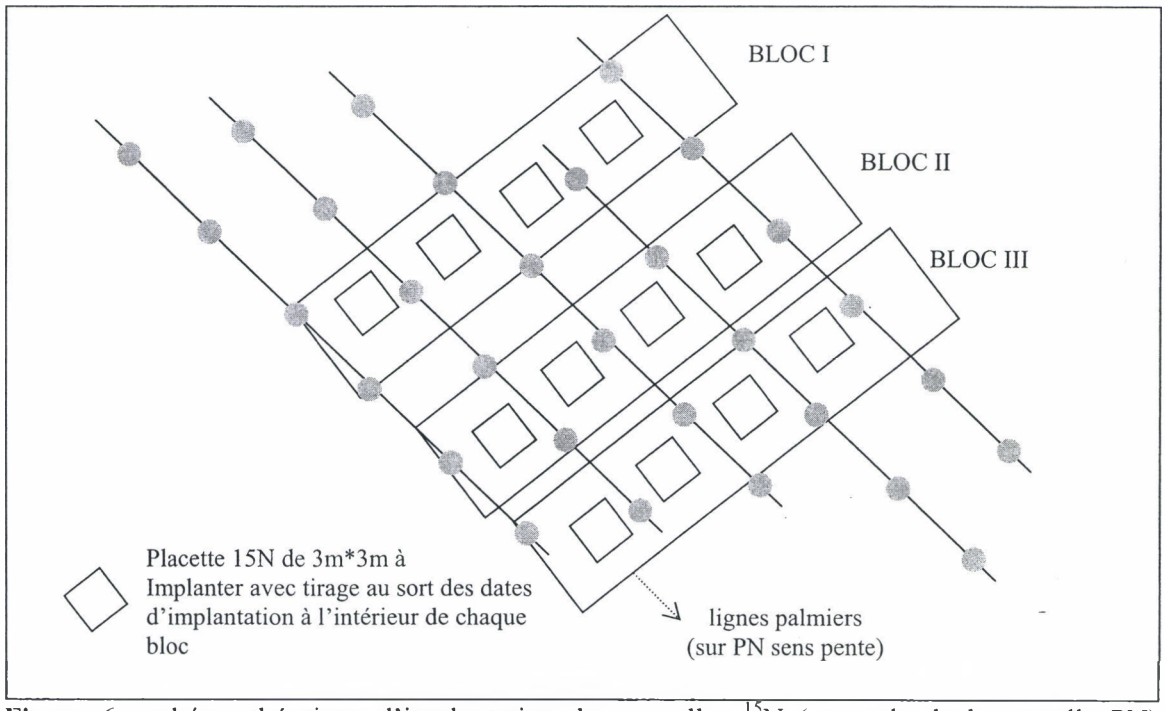


Figure 6 : schéma théorique d'implantation des parcelles ^{15}N (exemple de la parcelle PN) . L'affectation des dates d'implantation sera faite par tirage au sort lors de la prochaine mise en place. La parcelle utile est limitée à 1m*1m au centre de la parcelle ^{15}N

Annexe II

Extrait de : Utilisation des techniques nucléaires dans les études de fertilité du Sol et la Nutrition des Plantes (AIEA Training course Series14 Vienna 2001).
AIEA_1.pdf

- Annexe III :
- **Protocole de mesure de l'efficience des nodules par la réduction de l'acétylène** (Selon A. Galiana)
- Introduire les parties racinaires nodulées dans les flacons à sérum de 150 ml ;
- Fermer les flacons à sérum avec les bouchons et capsules appropriés ;
- Prélever 10% du volume d'air du flacon soit 15 ml à l'aide d'une seringue de 10 ml munie d'une grande aiguille (prise en 2 fois) et l'expulser ;
- Rajouter le même volume, soit 15 ml, d'acétylène (concentration finale de 10% d'acétylène) et laisser incuber les échantillons végétaux dans les bouteilles pendant plus de 40 minutes de telle sorte que 2 ml de mélange gazeux soient prélevés après 20 min d'incubation et encore 2 ml après 40 min d'incubation. Ces 2 x 2 ml de mélange gazeux prélevés à partir de chaque bouteille d'incubation seront introduits dans des vacutainers de 10 ml à l'aide de seringues de 10 ml munies de petites aiguilles après avoir ôté 2 ml d'air dans chacun (bien numéroter les échantillons et indiquer le temps d'incubation sur les étiquettes).
- Pour procéder à une série de 20 analyses ARA en un minimum de temps (à 2 personnes), rassembler d'abord tout le matériel végétal à analyser le plus vite possible, introduire les échantillons dans les différents flacons, les fermer, leur retirer 10% d'air et introduire l'acétylène toutes les minutes (il faut donc 20 min pour mettre l'acétylène dans tous les flacons), et ponctionner 2 ml de mélange d'incubation dans le 1er flacon à la 20ème minute après le début de l'injection de l'acétylène, puis la même chose à la 21ème minute pour le second flacon, etc.... Puis ponctionner à nouveau 2 ml de mélange gazeux d'incubation à la 40ème minute à partir du 1er flacon, etc... Ainsi, on peut analyser 20 échantillons en 1 heure avec cette méthode.
- Remarque :
  1) Pour des arbres en plantation, il est difficile de rassembler 20 échantillons rapidement à partir de prélèvements racinaires faits à la tarière ou tout autre moyen à moins d'avoir suffisamment de personnel et d'outillage. Pour des raisons de variation nycthémérale de l'activité ARA, il vaut mieux faire le maximum d'activités ARA sur un durée de temps la plus courte possible (3 heures par exemple) et à des heures régulières si on étale les manips sur quelques jours.
  2) Pour l'échantillonnage, on peut s'inspirer des méthodes utilisées dans la biblio jointe. On peut facilement les améliorer mais il faut rester réaliste en ne multipliant pas le nombre d'échantillons à analyser.

CIRAD-DIST
Unité bibliothèque
Lavalette