

# Institut de Recherche pour le Développement

I.R.D.

209-2

La Fayette 75480 Paris cedex 19, France

DATE D'ARRIVÉE : 9...

## RAPPORT DE STAGE



*Séjour Scientifique Courte Durée*

Programme : Diversité microbienne et Fixation  
Biologique de l'Azote  
Présenté par : El. Samba Ndao SYLA  
Institution : U.C.A.D., Dpt. B.V. Dakar, Sénégal  
Lieu de stage : LSTM, Baillarguet, Montpellier  
Durée de stage : 3 mois  
Responsable : Dr. Bernard Breyllus

1999

## Remerciements

*Nous voudrions particulièrement remercier l'IRD (ex ORSTOM) pour avoir entièrement financé travail.*

*Nous sommes redevables au Professeur Bernard Dreyfus Directeur du LSTM de nous avoir accueillis en stage et pour l'intérêt avec lequel il perçoit notre partenariat au sein de l'UMR 113 ainsi dans le cadre de l'UR 040.*

*Ce travail se résumerait en rien sans la collaboration exemplaire de l'ensemble de l'équipe du LSTM. Je ne pourrais fermer cette page sans nommer les membres du LSTM dont l'aide nous a été très précieux. Il s'agit de Eric Giraud, Yves Prin, Philipès de Lajudie, Nathalie Pujet, Clémence Chantreuil. Abdoulaye Sy et Salif Ba.*

## Présentation du LSTM

*Le L.S.T.M. "Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes" est un laboratoire mixte IRD/CIRAD/INRA/AGRO-Montpellier basé au centre Cirad de Baillarguet à Montpellier. Les recherches développées sont l'écologie, la biologie et l'utilisation des symbioses tropicales et méditerranéennes tant au niveau fondamental qu'au niveau appliqué. Elles sont en particulier orientées sur les symbioses rhizobium-légumineuses, les symbioses actinorhiziennes et les symbioses mycorhiziennes. Autour de ces thématiques le LSTM fédère avec d'autres partenaires au sein de l'Unité Mixte de Recherche N° 113 rattachée à la formation doctorale de Biologie Intégrative (Montpellier II - AGRO-M), labellisée par le MENRT comme UMR IRD/CIRAD/INRA/AGRO-Montpellier et dans le projet d'UR 040.*

*Le LSTM est à l'origine de plusieurs découvertes importantes concernant les symbioses Rhizobium-légumineuses en zone tropicale. Les recherches sont présentées sont axées sur la Diversité, les mécanismes et l'évolution des symbioses; les Interactions plantes-microorganismes-sols; et la Valorisation des symbioses dans les écosystèmes.*

*Le LSTM est doté d'un personnel de recherche ainsi que des équipements très performants et adaptés aux programmes en cours. Beaucoup de ces programmes sont exécutés en collaboration avec des partenaires du Sud. Elles ont souvent été valorisées par des publications communes. En même temps, cette collaboration a favorisé la formation permanente des partenaires du Sud à travers des séjours scientifiques de courte durée.*

## I - INTRODUCTION

Notre stage au Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes a duré trois mois, du 15 Juillet au 15 Septembre 1999. Ce stage qui a porté essentiellement sur la "**caractérisation des rhizobiums et l'ontogénèse des nodules chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens***" constitue une suite des travaux déjà réalisés à la session de Septembre-Octobre 1998 (Sylla et al. 98). Ce travail de recherche s'intègre dans le programme global ayant pour thème "**l'étude de la diversité microbienne et la fixation biologique de l'azote**" qui est développé au sein de l'UMR 113 basé au LSTM de Montpellier. Dans ce cadre, les résultats de recherche déjà obtenus sur la symbiose fixatrice d'azote chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens* au Sénégal ont permis:

- de disposer d'une collection 70 souches de rhizobium isolées de ces deux arbres à différents endroits de leur aire naturelle de répartition au Sénégal (Sylla et al. 1996);
- de révéler une diversité phénotypique chez les rhizobiums isolés des deux arbres (Sylla et al. 1997a);
- de sélectionner des souches de rhizobiums efficaces pouvant être proposées pour le développement (Sylla et al. 1997b);
- de déterminer le potentiel fixateur d'azote de la symbiose (Sylla et al. 1998a);
- d'aborder la caractérisation génotypique en utilisant les techniques de PCR - RFLP ainsi que le séquençage partiel du 16S rDNA des souches de rhizobiums (1999)

### *Objectifs spécifiques*

Le but de cette présente étude a été de poursuivre la caractérisation génotypique des rhizobiums et d'étudier l'ontogénèse des nodules.

## II - MATÉRIEL ET MÉTHODE

### II.1 - Caractérisation génotypique des rhizobiums

La caractérisation des rhizobiums a été effectuée par séquençage complet du gène 16S rDNA.

#### II.1.1. - Matériel biologique

Huit souches de rhizobium ont été utilisées. Ce sont des souches représentatives des différents groupes définis sur la base des études phénotypiques (Sylla *et al.* 1997a).

#### II.1.2. - Extraction d'ADN des rhizobiums

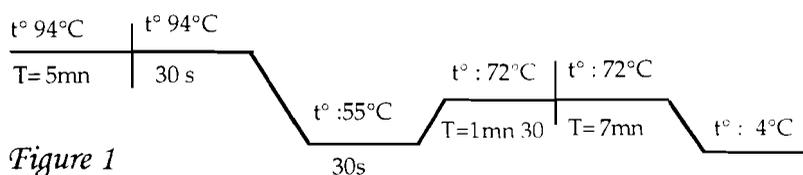
L'ADN génomique des souches a été obtenu par extraction au phénol chloroforme et traitement RNase, à partir de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance dans du YM (Vincent 1970). La pureté de l'ADN ainsi que les quantités obtenues ont été vérifiées par des mesures de DO (densité optique) à l'aide d'un spectromètre à la lumière UV (ultra violet).

#### II.1.3. - Obtention d'une matrice de 16S rADN

La réaction **PCR** permet la copie exponentielle de segments 16S d'ADN matrice. Elle s'effectue en présence d'une enzyme polymérase (la Taq polymérase), de dNTPS et de 2 fragments d'ADN de 20 à 30 mers tenant lieu d'amorce ou *primer* à l'activité enzymatique. Les oligonucléotides utilisés comme amorces sont la FGPS 6 (5'-GGAGAGTTAGATCTTG GCTCAG-3') et la FGPS 1509 (5'-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3').

Les étapes successives de la réaction d'amplification du fragment 16S (dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces, extension) sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur de type Perkin Elmer 2400.

Le profil PCR appliqué est le suivant:



L'amplification des fragments de 16S d'ADN a été mise en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Sigma type II). Un marqueur de poids

moléculaire (Smart Ladder) sert de témoins. En présence de bromure d'éthidium, les bandes 16 S sont révélées sous lumière UV et photographiées.

#### II.1.4. - Séquençage du 16S rDNA

Le **séquençage** du 16S rRNA (rDNA) des souches de rhizobius a été fait suivant la méthode de Sanger (1977). Elle est également dite méthode des terminateurs en chaîne. L'extraction et la purification du 16S rDNA a été faite suivant le protocole utilisant le kit QIAquick Gel Extraction (QIAquick Spin Handbook, 07/97). Le séquenceur utilisé est le modèle ABI 377 A DNA (Perkin Elmer Co.).

Les réactions de séquence ont été faites en utilisant six primers dont les niveaux d'intervention dans le segment 16S rDNA sont mentionnés dans la figure 2.

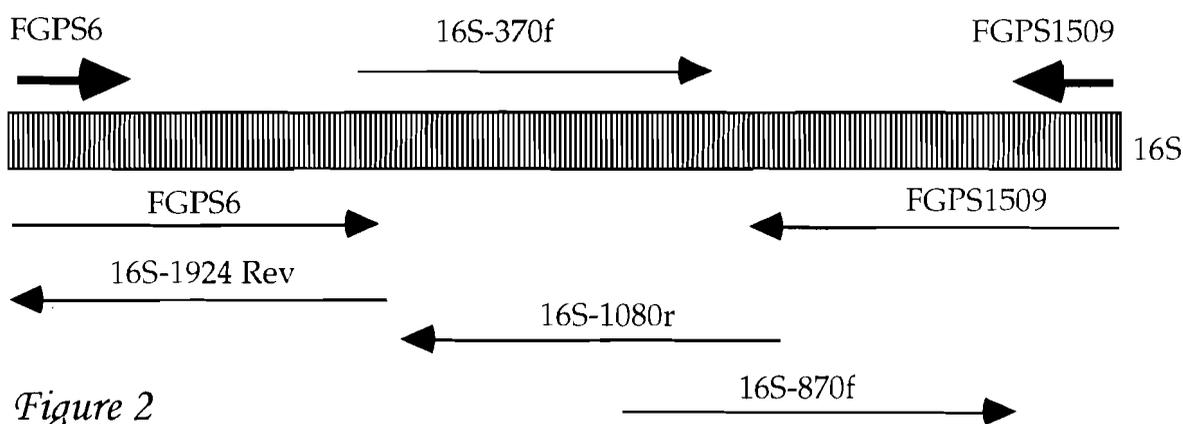


Figure 2

Les fragments de 16S rRNA séquençés sont ceux de 6 souches de rhizobiums représentatives des différents groupes définis sur la base des études phénotypiques (Sylla 1998b). Ces souches de rhizobiums sont les suivantes : ORS 199, ORS 206, ORS 207, ORS 214, ORS 217.

Les séquences obtenues ont été alignées en utilisant les logiciels G.C.G. (Genetics Computer Group, Wisconsin) du serveur Infobiogen. Elles ont été comparées à celles des souches de références disponibles dans la banque de données de Genbank.

## II.2. - Ontogénèse des nodules

### II.2.1 - Préparation des échantillons

## **II.2. - Ontogénèse des nodules**

### **II.2.1 - Préparation des échantillons**

Des tests d'inoculation ont été effectués chez des jeunes plants de *P. erinaceus* cultivés en tube, en condition aseptique et élevés en chambre de culture. Les conditions de prétraitement des graines ainsi que la prégermination sont celles décrites dans Sylla et al. 1996. Les jeunes plantes ont été inoculées avec la souche ORS 206 isolée de *P. erinaceus* au Sénégal. Elle a été choisie sur la base de son infectivité et de son effectivité en symbiose (Sylla et al. 1997b). Des plantes non inoculées ont servi de témoins.

### **II.2.2 - Prélèvement des nodules**

Dès l'apparition des premiers nodules qui coïncide avec le dix huitième jour après inoculation, les plantes sont régulièrement sacrifiées au rythme de 4 plantes par jour.

### **II.2.3 Fixation et inclusion**

Les nodules prélevés à différents stades de développement sont aussitôt mis dans du Bouin pendant plus de 72 heures pour la fixer des tissus .

### **II.2.4 - Déshydratation et inclusion**

Une fois fixés les nodules sont lavés à l'eau distillée puis déshydratés par des passages progressifs dans des solutions aqueuses de concentrations croissantes en ethanol (25%, 50%, 70%, 90% et ethanol pur). pendant 1h dans chaque solutions. Des séjour d'une nuit, dans un mélange de xylène et de parafine (v/v) ont précédé l'inclusion dans la parafine.

### **II.2.5 - Coupes transversales et observation microscopique**

A l'aide d'un microtome les échantillons de racines portant les nodules incluses dans la parafine sont finement coupées (7µm d'épaisseur). Les coupes sont ensuite débarassées de la parafine par des bains respectifs au xylène et à l'ethanol pur. L'étude structurale des nodules a été réalisée en utilisant des techniques de coloration classique au bleu de toluidine. Les observations ont été faites au microscope photonique.

### III - RÉSULTATS

#### III.1 - Caractérisation génotypique des rhizobiums

##### III.1.1 - Extraction d'ADN

Des extraits d'ADN génomique ont été obtenus pour 31 souches de rhizobium de *P. erinaceus* et *P. lucens*. Ces extraits sont stockés à - 20°C. Des quantités d'ADN ont été extraites de 5 souches représentatives des divers groupes de souches isolées de *P. erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal. Cet ADN a été purifié en vue des opérations d'hybridation ADN/ADN envisagées dans les perspectives (tableau 1 et figure 3).

**Tableau 1:** Estimation des quantités d'azote extraits de souches de rhizobium représentatives des divers groupes.

Souches	ADN extrait $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
ORS 196	0,545 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
ORS 199	0,334 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
ORS 207	0,498 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
ORS 214	0,802 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
ORS 217	0,699 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

##### III.1.2 - PCR

Des copies de fragments d'ADN 16S amplifiés ont été obtenus par PCR pour les 6 souches sélectionnées. L'électrophorèse sur gel d'agarose a permis la mise en évidence des bandes 16S. Les données (planche 1) montrent que pour toutes les souches utilisées, les bandes 16S ont le même poids moléculaire. Elles confortent la pureté des amplifiats du 16SADN.



Date: 02/09/99

Time: 11:00:56

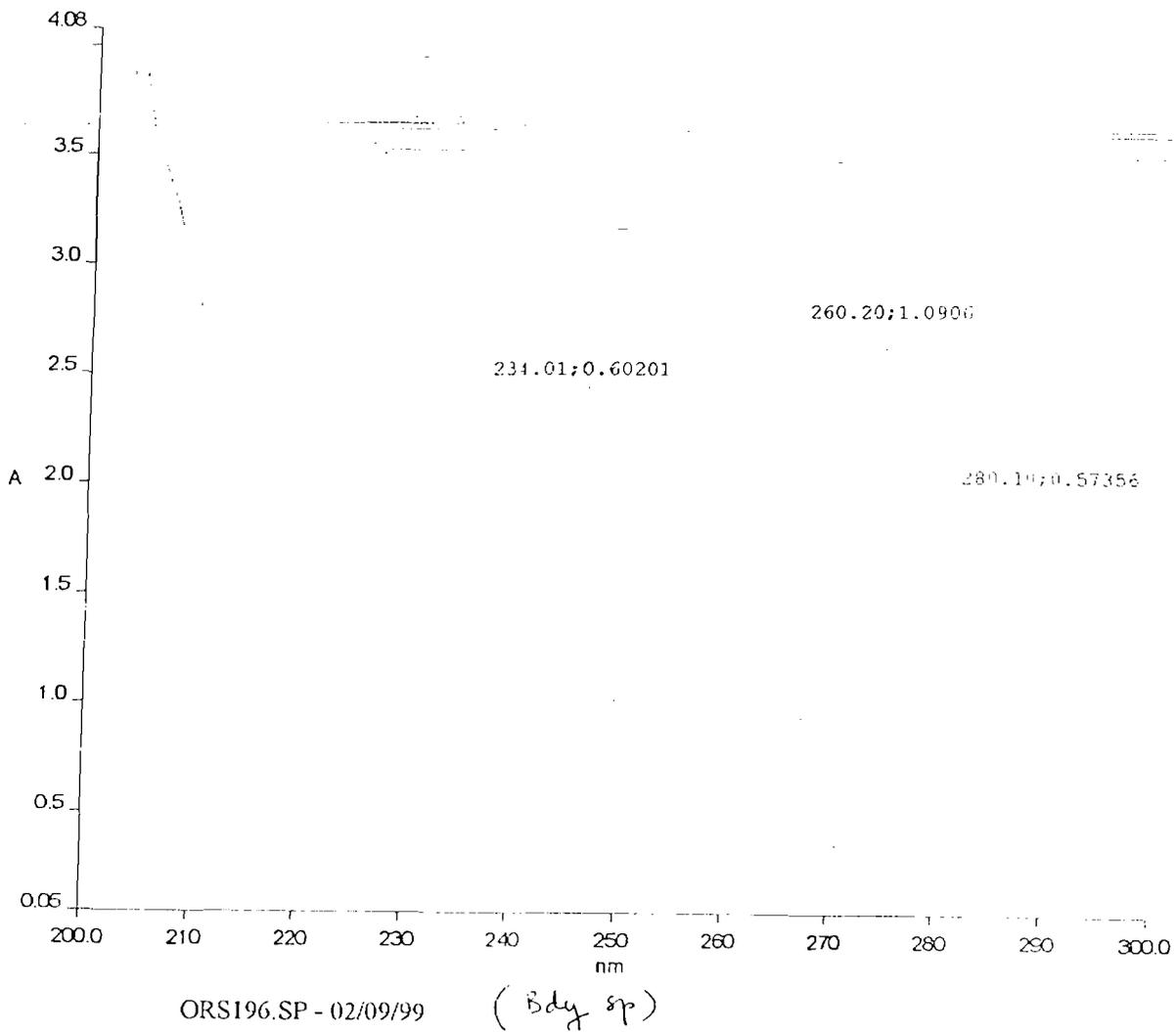


Fig. 3 : Mise en évidence de la pureté et quantification des des extraits d'ADN génomique par spectrométrie UV.

$$DO\ 234\text{nm} / DO\ 260\ \text{nm} = 0,55$$

$$DO\ 260\ \text{nm} / DO\ 280\ \text{nm} = 1,90$$

$$[ADN] = 0,545\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

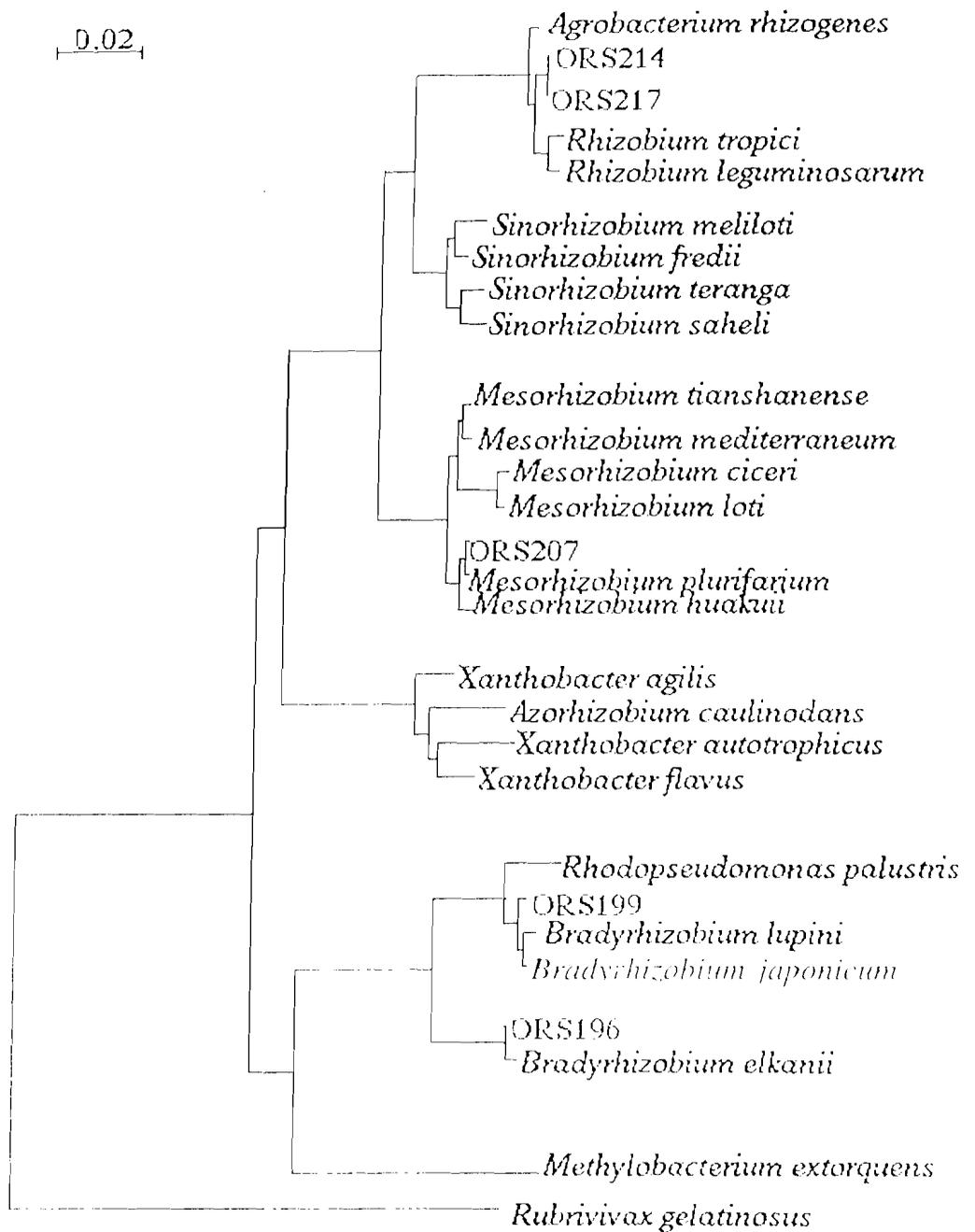


Figure 4: Arbre phylogénétique basé sur le séquençage complet du gène 16S rDNA

Des séquences complètes ont été obtenues (figure 2). Ces séquences concernent la totalité des 1500 paires de base du 16S rDNA des souches de rhizobium choisies. L'alignement des séquences et leur comparaison par rapport à celles des souches des souches disponibles dans la banque de données de Genbank montre une grande diversité des souches étudiées. Les souches ORS 214 et ORS 217 groupent avec *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* mais aussi avec *Agrobacterium rhizogenes*; la souche ORS 207 s'identifie à l'espèce *Mesorhizobium plurifarum*. La souche ORS 199 est très proche de la souche type de *Bradyrhizobium japonicum* et de la souche *B. lupini*. La souche ORS 196 isolée de *Pterocarpus erinaceus* s'identifie à l'espèce *B. elkanii*.

### **III.2 - Étude de l'infection et ontogénèse des nodules**

Au total 250 lames ont été préparées pour les observations microscopiques. Ces lames portent des coupes de nodules à différents stades de leur développement. Les résultats de ces observations sont présentés dans la planche 2. Les premiers nodules observés apparaissent au bout de 18 jours après l'inoculation. Ils sont tous localisés sur la racine pivotante et seulement à 1 à 2 cm en dessous du collet. Ce sont des nodules de forme sphériques dites type déterminés. Nous n'avons pu remarquer aucune déformation au niveau des poils absorbant. Les observations préliminaires, *in situ* effectuées à la loupe ont permis de situer les ébauches des nodules ( photo 1 ) à l'aisselle des racines secondaires. Elles correspondent à des sites d'infection observables chez les plantes témoins non inoculées (photo 2 ). Dans le cas de toutes les observations effectuées, le processus d'infection est de type intracellulaire (photo 3), vraisemblablement elle se passe entre deux poils absorbants, un poil absorbant et une cellule épidermique ou deux cellules épidermiques qui sont adjacentes. Egalement la microscopie photonique révèle la présence de poches d'accumulation des bactérioides. Des invaginations en doigt de gants sont issues de ces poches. Plus tard elles induisent à la prolifération des cellules méristématiques du cortex racinaire. Une semaine après l'apparition des premiers nodules la croissance des nodules accompagne la différenciation des tissus laissant entrevoir une zone d'activité nitrégénase (zone de fixation d'azote) au centre du nodule (photo 4), une zone périphérique de forte activité méristématique et une zone intermédiaire enrichie en cordons d'infection.

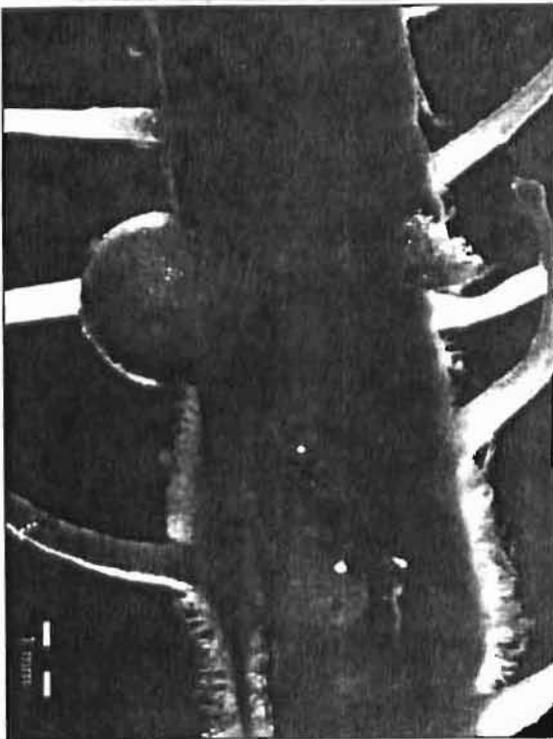


Photo 1: Jeune nodule de *P. erinaceus* agé de 18 jours



Photo 2: sites d'infection à 18 jours après inoculation

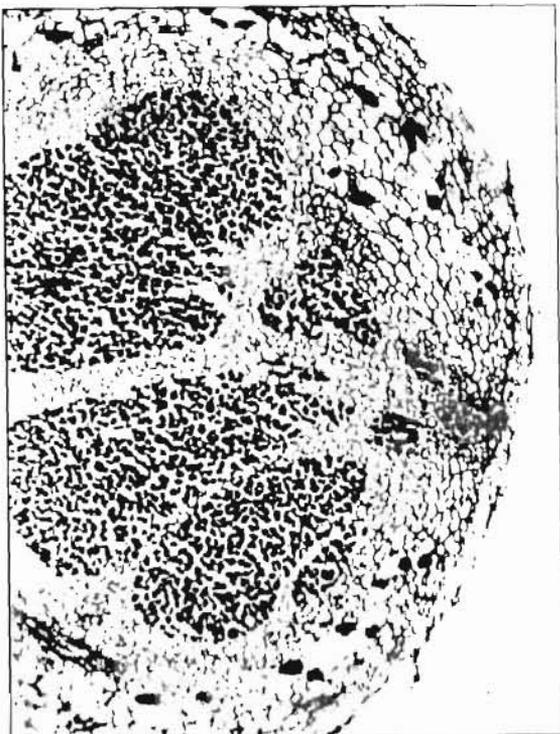


Photo 3: Coupe transversale de nodule à 18 jours GX100

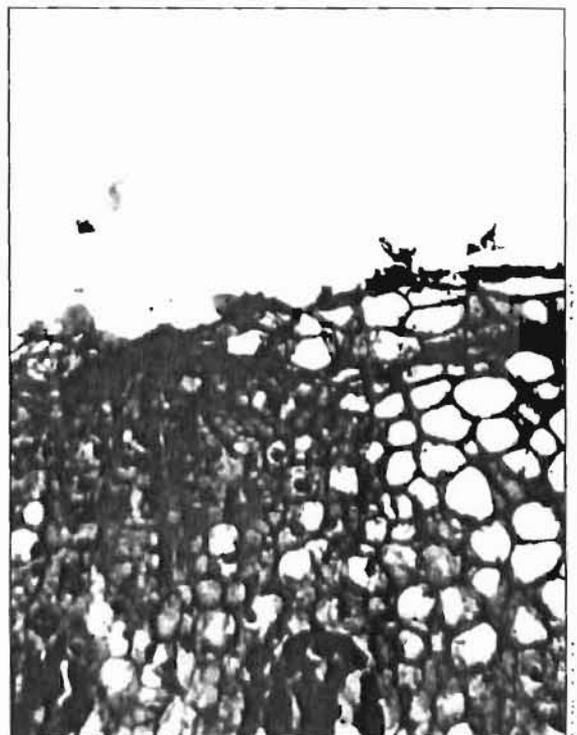


Photo 4: Coupe transversale de nodule à 18 jours GX400

plaque 2

#### **IV - DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES**

Les résultats de séquençage complet (1500 paires de bases) de la portion 16S de l'ADN des souches sont similaires à ceux du séquençage partiel (400 premières pb) obtenu dans les études précédentes (sylla 1998). Ils confirment la caractérisation phénotypique en distinguant un groupe de souches à croissance rapide qui ne s'identifient à aucune espèce de référence et donc susceptibles de constituer un groupe nouveau. Les expériences d'hybridation ADN/ADN (en cours) devraient permettre de préciser la phylogénie de ces souches.

Les stades présidant l'infection et l'apparition des nodules sont observés. Les ébauches de nodule sont circonscrites à l'aisselle de ces poils absorbants et seulement au niveau de la racine principale. D'une certaine manière, le processus d'infection au niveau des racines ressemble à ceux décrits chez d'autres légumineuses tropicales telle *Sesbania rostrata* (Ndoye et al. 1994). L'étude histologique en microscopie photonique mérite d'être élucidée par des études ultrastructurales, en microscopie électronique.

Dans l'ensemble les études que nous avons effectuées dans le cadre de la symbioses chez

#### **V - VALORISATION**

Ce travail, dans l'ensemble a fait l'objet de deux communications présentées au VIIIème congré de l'AAFBA (Association Africaine pour la Fixation Biologique de l'Azote), Novembre - Décembre 1998 à Capetown et d'un poster présenté au Congrè International sur la Fixation Biologique de L'azote, 12 au 17 Septembre 1999, Foz do Iguacu, Paraná, Brésil (voir poster annexé).

L'ensemble de ce travail entre dans le cadre de mon programme de thèse de Doctorat d'état à l'UCAD de Dakar.

#### **VI - AUTRES ACTIVITÉS**

L'occasion de ce séjour m'a permis : (1) de faire la mise au point sur l'état d'avancement de mes travaux avec mon Directeur de Thèse et d'en dresser les perspectives, (2) de discuter de mes travaux de recherche avec d'autres chercheurs qui travaillent dans le même domaine, (3) de consulter les banques de données disponibles sur la Foresterie, l'Agroforesterie, la biologie moléculaire et la microbiologie des sols en zone tropicale (4) de préparer un projet d'article sur la "Caractérisation des rhizobiums isolés de *Pterocarpus erinaceus* et de *P. lucens* au Sénégal".

## Références

- Ndoye I., F. de Billy, J. Vasse, B. Dreyfus et G. Truchet (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *Journal of Bacteriology*. vol. 176, N° 4.
- Sylla S. N. (1996). Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Thèse de Doctorat de troisième cycle, Université Cheikh Anta Diop, Dakar.
- Sylla S. N., Ndoye I, Ba A. T. et Dreyfus B. (1997a). Spécificité de la symbiose chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire* T. 49, Sér. A, n° 1, pp. 17-36.
- Sylla S. N., Ndoye I, Ba A. T. et Dreyfus B. (1997b). Potentiel fixateur d'azote de la symbiose Rhizobium-*Pterocarpus*. *Annales de la Faculté des Sciences et Techniques UCAD*. B2 (1) pp. 11-19
- Sylla S. N., Ndoye I., Ba A. T. Gueye M. et Dreyfus B. (1998a). Assessment of Nitrogen fixation in *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens* using the <sup>15</sup>N labelling methods. *Arid Soil Research and Rehabilitation* vol. 12 (3).
- Sylla S. N., I. Ndoye, P. de Lajudie, A. T. Ba, M. Neyra and Dreyfus B. (1998). Phenotypic diversity of rhizobia isolated from *Pterocarpus erinaceus* (Poir.) and *Pterocarpus lucens* (Lepr.) in Senegal. Eighth congress of the African Association for Biological Nitrogen Fixation; "Biological nitrogen fixation in Africa: linking process to progress". 23 - 27 November, Capetown.
- Sylla S.N. (1999a). Caractérisation des rhizobiums isolés de *Pterocarpus erinaceus* (Poir.) de *Pterocarpus lucens* (Lepr.) par RFLP et séquençage partiel du 16S rDNA. Rapport de stage, Séjour Scientifique Haut Niveau, 15 Septembre-15 Décembre 1998, LSTM, IRD, Montpellier, France.
- Sylla S.N., I. Ndoye, A.T. Ba, M. Neyra, M. Gillis, E. Giraud, P. de Lajudie and B. Dreyfus (1999b). Diversity of rhizobia isolated from *Pterocarpus erinaceus* (Poir.) and *Pterocarpus lucens* (Lepr.) and nitrogen fixing potential of symbiosis. 12th International Congress on Nitrogen Fixation, September 12th to 17th, Foz do Iguacu, Paraná, Brasil.

# Diversity of rhizobia isolated from *Pterocarpus erinaceus* (Poir.) and *Pterocarpus lucens* (Lepr.) and nitrogen fixing potential of symbiosis

S.N. Sylla<sup>1</sup>, I. Ndoye<sup>1</sup>, A.T. Ba<sup>1</sup>, M. Neyra<sup>2</sup>, M. Gillis<sup>3</sup>, E. Giraud<sup>4</sup>, P. de Lajudie<sup>3</sup>, B. Dreyfus<sup>4</sup>

1. Département de biologie végétale, Ucad, Dakar, Senegal
2. Laboratoire de microbiologie, Ird, Dakar, Senegal
3. Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium
4. Lstm, Ird-Cirad, Campus international de Baillarguet, 34032 Montpellier Cedex 1, France



*Pterocarpus erinaceus* Poir.

## Introduction

*Pterocarpus erinaceus* and *Pterocarpus lucens* are tropical nitrogen fixing trees having a great economic importance in the sahelian zone. Recent studies showed that both species are nodulated by fast- and slow-growing rhizobia (Sylla, 1996).

We report here on (1) the phenotypic and genotypic characterization of rhizobia isolated from both *Pterocarpus* species and on (2) the nitrogen fixing potential (NFP) of the symbiosis *Pterocarpus*-rhizobium.



*Pterocarpus lucens* Lepr.



In vitro nodulation of *Pterocarpus lucens*.

## Material and methods

### 1 - Characterization of rhizobia

Phenotypic characterization was performed by comparative SDS-PAGE of whole-cell proteins (Dupuy *et al.*, 1994). This study included 45 strains isolated from *P. erinaceus* and *P. lucens* in Senegal and 67 reference strains.

Five representative strains of the phenotypic groups identified by SDS-PAGE were genetically characterized by full-length 16S rDNA gene sequence analysis. Sequence alignment and phylogenetic tree construction were performed using the Genetic Computer Group Package.

### 2 - Assessment of nitrogen fixing potential

Greenhouse experiment was conducted using both A-value (Fried and Broeschart, 1975) and direct <sup>15</sup>N isotope dilution techniques (Fried and Middleboe, 1977). *Dialium guineense* served as a non-nodulating reference plant.

Seven months after planting, total N and <sup>15</sup>N ratio in plant were estimated and data analysed (ANOVA) using a PC statistical package (STATITCF).

## Results and discussion

SDS-PAGE analysis showed that:

- slow-growing strains from *Pterocarpus* spp. grouped in the *Bradyrhizobium* cluster identified by Moreira *et al.* (1993) and Dupuy *et al.* (1994), including *Bradyrhizobium japonicum* strain NZP 5549T (Figure 1);
- fast-growing strains grouped in *Mesorhizobium* and *Rhizobium* clusters (Figure 1).

Genotypic characterization confirms phenotypic analysis. Indeed, it appears that the slow-growing rhizobia isolated from *Pterocarpus* are closely related to *Bradyrhizobium* sp. *lupinus*, *Bradyrhizobium japonicum* or *Bradyrhizobium elkanii*, while the fast-growing rhizobia are closely related to *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici* and *Mesorhizobium plurifarium* species (Figure 2).

The two N<sub>2</sub> estimation methods gave similar results.

For both of the plant species the %Nd<sub>2</sub> was in the range of 35% in plant; 60% of N contained in plants was derived from soil. Results were similar to those obtained in *Acacia albida* (Ndoye *et al.*, 1995). The high contribution of soil could be explained by relatively high content of available N in the soil. Total N fixed in the whole plant was: 150 mg plant<sup>-1</sup>. This value is lower than that reported for *Acacia* species (Ndoye *et al.*, 1995). Thus *Pterocarpus* species should be considered as leguminous with low NFP. Consequently, further screening of *Pterocarpus* species for high NFP is needed. Screening procedure should be based on the selection of provenances (Figure 3).

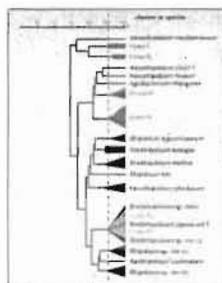


Figure 1: Phenotypic diversity based on SDS-PAGE protein analysis.



Figure 2: Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence.

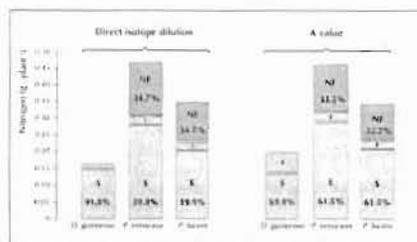


Figure 3: Contribution of soil (S) fertilizer (F) and nitrogen fixation (NF) to N<sub>2</sub> nutrition of *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens*.

## References

- Dupuy *et al.*, 1994. International Journal of Systematic Bacteriology, 44 (3): 461-473.  
 Fried and Middleboe, 1977. Plant and Soil, 40: 713-715.  
 Fried and Broeschart, 1975. Plant and Soil, 43: 707-711.  
 Moreira *et al.*, 1993. Systematic and Applied Microbiology, 16: 135-146.  
 Ndoye *et al.*, 1995. Plant and Soil, 172: 175-180.  
 Sylla S.N., 1996. Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote chez *Pterocarpus erinaceus* et *P. lucens*. Thèse de doctorat, Université CAD, Dakar, Senegal.

## Acknowledgements

This study was supported by a grant from International Foundation of Science, Stockholm, Sweden.

We thank Embrapa/CNPBS Laboratory Rio de Janeiro, Brasil, for the <sup>15</sup>N analyses.



Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement