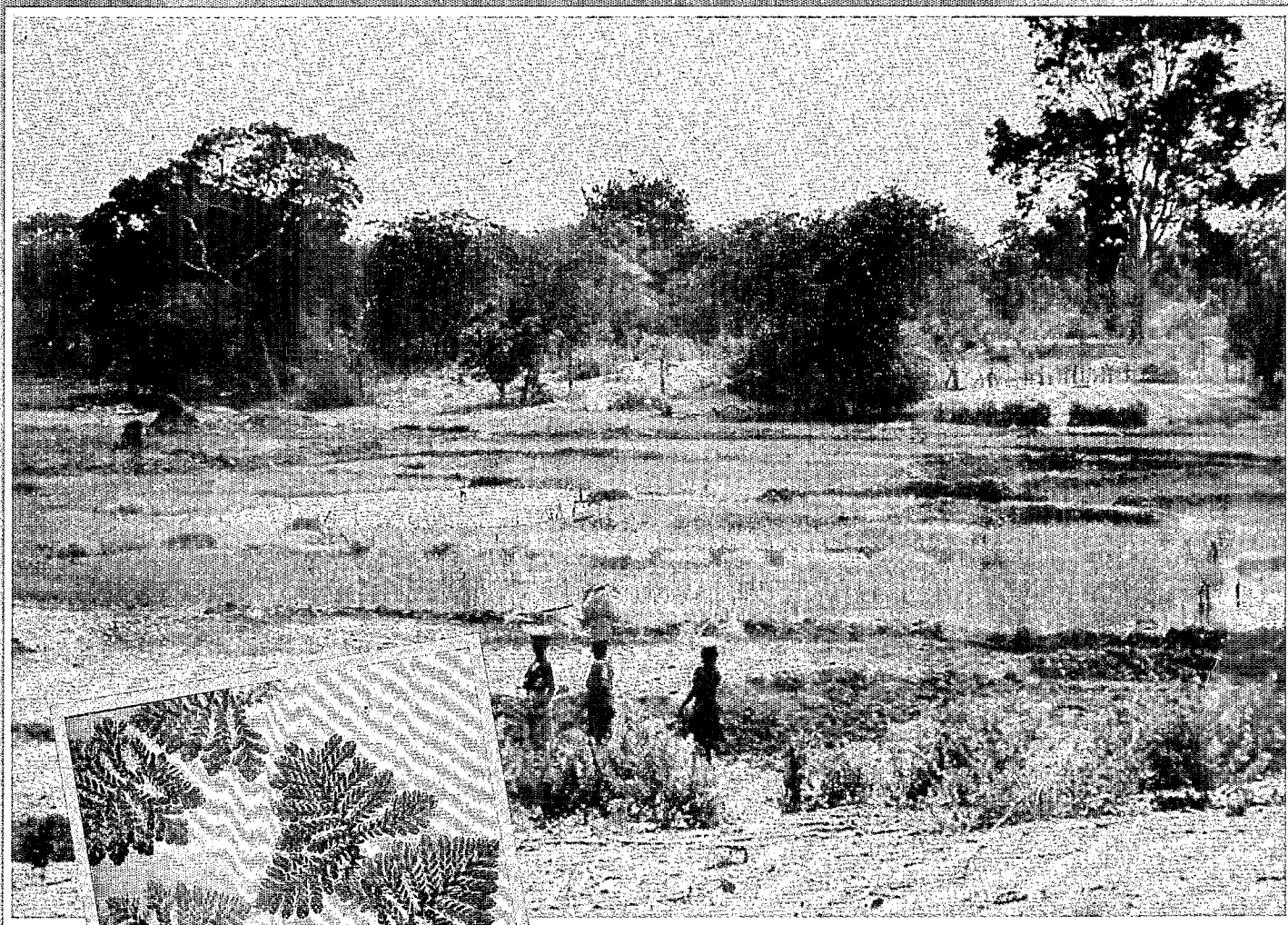


P.A. REYNAUD
C. FRANCHE
Microbiologie. B.P. 1386, Dakar, Sénégal

AZOLLA PINNATA VAR. AFRICANA

“de la biologie moléculaire aux applications agronomiques”

“from molecular biology to use as a green manure”



ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 22.032 ex 1

Cote : B

ORSTOM

Photo de couverture:
Rizière dans la vallée
de Koular (Sénégal)

Rice paddy field in
the koular valley
(Sénégal, W-Africa).

A. Pinnata var.
Africana du Sénégal.

A. Pinnata var.
Africana isolated in
Sénégal.

SOMMAIRE

- 1 - Introduction
- 2 - Présentation du partenaire
plante : Azolla pinnata
 - 2.1 - Taxonomie. Distribution
géographique
 - 2.2 - Morphologie
 - 2.3 - Le cycle de reproduction
 - 2.4 - Écophysiologie
- 3 - Présentation du
microorganisme fixateur
d'azote, Anabaena azollae
 - 3.1 - Localisation
 - 3.2 - Morphologie
 - 3.3 - Taxonomie moléculaire
- 4 - Azolla pinnata var. africana,
engrais vert
 - 4.1 - De la biotechnologie sans
le savoir
 - 4.2 - Les essais agronomiques
 - 4.3 - Les problèmes posés par
la culture d'Azolla
africana.
5. Conclusions :
Azolla, une réalité solide, un
futur prometteur

CONTENTS

- 1 - Introduction
- 2 - Presentation of the plant,
Azolla pinnata
 - 2.1 - Taxonomy . Geographic
distribution
 - 2.2 - Morphology
 - 2.3 - Reproduction cycle
 - 2.4 - Ecophysiology
- 3 - Presentation of the nitrogen-
fixing symbiont, Anabaena
azollae
 - 3.1 - Localisation
 - 3.2 - Morphology
 - 3.3 - Molecular taxonomy
- 4 - Azolla pinnata var.
africana, green manure
 - 4.1 - Unconsciencous
biotechnology
 - 4.2 - What can be concluded
from agronomic trials
 - 4.3 - Problems encountered in
Azolla cultivation
- 5 - Conclusion
Azolla, a secure present,
a wide future

INTRODUCTION

En Afrique, le riz constitue une des denrées de base de l'alimentation. Sa culture, traditionnellement effectuée par les femmes, a peu évolué depuis des siècles. Dans les sols africains, l'apport d'engrais étant limité à une fumure organique plus ou moins régulière, les rendements en grain sont rarement supérieurs à 2 tonnes/ha. Cependant l'azote d'origine minérale est trop coûteux et trop peu disponible pour la paysanne africaine ; il est économiquement plus intéressant de chercher une source d'azote biologique.

L'objet de cette plaquette n'est pas de démontrer catégoriquement l'intérêt d'une nouvelle technologie indispensable pour l'avenir du paysannat dans les pays à faible rendement rizicole. Nous l'avons conçue comme un résumé exhaustif des connaissances sur une symbiose fixatrice d'azote peu connue : l'association Azolla-Anabaena, en choisissant comme exemple la variété africaine, pour exposer les perspectives de développement et de recherche qu'elle apporte.

Azolla est une fougère aquatique, flottant à la surface des eaux calmes, tempérées ou tropicales. Elle abrite une cyanobactérie du genre Anabaena qui a la propriété de fixer l'azote, c'est-à-dire de transformer l'azote moléculaire de l'atmosphère en azote fixé assimilable par la plante. La présence d'Azolla dans les rizières permet l'apport de composés organiques et azotés et contribue à la fertilisation des sols.

Rice is one of the staple foods in Africa. Traditionally, rice is cultivated by women. Little progress has been made in African rice cultivation through the centuries. The problem has been addressed by African agronomists in the 1980's. Grain yields have scarcely been above two tons per hectare in the past because of nutrient shortages, traditionally limited to cattle manure. Chemical fertilizers are effective but are too expensive and unavailable for common use by peasants, therefore, it is of economic interest to investigate biological sources of nitrogen.

The purpose of this paper is to summarize the knowledge about a well known nitrogen-fixing symbiosis, the Azolla-Anabaena association. We have chosen the African variety to illustrate research and development of this biological resource and to judge its potential as a green manure.

Azolla is an aquatic Pteridophyte (from Greek pteris : fern) found on the surfaces of quiet freshwaters in both tropical and temperate regions. It lives in symbiosis with a cyanobacterium of the genus Anabaena. This symbiont fixes nitrogen, i.e. it transforms molecular nitrogen into fixed nitrogen available to plants. Thus, the incorporation of Azolla in rice cultivation adds nitrogen and organic compounds and contributes significantly to soil fertility.

*La récolte
du riz
en Casamance*

*Rice
harvest
in
Casamance*

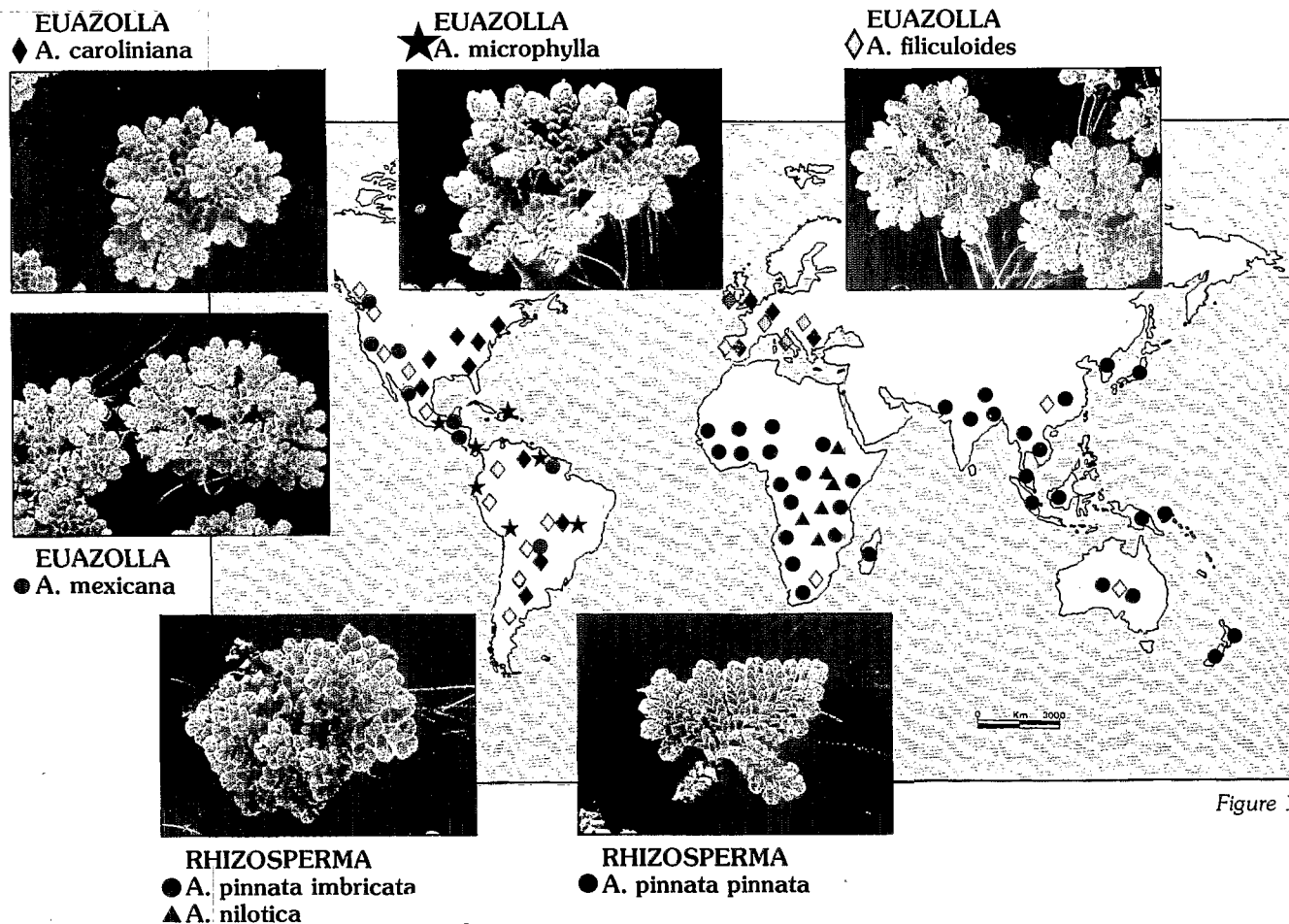


Figure 1

2. PRÉSENTATION DU PARTENAIRE PLANTE : AZOLLA PINNATA

2.1 Taxonomie. Distribution géographique

Figure 1 :
Distribution
géographique
actuelle des
six espèces
d'*Azolla*.

Figure 2 :
Morphologie des
frondes d'*Azolla*
pinnata var. *africana*
a : vue générale de la
fronde
b : jeune racine
pourvue d'une coiffe
c : lobes dorsaux qui
contiennent le
microorganisme
fixateur d'azote
d : lobe ventral
achlorophyllien.

Le genre *Azolla* appartient à la division des Ptéridophytes, ordre des Salviniales, famille des *Azollaceae*. Il existe 6 espèces, qui, en fonction de critères morphologiques (morphologie des formes végétatives – frondes – et des organes reproducteurs), sont divisées en deux sections : les *Euazolla* et les *Rhizosperma*.

La première section comprend quatre espèces originaires d'Amérique : *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* ; la seconde comprend deux espèces originaires d'Afrique et d'Asie : *A. nilotica* et *A. pinnata* (Fig. 1). L'homme a, depuis le XIX^e siècle, dispersé ces ptéridophytes, particulièrement *A. caroliniana* et *A. filiculoides*. La variété d'*A. pinnata* étudiée ici est localisée en Afrique subsaharienne. Elle a été dénommée en Asie var. *pinnata* par BROWN (1810) et var. *africana* par DES-

VAUX (1827) en Afrique ; nous utiliserons cette dernière terminologie.

2.2 Morphologie

Les frondes d'*A. pinnata* var. *africana* mesurent de 1 à 3 cm. Elles sont constituées d'un rhizome principal qui porte des ramifications secondaires elles-mêmes porteuses de rhizomes près de l'extrémité en dégénérescence. L'ensemble présente un aspect triangulaire auriculé (figure 2 a). Les racines adventives de 1 à 3 cm de long, couvertes de poils absorbants disposés en touffes, possédant une longue coiffe, se trouvent sous les rameaux secondaires (figure 2 b).

Les feuilles d'*Azolla* sont composées de deux lobes : un lobe dorsal chlorophyllien qui contient dans une cavité le microorganisme fixateur d'azote (figure 2 c) et un lobe ventral qui assure la flottaison de la fronde (figure 2 d).

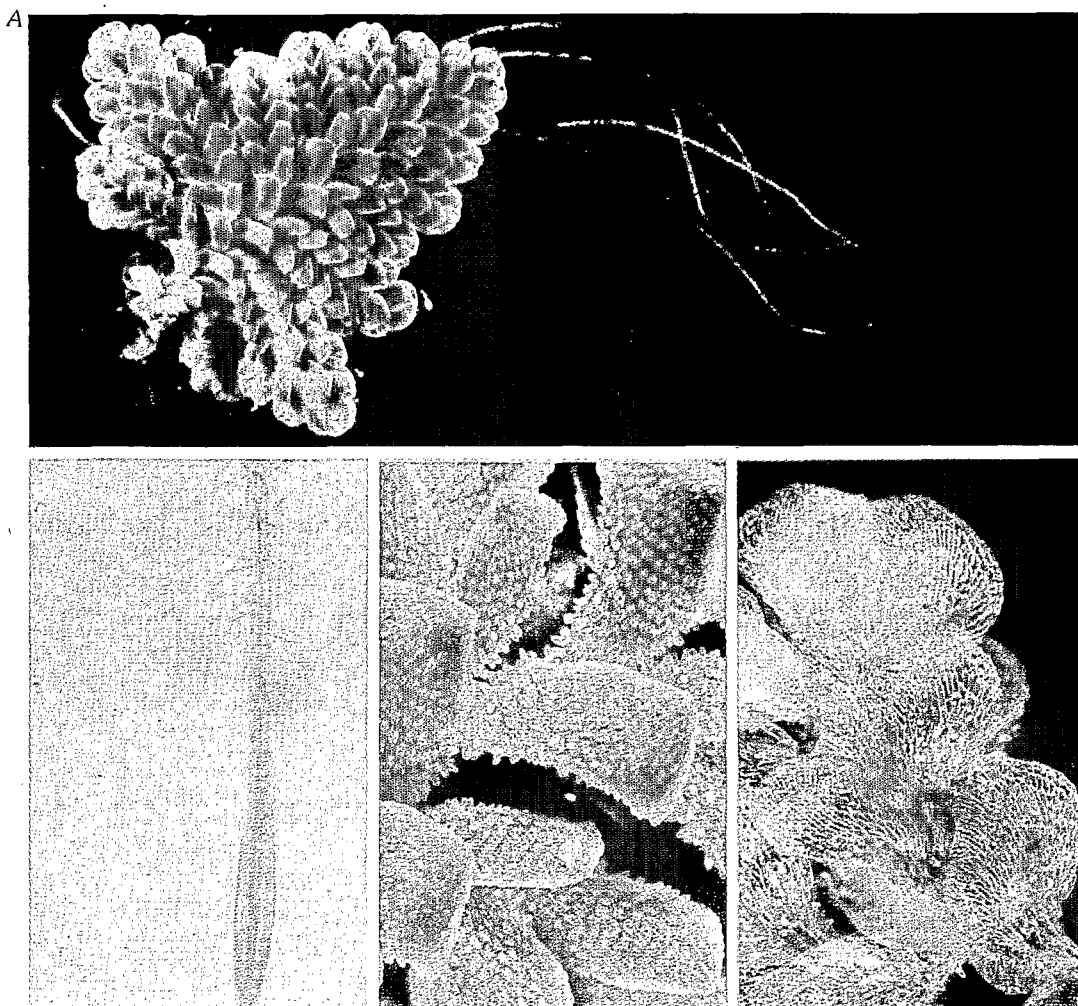


Figure 1 :
geographic
distribution of the six
extant *Azolla* species.



Figure 2 :
Morphology of
A. pinnata var.
africana fern :
a : general view of a
frond ;
b : young root with a
cap ;
c : dorsal lobes which
contain the nitrogen-
fixing microorganism ;
d : ventral
achlorophyllous lobe

2. PRESENTATION OF THE PLANT, AZOLLA PINNATA

2.1 Taxonomy. Geographic distribution

The genus *Azolla* belongs to the division Pteridophyte, in the order Salviniaceae, and the monotypic family Azollaceae. There are six extant species of *Azolla* which are divided into two sections, *Euazolla* and *Rhizosperma*, according to morphological criteria (frond morphology and reproductive features). *Euazolla* section includes four species native to the New World : *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana* and *A. microphylla* ; two species native to the old world (Asia and Africa), *A. nilotica* and *A. pinnata* var. *pinnata* or var. *imbricata* belong to the *Rhizosperma* section.

Figure 1 presents the actual geographic distribution of the six *Azolla* species. Since the 19th century, man has led to a dispersal of

the six species throughout the world, specially of *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. The variety presented here is located in sub-sahelian Africa.

2.2 Morphology

Azolla pinnata var. *africana* fronds are 1 to 3 cm long and have a characteristic triangular shape (figure 2 a). They harbour a main rhizome bearing secondary and tertiary ramifications. Along the rhizome are found adventitious roots which are 1 to 3 cm long and bear root hairs (figure 2 b). *Azolla* leaves consist of two lobes ; a thick chlorophyllous dorsal lobe which contains in a cavity the nitrogen-fixing organism (figure 2 c) and a thin ventral lobe which provides buoyancy of the fern (figure 2 d).

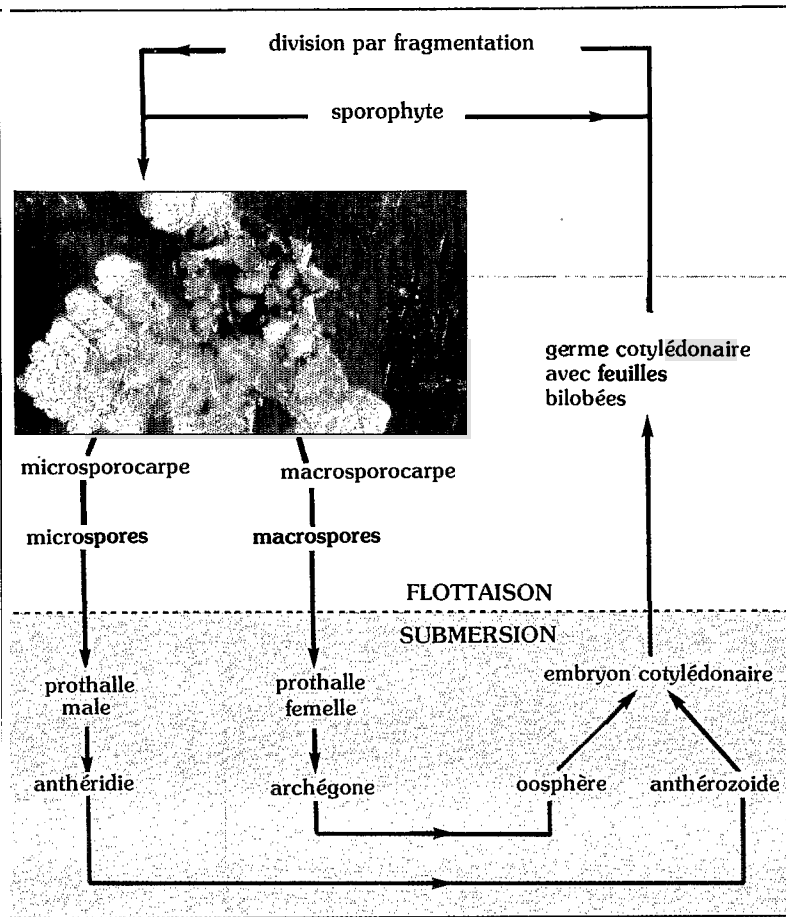


Figure 3

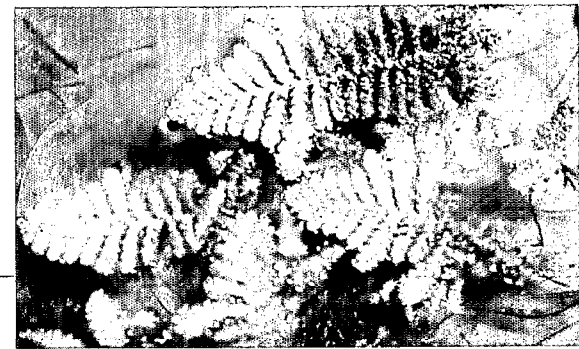
Figure 3 :
Cycle de reproduction
d'*Azolla*

Figure 4 :
Réactions
morphologiques
d'*Azolla pinnata* var.
africana après
15 jours de culture
dans des milieux
carencés en
phosphore (A),
magnésium (B), fer
(C), potassium (D),
calcium (E).
F : culture témoin
en milieu complet,
G : culture en
eau distillée.

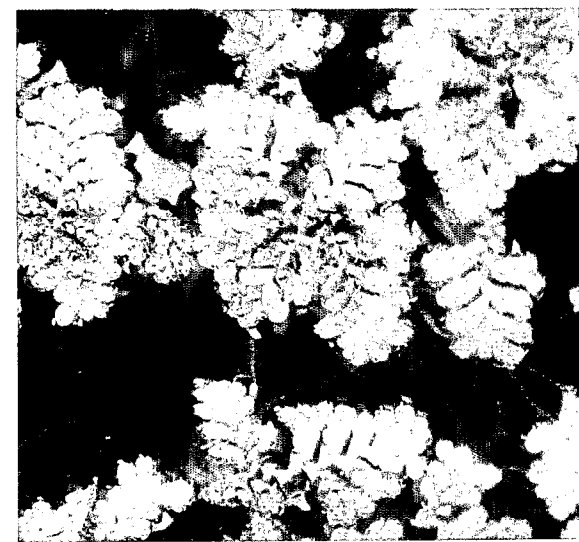
2.3 Le cycle de reproduction

Comme pour toutes les fougères, on distingue pour *Azolla* une reproduction végétative et une reproduction sexuée. Dans les conditions de reproduction végétative, lorsque la fougère atteint environ 1 à 2 cm de diamètre, les ramifications les plus âgées se détachent et donnent naissance à des frondes isolées plus petites. Durant cette phase, l'*Anabaena* se reproduit de façon synchrone avec l'hôte. Dans les conditions optimales de croissance végétative, le temps de doublement (poids sec) est de 2,5 jours pour *A. pinnata* var-*africana*.

Lorsque les conditions environnantes deviennent défavorables, le cycle de reproduction sexuée est initié. Il se forme sous la fougère des spores mâles (mégaspores) et des spores femelles (microspores) qui constituent des formes de survie d'*Azolla* (Figure 3). La fécondation du gamète femelle par le gamète mâle redonne naissance à une jeune plantule. Durant cette phase, la continuité de l'association entre la ptéridophyte et la cyanobactérie est assurée



A



E

Figure 4

par la présence de spores d'*Anabaena* (ou akinètes) dans les mégaspores d'*Azolla*.

2.4 Écophysiologie

Les conditions de la croissance d'*Azolla* sont hiérarchisées de la façon suivante :

- une bonne maîtrise de l'eau
- une protection contre les hautes intensités lumineuses
- des températures minimales de 15° C la nuit, 25° C le jour et maximales de 35° C
- un apport de phosphore
- et, à un degré moindre, de calcium, de magnésium et d'oligo-éléments
- une protection antiparasitaire.

Une propriété remarquable d'*Azolla* est de réagir par des changements morphologiques à des conditions défavorables : elle deviendra rouge pourpre lorsque l'intensité lumineuse sera trop forte, ou prendra l'un des aspects montrés figure 4 lorsqu'elle sera carencée en un élément nutritif. Il sera assez simple de remédier de façon adéquate au stress ainsi défini.

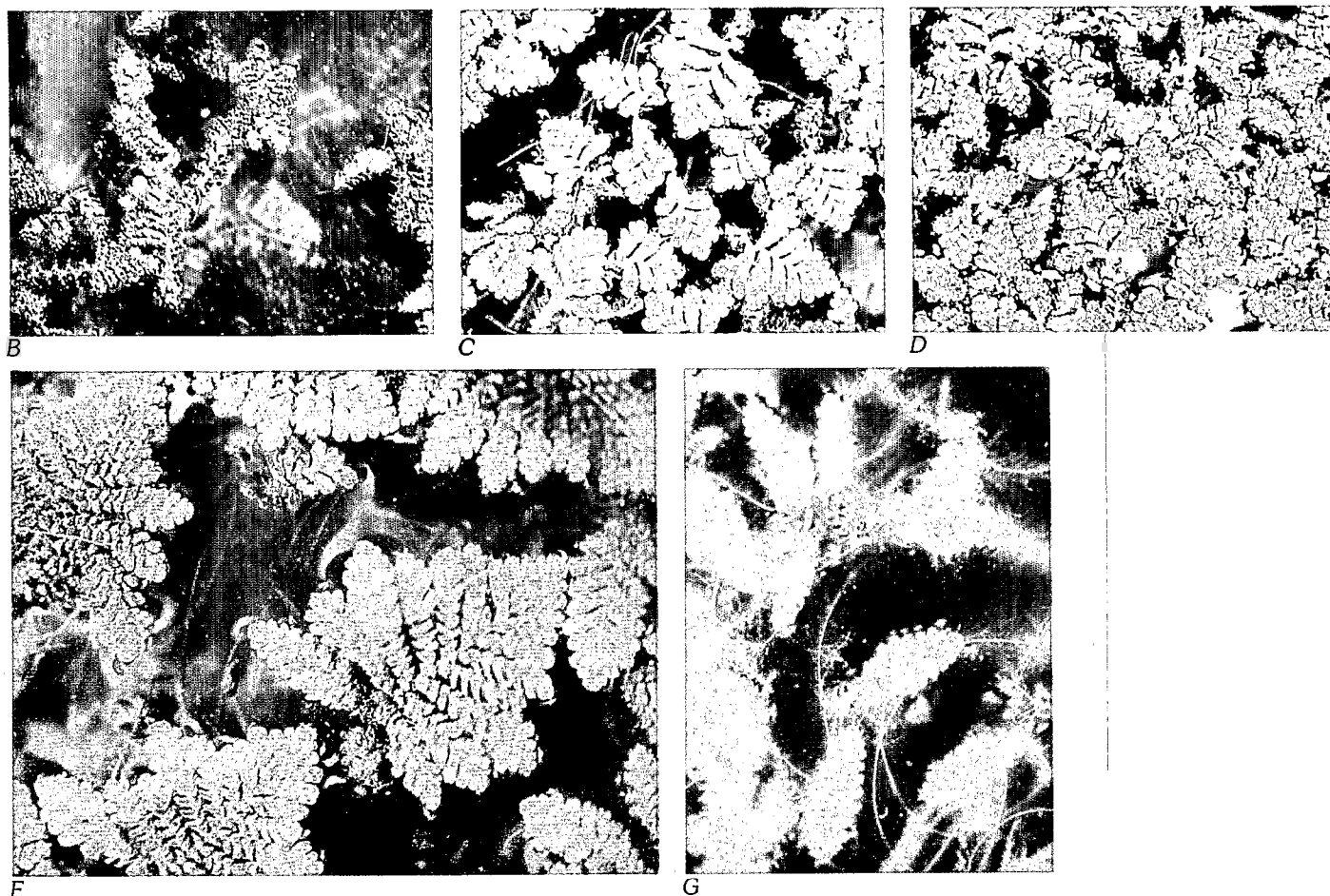


Figure 3 :
Reproductive cycle
of Azolla.

2.3 Reproduction cycle

As with all ferns, Azolla can reproduce vegetatively or by a sexual way. In vegetative reproduction, when the fern is about one to two cm in diameter, the older ramifications are fragmented and give rise to smaller independent ferns. During this cycle, Azolla reproduces in synchrony with the host. When the optimal conditions are realized, the doubling time (dry weight) is about 2.5 days for A. pinnata var. africana.

When the environmental conditions become unfavorable, the sexual cycle is initiated. Female spores (microspores) and male spores (megaspores) are produced in the ventral lobe ; they constitute a survival form of Azolla (Figure 3). Fertilization of the female gamete by the male gamete will give rise to a young plant. During sexual reproduction, the continuity of the association between the pteridophyte and the cyanobacterium is ensured by the presence of

Anabaena spores (or akinetes) in Azolla megaspores.

2.4 Ecophysiology

Conditions for growth of Azolla can be listed in descending order of importance as :

- good water management and protection from high light intensity
- maximum temperature of 35° C with limiting day and night temperatures of 25° C and 15° C
- sufficiency of phosphorous, calcium, magnesium and microelements,
- protection from grazers and other pests.

An important property possessed by Azolla is that it will change in color or morphology when growth is limited. For example, Azolla is reddish-purple in high light. Nutrient deficiencies manifest themselves as shown in figure 4. This makes it easier to adopt the fern in rice management techniques when problems can readily be recognized and corrected.

Figure 4 :
Morphological
changes of Azolla
pinnata var. africana
cultured for 15 days
in a medium
devoided of
phosphorus (A),
magnesium (B), iron
(C), potassium (D)
and calcium (E).
F : positive
culture in
complete medium ;
G : culture in
distilled water.



Figure 5

Figure 5 :
Observation en
microscopie optique
d'une coupe
longitudinale d'*Azolla*
pinnata var. *africana*.

A : *Anabaena*,
C : cavité,
LD : lobe dorsal,
LV : lobe ventral,
P : poils de transfert.

Figure 6 :
filaments d'*Anabaena*
azollae extraits par
micromanipulation
d'une feuille mature
d'*Azolla pinnata*.

H : hétérocyste,
V : cellule végétative.

3. PRÉSENTATION DU MICROORGANISME FIXATEUR D'AZOTE, ANABAENA AZOLLAE

3.1 Localisation

L'*Anabaena* symbiotique d'*Azolla* est localisée dans une cavité située dans le lobe dorsal de la fronde d'*Azolla* (figure 5). Cette cavité est formée par une dépression de la partie ventrale de la feuille en croissance : les filaments d'*Anabaena* y sont ensemencés à partir de la colonie d'*Anabaena* associée au méristème apical d'*Azolla*. Lors de la maturation de la feuille, une double rangée de cellules épidermiques emprisonne le symbionte fixateur d'azote. Dans les cavités mures fermées, les cellules d'*Anabaena* se répartissent à la périphérie de la cavité. Celle-ci est limitée par une membrane et pénétrée de poils qui assurent l'échange des composés azotés et carbonés entre la plante hôte et le symbionte.

3.2 Morphologie

Comme toutes les cyanobactéries du genre *Anabaena*, le symbionte est constitué de filaments comprenant deux types de cellules : les cellules végétatives, qui sont le siège de l'activité photosynthétique de la cyanobactérie, et les hétérocystes, cellules à membrane épaisse dans lesquelles est exprimée en anaérobiose l'activité fixatrice d'azote.

Une propriété qui distingue l'*Anabaena* symbiotique d'*Azolla* des *Anabaena* que l'on trouve à l'état libre dans le sol est la grande fréquence d'hétérocystes : 20-30 % au lieu de 5-10 % dans les formes libres (figure 6).

3.3 Taxonomie moléculaire

Toutes les *Anabaena* symbiotiques d'*Azolla* ont été classées comme l'espèce *azollae*. Cependant on ne sait pas cultiver le symbionte à l'état libre, et son étude taxonomique est délicate. Les *Anabaena azollae* extraites des différentes espèces d'*Azolla* ont la même morphologie ; elles possèdent des antigènes de surface voisins, mis en évidence par la technique d'immunofluorescence (figure 7). L'approche taxonomique la plus fructueuse a été obtenue grâce aux techniques de biologie moléculaire. Une étude des sites de restriction localisés dans les gènes de structure de l'enzyme responsable de la fixation d'azote, la nitrogénase (figure 8), a permis la construction d'un dendrogramme de cinq des six espèces d'*Azolla* (figure 9). Toutes dérivent d'un ancêtre commun, mais une légère divergence (4 %) est intervenue entre les sections *Euazolla* et *Rhizosperma*.



Figure 6

3. PRESENTATION OF THE NITROGEN-FIXING SYMBIONT, ANABAENA AZOLLAE

3.1 Localisation

The symbiotic *Anabaena azollae* is located in a cavity of the dorsal lobe of the *Azolla* fern (figure 5). This cavity is created by a depression of the ventral part of the growing leaf. New *Anabaena* filaments arise from the *Anabaena* colony associated with the apical meristem of *Azolla*. During leaf maturation, a double row of meristematic epidermal cells entraps the nitrogen-fixing symbiont. In closed mature cavities, *Anabaena* cells are located in the periphery. The inside of the cavity is lined by a membrane and penetrated by transfer hairs which allow the exchange of nitrogen and carbon metabolites between the host-plant and the symbiont.

3.2 Morphology

As all cyanobacteria of the genus *Anabaena*, the symbiont is composed of vegetative cells in which there is photosynthetic activity, and heterocysts, thick-walled cells in which nitrogen fixing activity is expressed in anaerobiosis. A remarkable property of

the symbiotic *Anabaena azollae* is the high heterocyst frequency : 20-30 % instead of 5-10 % for free-living *Anabaena* (figure 6).

3.3 Molecular taxonomy

All symbiotic *Anabaena* extracted from *Azolla* ferns are classified as *Anabaena azollae*. Nevertheless, due to the difficulty of culturing in vitro *Anabaena azollae*, taxonomic study of the symbiont is tenuous. *Anabaena azollae* extracted from different *Azolla* species are morphologically identical ; they harbour surface antigens closely related as indicated by immunological experiments (figure 7). Molecular biology has led to important results in the taxonomic study of the symbionts. A comparison of the restriction sites in the structural genes coding for the enzymatic complex (nitrogenase) which is responsible of nitrogen fixation (figure 8), allows the construction of a dendrogram of five among the six *Azolla* species (figure 9). All *Anabaena azollae* derive from a common ancestral strain ; a slight divergence (4 %) occurs between *Euazolla* and *Rhizosperma* symbionts.

Figure 5 :
Observation in optical
microscopy of a
longitudinal section of
A. pinnata var.
africana.

A : *Anabaena*,
C : cavity,
LD : dorsal lobe,
LV : ventral lobe,
P : transfer hair.

Figure 6 :
Anabaena azollae
extracted by
micromanipulation
from mature *Azolla*
pinnata leaves.

H : heterocyst,
V : vegetative cell.

Figure 7 :
Étude par
immunofluorescence
des antigènes de
surface des *Anabaena*
symbiotiques d'*Azolla*.
Autofluorescence des
filaments d'*A. azollae*
var. *pinnata* (A),
marquage des
filaments d'*A. azollae*
var. *pinnata* par les
anticorps fluorescents
dirigés contre
A. azollae var.
pinnata (B) ou contre
A. azollae var.
caroliniana (C).

Figure 7

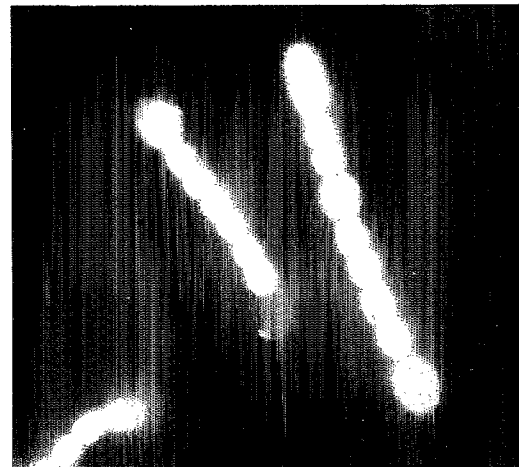


Figure 8 :
Comparaison des
sites de restriction
Hind III et *Eco*RI
dans le gène de struc-
ture de la nitrogénase
réductase des
Anabaena
symbiotiques d'*Azolla*.
L'ADN est extrait des
cellules végétatives de
l'*Anabaena* libre PCC
7120 (1), des
Anabaena
symbiotiques
d'*A. caroliniana* (2),
A. filiculoides (3),
A. mexicana (4) et
A. microphylla (5).
L'ADN est digéré par
*Eco*RI (a), *Hind* III
(b), *Eco*RI *Hind* III
(c) et hybridé avec
une sonde de
PCC 7120.

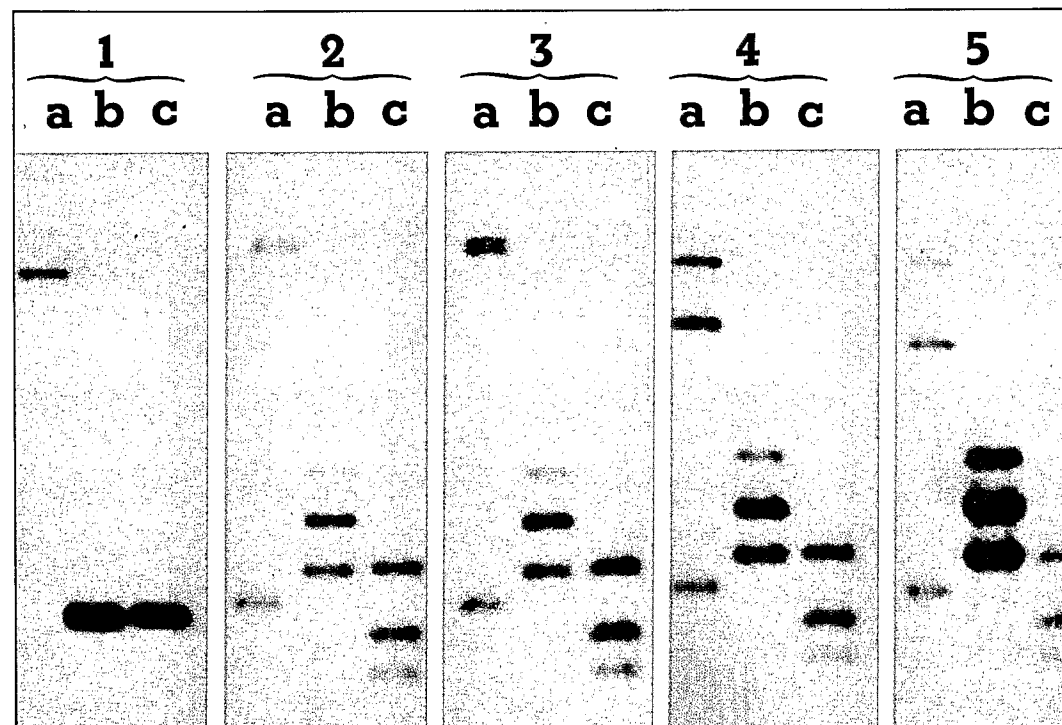


Figure 8

4. AZOLLA PINNATA VAR. AFRICANA, ENGRAIS VERT

4.1 De la biotechnologie sans le savoir !

Dans la vallée de KOULAR (Sénégal), les frondes d'*Azolla* (appelée *kouban* par les Mandingues) qui ont survécu pendant la saison sèche dans les rares mares pérennes, se développent dès les premières pluies et s'étalent avec l'augmentation de la nappe d'eau. Le riz, semé en poquets en avril sur de petites buttes de terre dans les mares, est alors repiqué par les paysannes qui essaient ainsi *Azolla*. Lorsque la densité d'*Azolla* est trop forte, la fougère est récol-

tée pour éviter les verses mécaniques et séchée sur les murets entre les rizières. (Figure 10).

A la pluie suivante, ce matériel végétal apporte de la matière organique azotée à la rizière. Ces rizières n'ont pratiquement jamais reçu d'engrais azoté de mémoire d'homme, mais les concentrations en azote et en carbone sont quatre fois plus importantes que dans les sols voisins où *Azolla* est absente.

Figure 10 :
A. Mares pérennes
couvertes d'*Azolla*
(brun rouge) dans la
vallée de Koular en
saison sèche.
B. Récolte d'*Azolla*
avant le repiquage du
riz qui a germé en
"poquets" au
deuxième plan.
C. Dissémination
d'*Azolla* après le
repiquage du riz ; les
frondes sont encore
brun rouge car
l'ombrage du riz n'est
pas suffisant pour les
protéger des fortes
intensités lumineuses.

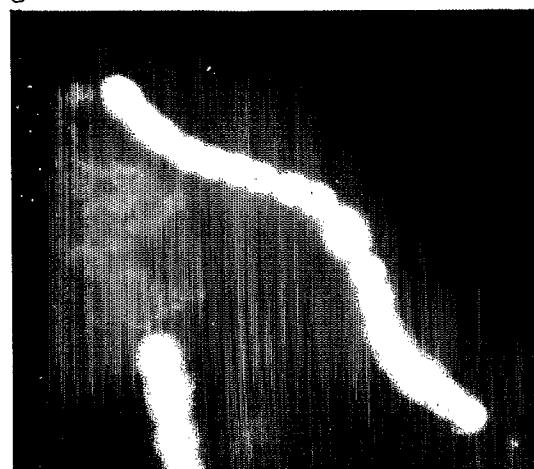


Figure 9 :

dendrogramme des
Anabaena azollae
extraites des *Euzolla*
et *Rhizosperma*.

dendrogram of
Anabaena azollae
extracted from
Euzolla and
Rhizosperma.

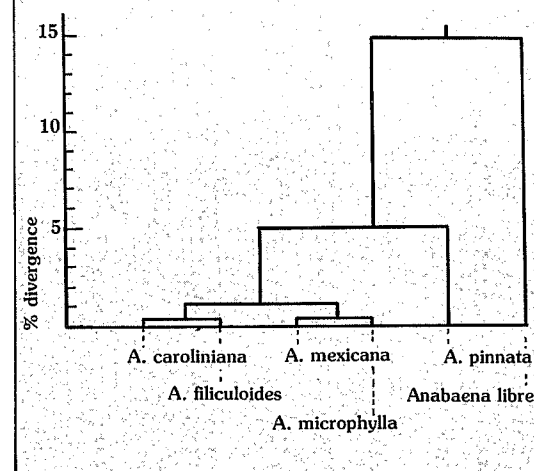


Figure 10

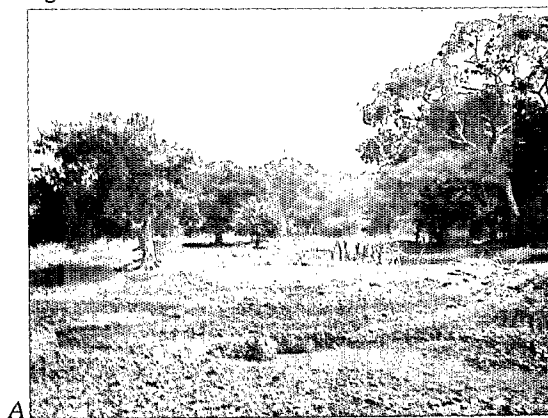


Figure 7 :
immunofluorescence
study to identify
surface antigens of
symbiotic *Anabaena*
azollae.

Autofluorescence of
A. azollae var.
pinnata (A),
A. azollae var.
pinnata filaments
were treated with
fluorescent *A. azollae*
var. *pinnata*
antibodies (B) or with
A. azollae var.
caroliniana
antibodies (C).

Figure 8 :
Comparison of *Hind*
III and *EcoRI* res-
triction sites in the
nitrogenase reductase
gene of symbiotic
Anabaena azollae.

DNA was extracted
from vegetative cells
of the free-living
Anabaena
PCC 7120 (1),
and symbiotic
Anabaena extracted
from *A. caroliniana*
(2), *A. filiculoides* (3),
A. mexicana (4) and
A. microphylla (5).
DNA was digested by
EcoRI (a), *Hind III* (b),
EcoRI Hind III (c) and
hybridized with a
probe from PCC
7120.

4. AZOLLA PINNATA VAR. AFRICANA, GREEN MANURE

4.1 Unconscientious biotechnology

In the Koular Valley, Senegal, *Azolla* fronds (called *kouban* by the Mandingo) which survive in perennial ponds grow and spread after the first rains so that their coverage corresponds to the increased size of the ponds. At the time rice is transplanted, the *Azolla* is spread evenly throughout the field. If the *Azolla* carpet is too thick, women

collect it in baskets and dried on the dikes (Figure 10). The dried *Azolla* on the dikes is then carried back into the paddies with the force of subsequent rains. Within living memory, these paddies have never received mineral nitrogen but the concentrations in total carbon and nitrogen are four-fold greater than soil in adjoining fields without *Azolla*.

Figures 10 :
First steps of *Azolla*
dissemination in
natural conditions.

A. Storage during the
dry season in
permanent ponds.
B. Yield of *Azolla*
previously to
transplanting rice.
C. Recolonization of
the paddy fields by
Azolla after
transplanting.

Figure 11 :
Effet de l'inoculation
d'*Azolla* en
microparcelles sur la
récolte en riz (devant)
et en paille (derrière),
et effet résiduel sur
un deuxième cycle
cultural.

1. Témoin sans engrais azoté
2. 60 kg/ha N-urea.
3. *Azolla* incorporée avant repiquage.
4. *Azolla* inoculée après repiquage, puis incorporée.
5. *Azolla* inoculée avant, puis incorporée après repiquage.
6. 30 kg/ha N-urea + *Azolla* inoculée après repiquage.
7. 60 kg/ha d'N-*Azolla* séchée et broyée.

Figure 12 :
En parcelles de 9 m²,
l'inoculation
d'*Azolla* à
raison de 200 g pds
frais/m² a un effet
très marqué par
rapport au témoin
sans azote (à
gauche) ; dans la
parcelle avec 60 kg
N-urée (à droite), le
riz est arrivé à
maturation avant la
parcelle avec
Azolla, mais le
rendement est
inférieur : N O :
3 t/ha, N 60 : 4,6
t/ha, Az : 5,2 t/ha
grains.

Figure 13 :
Croissance
d'*Azolla africana* en
culture mixte avec le
riz. Lorsque le
couvert végétal
devient trop dense, la
croissance d'*Azolla*
diminue.

Figure 12

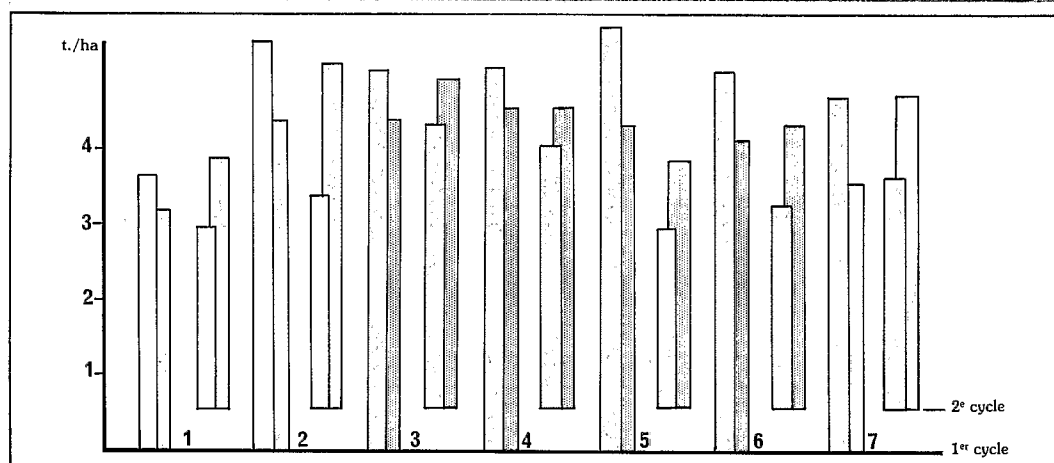


Figure 11

4.2 Les essais agronomiques

Nous avons comparé sur quatre cycles culturaux dans la station expérimentale de Bel-Air (Orstom, Sénégal) l'effet de différents traitements du riz : par des concentrations diverses d'azote urée et d'*Azolla* pour deux types de repiquage, dans un ensemble de microparcelles permettant une interprétation statistique.

– Dans les sols sableux, l'addition d'un kg d'azote minéral augmente la récolte en grains de 30 kg par hectare (Fig. 11 - 1 et 2).

– L'innoculation d'*Azolla* augmente toujours la récolte ; l'augmentation est de 30 à 40 % quand *Azolla* est incorporée avant ou après le repiquage du riz (fig. 11 - 3 et 4), et de 54 % lorsqu'*Azolla* est incorporée avant et après le repiquage – ceci correspondant grossièrement à l'utilisation dans la vallée de Koular (Fig. 11 - 5).

– Dans le cas où *Azolla* est incorporée

(fraîche ou séchée), la récolte en paille augmente aussi.

– Quand la maîtrise de l'eau est satisfaisante, un effet résiduel sur un cycle cultural du riz sans *Azolla* permet une récolte correspondant à celle obtenue avec l'apport de 60 kg N-urée.

– Sur deux cycles culturaux du riz, l'incorporation avant repiquage, lors du premier cycle de 60 kg d'azote sous forme d'*Azolla* séchée, donne des résultats comparables à ceux obtenus avec deux fois 60 kg de N-urée (fig. 11 - 7).

– L'azote d'*Azolla* est décomposé en deux étapes : une partie (15 à 30 %) est directement assimilable par la première culture du riz, alors que la seconde reste disponible pour un deuxième cycle cultural. Un défaut de maîtrise de l'eau provoquant une dénitrification, peut créer un rapport C/N défavorable et produire des phytoinhibiteurs.

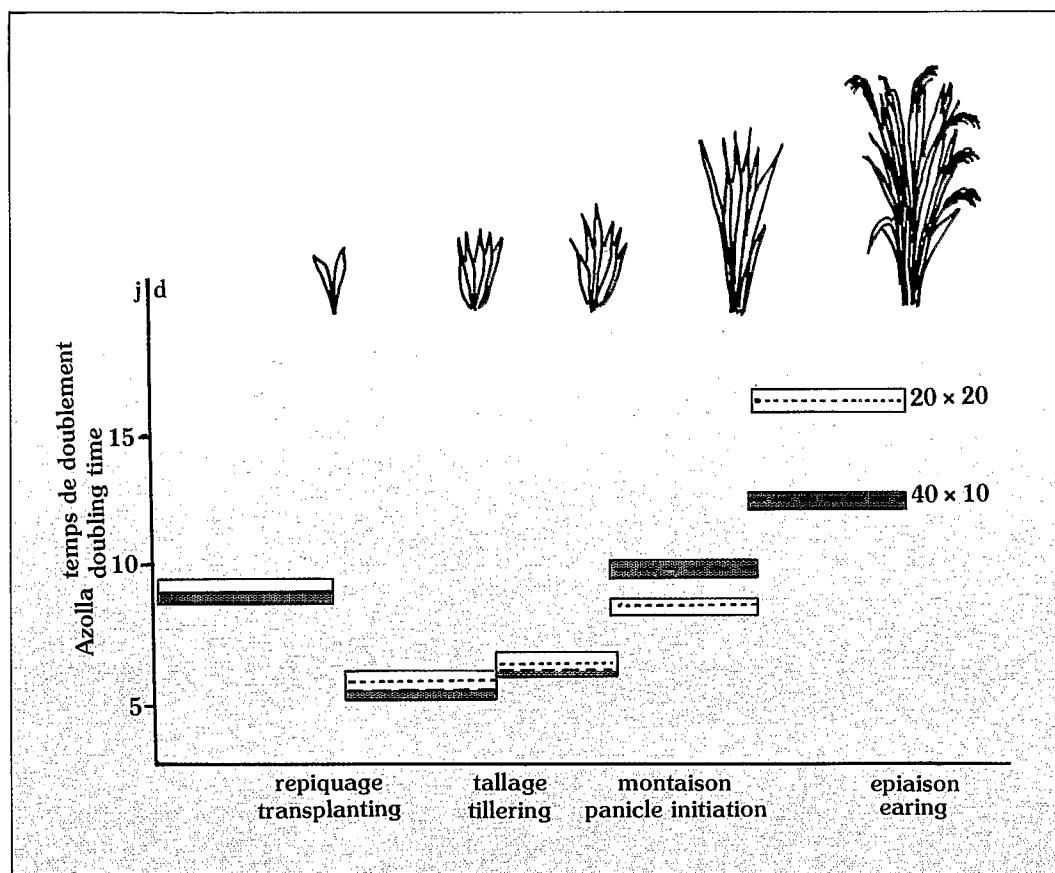


Figure 13

4.2 What can be concluded from agronomic trials ?

Experimental field trials with *Azolla* were conducted through four rice cultivation cycles. Treatments included different concentrations of mineral nitrogen alone and together with *Azolla*, *Azolla* alone, and two patterns of transplanted rice. This design permitted good statistical interpretation of the results of using *Azolla* with rice.

- In sandy soils, the addition of 1 kg of mineral nitrogen increased yield by 30 kg per ha compared to the control (Figures 11 - 1, 2).

- *Azolla* inoculation always increased the rice yield. The increase was 30-40 % when fresh *Azolla* was incorporated before or after transplanting (Figures 11 - 3, 4) and 54 % when incorporated both before and after transplanting, as was effectively practised in the Koular Valley (Figure 11-5).

- Incorporation of fresh or dry *Azolla* into the soil increased straw production.

- When water management was good, there was residual effect on the second harvest of having dual cropped *Azolla* with the first rice crop. This was equivalent to the addition of 60 kg of urea fertilizer to the second crop.

- Over two rice cycles, incorporation into the soil of 60 kg of nitrogen as dry *Azolla* gave results similar to those for urea (Figure 11 - 7).

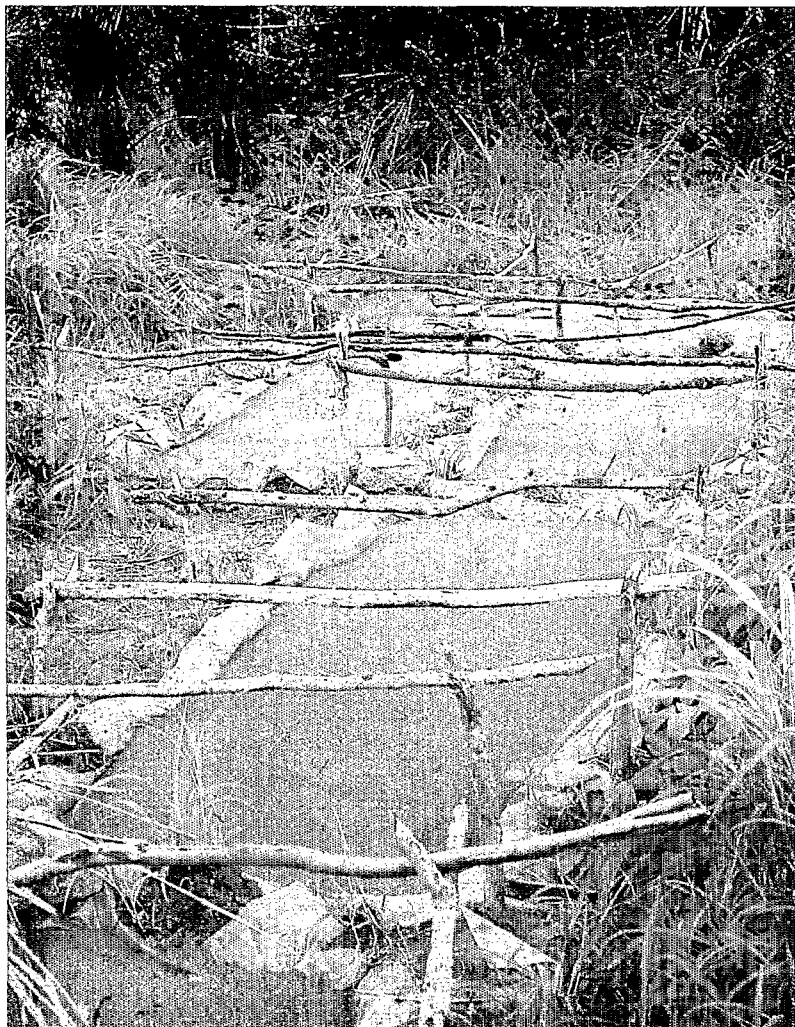
- Nitrogen was released from decomposing *Azolla* at two speeds. One part was immediately assimilated by the first rice crop whereas the second, more slowly released nitrogen component, was available to the second crop. Poor water management can interfere with availability of the slow release form if anaerobic conditions persist by production of phytoinhibitors and by creation of an unfavorable C/N balance.

Figure 11 :
Effect of *Azolla* inoculation on rice (in front) and straw (behind) yield, residual effect on a second rice cultivation.

- 1) Control without nitrogen fertilizer
- 2) 60 KG/HA N-Urea
- 3) Incorporation of *Azolla* before planting out
- 4) Inoculation of *azolla* after planting out, followed by an incorporation
- 5) Inoculation of *azolla*, followed by an incorporation after planting out
- 6) 30 KG/HA N-Urea plus inoculation of *azolla* after planting out
- 7) Incorporation of desiccated and squashed *azolla* corresponding to 60 KG/HA of nitrogen

Figure 12 :
In plots of 9 M², the inoculation of *azolla* (200 of wet weight/M²) has a positive effect compared to the control without nitrogen (left). In the plot with 60 kg N urea (right), rice matured before the plot containing *azolla*, but the rice crop yield was lower : no : 3T/HA, N60 : 4,6, T/HA, AZ : 5.2 T/HA.

Figure : 13
Dual cropping of *Azolla africana* with rice : when the rice canopy begins too thick, the *Azolla* growth decreases.



4.3 Problèmes posés par la culture d'*Azolla africana*

Pour limiter les problèmes lors de la culture d'*Azolla* avec le riz, l'inoculum doit être à la fois riche en éléments nutritifs de réserve et débarrassé de tout parasite. L'inoculum (200 à 500 g poids frais) est cultivé dans des bassins en plastique ou en argile de 2 m² avec 20 cm d'eau, recouverts d'un ombrage - trame moustiquaire, palmes... (fig. 14). Tous les trois jours une poignée de cendres domestiques est saupoudrée sur les frondes. Les deux principaux parasites sont : l'escargot *Limnea natalensis* (fig. 15), éliminé avec de la poudre d'écorce de *Detarium heudelotianum* (0,25 g poids sec/l), et *Nymphula sp.* (fig. 16), tuée par du tourteau d'amande de neem (*Azadiracta indica*), (1,5 g pds sec/l).

Ces deux produits biologiques contrôlent aussi les parasites mineurs.

5. CONCLUSION : AZOLLA : UNE RÉALITÉ SOLIDE, UN FUTUR PROMETTEUR !

Les recherches sur *Azolla* ont atteint un niveau permettant de déterminer les meilleures conditions de son utilisation en fonction du biotope où l'on veut l'introduire. Toutefois, le facteur dominant son utilisation reste le prix et la disponibilité des engrais azotés. Avec une bonne maîtrise de l'eau, la culture du riz en présence d'*Azolla* permet d'éviter des pertes d'eau par évaporation, supprime le désherbage ; elle apporte une augmentation des bénéfices d'environ 50 % sur deux cycles culturaux par rapport aux cultures traditionnelles. Les récoltes de riz pourraient ainsi passer en deux ans d'une moyenne d'1,3 t/h en Afrique de l'Ouest, à presque 2 t, sans investissement particulier.

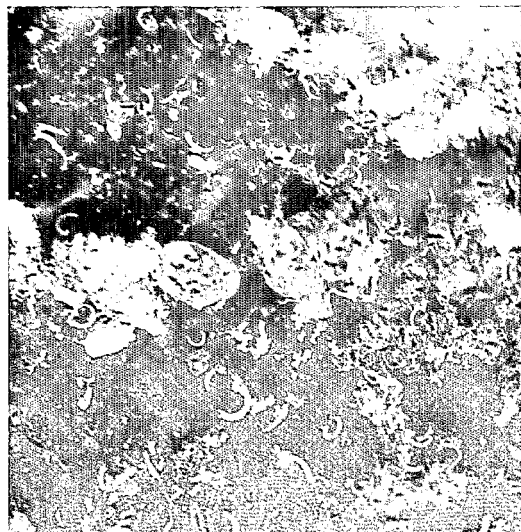
Par rapport aux autres engrais verts, *Azolla* présente l'avantage de pouvoir être cultivée

en même temps que le riz, sans dépense d'eau supplémentaire, sans équipement spécial pour sa manutention et son incorporation. Cependant, deux obstacles limitent les potentialités de cet engrais vert : d'une part, on ne sait pas provoquer le processus de reproduction sexuée chez la fougère, ce qui pose des problèmes de conservation des souches d'*Azolla* et de production d'inoculum ; d'autre part, on ne sait pas cultiver à l'état libre le symbionte *Anabaena*, ce qui empêche les manipulations génétiques de ce microorganisme. Des recherches fondamentales visant à étudier les gènes de la plante impliqués dans le processus de sporulation, et à déterminer les particularités génétiques du microorganisme fixateur d'azote devraient dans les prochaines années apporter des solutions à ces problèmes.

Figure 14 : Bassins de production d'inoculum d'*Azolla africana* à AFFINIAM (Casamance, Sénégal). L'ombrage de palmes a été enlevé pour montrer le développement d'*Azolla* après 15 jours de culture.

Figure 15 :
a) Ponte d'œufs de *Limnea natalensis* fixée sous les frondes d'*Azolla*.
b) État sous un tapis d'*Azolla africana* après cinq jours de broutage par les escargots.

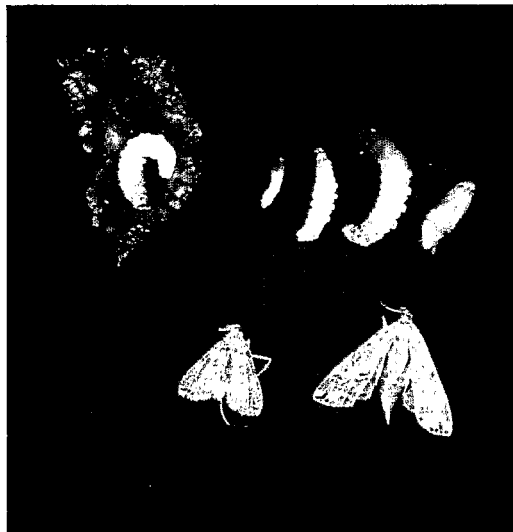
Figure 15 B



4.3 Problems encountered in Azolla cultivation

To minimize problems during dual cropping, the Azolla inoculum must be strong and in good health. Azolla inocula are cultivated in 2 m² plastic or clay pools with 20 cm of water. Two to 500 g of Azolla are added and the pools covered with a palm leaf canopy (figure 15). Domestic ashes are sprinkled on the growing Azolla every three days. Two pests can quickly destroy the inoculum. The snail Limnea natalensis (figure 15), which can be killed with Detarium heudelotianum powder (0.25 g dry wt./l), and Nymphula sp. (figure 16), which can be killed with neem cake (1.5 g dry wt./l). More these biological products are able to control all the minor pests.

Figure 16 A



B

5. CONCLUSION : AZOLLA : A SECURE PRESENT, A WIDE FUTURE !

Azolla research is now at a point where optimal conditions for its use as a green manure or companion crop can be determined for different habitats into which it will be introduced. The major factor that will determine the extent of widespread use of Azolla is the price and availability of inorganic nitrogen fertilizer. With good water management the dual culture of rice and Azolla provides many benefits : limited evaporation of water by the Azolla carpet, minimized competition from weeds, and yield increases over two rice cycles of as much as 50 %. This corresponds to an increase from 1.3 to 2 tons/ha in West Africa without an unusual investment of time or money.

Compared to other green manures, the advantages of Azolla are that it can be cultivated with rice without water supplementation and without any special apparatus for its handling and incorporation. On the other hand, a major problem is the production and storage of an inoculum because it is not possible to induce the fern's sporulation process, and because the Anabaena symbiont has not been cultured apart from its host.

Fondamental researchs are in progress to study expression of plant gene involved in sporulation of Azolla, and to determine genetic specificity of the symbiotic Anabaena azollae.

Figure 16 :
a) Étapes de la croissance de Nymphula sp. Les chenilles utilisent les frondes d'Azolla pour la construction de leur cocon.
b) Un tapis d'Azolla africana infecté par Nymphula sp., quelques heures après l'apport de tourteau de neem.

Figure 14 :
Azolla inoculum production pools ; the palm leaves were removed from the wooden frames to show Azolla development after 15 days of cultivation.

Figure 15 :
a) Limnea natalensis eggs stuck under an Azolla frond.
b) An Azolla carpet after five days of grazing by L. natalensis.

Figure 16 :
a) Developmental stages of Nymphula sp. : the caterpillars use Azolla fronds as a cocoon.
b) An Azolla carpet infected by Nymphula sp. after recent treatment with neem cake.



INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPÉRATION

213, rue La Fayette 75480 Paris Cedex 10
Téléphone (1) 48 03 77 77
Télex ORSTOM 214 627 F

BIBLIOGRAPHY

FRANCHE, C. and COHEN-BAZIRE, G. (1985). The structural nif genes of four symbiotic Anabaena azollae show a highly conserved physical arrangement.

Plant Science, 39, 125-131.

LUMPKIN, T.A. and D.L. PLUCKNETT (1980). Azolla : Botany, Physiology and use as a green manure.

Economic Botany, 34, p. 111-153.

LUMPKIN, T.A. and D.L. PLUCKNETT (1982). Azolla as a green manure : use and management in crop production.

Westview Press, Boulder, Colorado.

PETERS, G.A. and CALVERT, H.E. (1983). The Azolla-Anabaena azollae symbiosis, p. 109-145.

Dans "Algae symbiosis. A continuum of interactions strategies".

Goff, L.J., ed. Cambridge Univ. Press.

REYNAUD, P.A. (1984). Azolla pinata var africana ; background, eco-physiology, plots assays.

Dans "Practical application of Azolla for production".

Silver, W.S. et Schroder, E.C. eds.

Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publ., Dordrecht, p. 73-91.

REYNAUD, P.A. (1984). Écophysiologie des cyanobactéries fixatrices d'azote, libres ou en symbiose (Azolla) dans la zone tropicale sèche ; perspectives agronomiques.

Thèse d'état, Marseille-Luminy.

REYNAUD, P.A. (1985). Control of the Azolla pest Limnea natalensis with molluscicides of plant origin.

IRRN, 85-395.

Figures :

Marc Boureau : couverture, fig. 15.

Claudine Franche : fig. 1, 3, 8, 9, 10.

Catherine Masson : fig. 6, 7.

Pierre Reynaud : fig. 4, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17.