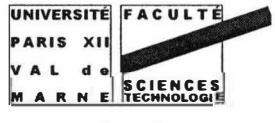
CONTRAT ICA4-CT-2001–10007 / Groundnut-aflatoxin

NEW TOOLS FOR GROUNDNUT AFLATOXIN CONTROL IN THE SAHEL REGIONS OF AFRICA

Quatrième rapport scientifique d'avancement
Période du 01/11/2004 au 31/10/2005

CIRAD-CA (France), Partenaire 1
CERAAS-ISRA-CORAF (Sénégal), Partenaire 2
EPM-Université de Paris 12, Partenaire 3
IER-ICRISAT (Mali), Partenaire 4
DPP-EAN (Portugal), Partenaire 5



Ce rapport résume les activités scientifiques conduites dans le cadre du projet groundnut-Aflatoxin durant la période 01/11/2004–31/10/2005. Il comprend 3 parties :

- une synthèse de l'atelier tenu au Portugal du 12 au 15 juin 2005,
- une synthèse des activités scientifiques conduites par les différents partenaires,
- Un résumé des activités de valorisation de la période considérée.

Les rapports détaillés de chacun des cinq partenaires figurent en annexe.

I. Atelier de Lisbonne

Les réunions qui se sont tenues à Oeiras près de Lisbonne (Portugal) du 12 au 15 juin 2005 et ont réuni l'ensemble des partenaires à l'exception du partenaire malien. Conformément aux décisions prises lors de l'atelier de lancement tenu à Thiès en février 2002, et compte tenu du fait que la demande de prolongation du contrat jusqu'au 31 mai 2006 a été acceptée, il est apparu pertinent de réunir l'ensemble des partenaires du projet afin de faire le point sur l'état d'avancement des travaux. En juin 2005, il restait en effet 11 mois d'exécution, incluant une dernière campagne de mesures, et il était important de situer les résultats par rapport aux objectifs fixés dans l'annexe technique.

Un autre objectif était également de discuter des opportunités de poursuivre nos collaborations dans le cadre d'autres initiatives.

Chaque partenaire a présenté ses travaux et les a replacé dans le projet global de façon à déterminer d'état d'avancement du projet par rapport au timing proposé initialement. Les différents résultats obtenus ont été replacés dans leur contexte, et ont permis de vérifier la progression des équipes. Les recommandations générales élaborées à l'issue des discussions peuvent être résumées au 4 points suivants :

1. Les résultats obtenus à ce jour sont satisfaisants, et les données de la dernière campagne agricole ainsi que des dernières expérimentations, permettront probablement au consortium d'atteindre les objectifs assignés dans l'annexe technique du projet.
2. L'atelier de restitution qui sera organisé au Ceraas en mai 2006, devrait être l'occasion de sensibiliser les populations à risque (édition d'une plaquette de bonnes pratiques ou recommandations agricoles pour diminuer le risque, sensibilisation par voie de presse, radio, TV…).
3. L'attention de tous est attirée sur le fait que les rapports finaux sont attendus par la CE moins de 2 mois après la fin du contrat, qui est fixée au 31 mai 2006. Il a été rappelé que la remise de ces rapports conditionne le décaissement par la CE des derniers 10% du budget du projet. Il est donc fortement recommandé aux partenaires de respecter scrupuleusement les délais indiqués.
4. Concernant les budgets, il est apparu un certain retard dans leur exécution. Il est donc recommandé aux partenaires d'être plus rigoureux dans ce domaine de façon à atteindre un taux d'exécution proche de 100% en fin de projet. A priori, ceci ne pourra se faire qu'à la condition que les institutions aient la capacité de pré financer les dernières dépenses, notamment les 10% débloqués après la remise des rapports techniques et financiers. Si les partenaires ne peuvent pré financer ces dépenses, ces derniers 10% ne leur seront pas versés.

Une SSA (Specific Support Action) sur la priorité 5 a été proposée aux participants. Elle s'intitule « Aflatoxin prevention on groundnut in African and European Countries » (AFLEUR). Cette proposition a été soumise on line en septembre 2005 et a reçu la note de 18,5/25 ce qui, semble-t-il, ne sera pas suffisant pour qu'elle soit acceptée étant donné que les seuils seront relevés (de 17,5 à 21) compte tenu du faible niveau de financement restant sur cet appel d'offre.

II. Activités de recherche

Comme dans les précédents rapports, les activités ont été regroupées par workpackage.

Workpackage 1: Physiological processes of pre-harvest contamination

Rappel des objectifs: ces travaux doivent permettre de préciser les facteurs environnementaux physiologiques et variétaux afin de caractériser :

- le type de stress qui entraîne la production d'aflatoxine en pré-récolte,
- les traits variétaux liés à la résistance en pré-récolte à l'infestation par *Aspergillus flavus* (*Af*) et à la contamination par l'aflatoxine,
- la relation entre maturité des gousses et sensibilité à l'infestation et la contamination.

Les travaux réalisés cette année dans le WP1 ont été conduits par le CIRAD (*Annexe 1, Première partie*), le CERAAS *(Annexe 2)* et l'IER (*Annexe 3*).

Au Sénégal, 2 activités concernant le WP1 ont été menées durant cette quatrième année de contrat.

Essai 1: Mise au point d'un système expérimental standardisé en conditions contrôlées pour l'étude de la contamination en pré récolte de l'arachide *(Annexe 1, Première partie)*

Cette étude a fait l'objet d'une expérimentation conduite conjointement par le CIRAD (partenaire 1) et le CERAAS (partenaire 2) et a constitué le mémoire de Master (Université de Bordeaux 2) d'un étudiant sénégalais.

La variabilité des réponses variétales à la contamination en pré récolte est due a deux facteurs principaux : d'une part, les difficultés à reproduire les conditions de sécheresse et d'infestation du sol propices à la contamination des gousses et répétables et d'autre part, les problèmes liés à l'échantillonnage des graines pour l'analyse de la teneur en aflatoxine. La mise au point d'un système normalisé et représentatif pour l'étude la contamination en pré récolte de l'arachide par *A. flavus* et la contamination subséquente à l'aflatoxine est donc un objectif important pour l'évaluation et la création variétale. En 2004, l'augmentation de la standardisation par le passage en conditions de sol stérile avait causé des problèmes de croissance des plantes. Cette expérimentation a donc été reprise avec un nouveau protocole (*Annexe 1, Première partie*).

Malgré l'allongement du cycle des variétés, les résultats obtenus en 2005 sur sol stérilisé et infesté artificiellement par *A. flavus* ont confirmé les résultats antérieurs obtenus sur un sol naturellement infesté provenant de la station de recherche de Bambey. En comparant des variétés de même cycle et adaptées au même environnement il a été possible de préciser les relations entre résistance à la sécheresse et résistance à l'aflatoxine dans un environnement standardisé reproduisant correctement les conditions de champs.

Deux types de résultats ont été obtenus :

1. Relation entre l'adaptation à la sécheresse et la résistance à l'aflatoxine

La stratégie d'évitement associée à une taille de graines réduite, celle de 55-437, est plus efficace que celle de Fleur 11 qui possède une tolérance à la sécheresse supérieure. Par ailleurs 55-437 présente une résistance intrinsèque qui limite l'infestation par *Af* et la contamination par l'aflatoxine quelles que soient les conditions environnementales.

2. Résultats méthodologiques

La maîtrise de l'infestation artificielle, des conditions de culture et de l'application du déficit hydrique en pots devrait permettre de limiter les fortes variations et d'améliorer la répétabilité des réponses variétales en matière de résistance-sensibilité à l'aflatoxine en pré-récolte. Par ailleurs, ce type de dispositif permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires de la résistance variétale à la contamination de l'arachide par l'aflatoxine en pré-récolte.

Essai 2: Essai multilocal au Sénégal

Les réponses à la contamination dépendent de la variété et des conditions environnementales. Un essai multilocal a donc été conduit par le CERAAS *(Annexe 2)* dans plusieurs sites du Bassin Arachidier sénégalais avec pour objectif de caractériser les réponses de nouvelles variétés à la contamination à l'aflatoxine sous différentes conditions agroécologiques.

L'expérimentation a été conduite en hivernage 2005 dans cinq sites du Bassin Arachidier : deux dans la zone nord (Thilmakha et Meckhé), un dans la zone centre (Bambey) et deux dans la zone sud (Nioro, Paoskoto). Dix variétés ont été choisies en fonction de leur niveau de tolérance et de leur longueur de cycle : 55 437, Fleur 11, 73-30, JL24, GC 8-35, 55-128, 55-36, 55-319, 78-936, 55-33. Les résultats ne concernent que les essais conduits dans le centre et le sud car les 2 essais du nord ont été ravagés par les criquets.

Les résultats obtenus dans les trois autres sites présentent une forte variabilité de la contamination par l'aflatoxine en fonction du site. Cette forte variabilité de la réponse variétale à la contamination par l'aflatoxine est une constante dans ce domaine. Elle explique largement l'échec de la sélection de variétés résistantes.

Dans les conditions de l'essai, les niveaux de colonisation fongique et de contamination par l'aflatoxine de toutes les variétés ont été très voisins. Le témoin résistant, 55-437, et le témoin sensible, Fleur 11, ne sont pas distingués contrairement aux observations réalisées en conditions de déficit hydrique de fin de cycle. Il est probable que les conditions d'alimentation hydrique des trois sites ont été trop favorables pour permettre un développement de la contamination dans les variétés sensibles connue comme Fleur 11 et JL 24 (variété témoin sensible diffusé au Mali). Cet essai multilocal a néanmoins permis de confirmer que les graines immatures sont les plus sensibles ce qui corrobore l'hypothèse que la vitesse de maturation des fruits est le critère clé dans la tolérance à la contamination. Cette capacité à mûrir vite est liée à la longueur de cycle de la variété, à son degré de tolérance au déficit hydrique, à la taille des graines et aux conditions édapho climatiques. En conditions de déficit de fin de cycle, les variétés à cycle court et tolérantes au déficit hydrique présentent une meilleure capacité de maturation minimisant ainsi la contamination. Une bonne maturité des graines favoriserait une bonne production de phytoalexines permettant ainsi de minimiser la contamination par les aflatoxines.

Au niveau variétal, la nouvelle variété précoce 55-128 est apparue moins contaminée que les autres dans les 3 sites alors qu'elle a présenté des taux de contamination naturelle par le champignon comparables à ceux des autres variétés. Cette apparente résistance à la contamination chez cette variété devra être confirmée et étudiée. L'expérimentation a aussi montré que ce sont les variétés à grosses graines (78-936, Fleur 11 et JL 24) qui ont subi le plus de dommages lesquels constituent des portes d'entrée des champignons aflatoxigènes dans les gousses et graines.

Du point de vue méthodologique, pour limiter les sources de variabilité des résultats en fonction des sites il faudrait donc standardiser la mesure de la maturité des fruits. L'observation de la coloration

interne (plus ou moins sombre) du péricarpe interne de la coque donne un classement qualitatif t on peut également mesurer l'activité de l'eau (aW) et l'humidité relative des graines. Cet essai a confirmé que la mesure de l'humidité relative des graines est mieux reliée au degré de maturation alors que la mesure de l'aW qui devient peu précise lorsque le nombre de graines est insuffisant. Dans la reconduite de cette expérimentation, il faudrait également envisager des analyses physicochimiques du sol de chaque site car la maturation est fortement influencée par certains éléments du sol comme le calcium.

Essai 3 : Essai régional

Un essai régional de variétés d'arachide pour la résistance à l'aflatoxine a été conduit sous la direction du partenaire 4 (Mali) dans le but de comparer les réponses variétales en matière de production et de résistance à l'infestation en fonction de l'environnement (*Annexe 4*).

Cet essai a été conduit en station dans trois pays : le Niger (Sadoré), le Sénégal (Bambey) et le Mali (Samanko). Il était constitué par 4 variétés communes (55-437, Fleur 11, ICG 6101 et ICG 7) et d'autres variétés témoins de la zone considérée. Les résultats agronomiques de l'essai de Bambey ont été rapportés dans la contribution du partenaire 2 (CERAAS) du rapport scientifique de l'année 3 (2004).

A Sadoré au Niger, les variétés ICG 7, ICG 6101 et 55-437 se sont montrées résistantes à la colonisation des graines par *A. flavus* avec des taux d'infestation inférieurs à 2%. En revanche Fleur 11 a présenté 47% de graines infestées. Les teneurs en aflatoxine observées chez les variétés ICG 7, ICG 6101 et 55-437 ont été également très faibles avec respectivement 0,03 ppb, 0,37 ppb et 0,67 ppb. La teneur la plus élevée a été mesurée chez JL 24 le témoin vulgarisé au Niger et au Mali avec 52,57 ppb.

Au Sénégal et au Mali, les mêmes variétés, ICG 7, ICG 6101 et 55-437, ont présenté de faibles infestations par *A. flavus* et de très faibles teneurs en aflatoxine. Les rendements en gousses de ces variétés ont été voisins de 1 tonne par hectare au Mali et au Niger et peu différents entre eux. On note cependant que la variété témoin de productivité, JL 24 (Mali) a confirmé sa supériorité en matière de rendement en gousses et en fanes et sa sensibilités à l'aflatoxine. Il en a été ainsi également pour Fleur 11 au Sénégal (cf rapport année 3, CERAAS).

Workpackage 2: Biochemical and physiological studies

Rappel des objectifs: étudier les effets de la sécheresse et de l'infestation du sol par *A. flavus* sur la composition des membranes cellulaires et la teneur des graines en différents composés notamment lipidiques.

En 2005, l'expérimentation conduite au Portugal (Partenaire 5) a concerné l'étude de ces effets sur les feuilles et les graines du cultivar (cv.) résistant, 55-437, et du cv. sensible, Fleur 11 (*Annexe 5*). Les mesures réalisées sur les feuilles les graines et les gousses saines, considérée à trois stades de maturité différents. Les gousses et les graines correspondant aux trois stades de maturité ont été séparées sur la base de la coloration de la paroi interne du péricarpe. Pour ces dernières, on a donc 12 traitements correspondant aux 24 traitements : 2 variétés x 2 traitement hydrique x 2 niveau d'infestation x 3 stades de maturité.

Les mesures suivantes ont été réalisées:

- production de graines saines,
- contenu relatif en eau des plantes (mesures sur feuilles),
- teneur en eau des graines et coques,
- teneur en protéines des graines et coques,
- composition en en acide gras des graines et coques.

Les conclusions sont les suivantes :

Le stress hydrique conduit à une forte diminution du nombre de graines saines et du poids de grains par plant chez les deux cvs 55-437 et Fleur 11 alors que l'infestation n'a globalement pas d'effet sur ce paramètre. L'infestation artificielle du sol par *A. flavus* a donc un effet négligeable au regard de celui de la sécheresse sur ces paramètres. Par ailleurs, le stress hydrique diminue fortement le nombre de graines mûres notamment sur Fleur 11.

Le contenu relatif eau (RWC) des feuilles passe de 90% à 40% en moyenne dans la période de déficit hydrique, un mois avant la récolte, pour les deux variétés. Le déficit hydrique diminue fortement la teneur en eau des graines immatures alors qu'elle est inchangée sur les graines mûres et très mures. L'humidité des coques est peu modifiée par le stress et le niveau de maturité. Les graines immatures ont été plus nombreuses chez Fleur 11 que chez 55-437 en condition de stress. L'infestation du sol n'a eu aucune incidence et sur ces paramètres.

La teneur en protéine des graines et des coques n'est pas modifiée par le stress hydrique et le niveau de maturité des graines. En revanche la teneur en acides gras totaux est fortement diminuée chez les graines immatures des deux cvs.

Les acides gras (AG) totaux des graines immatures sont fortement affectés par le stress hydrique pour les 2 cvs. Les AG totaux des graines mûres sont plus fortement affectés par le stress sur le cv. sensible Fleur 11 que sur le cv. résistant 55-437.

Les teneurs en AG C18:1, essentiellement l'acide oléique, et C18:2, essentiellement l'acide linoléique, ont été très élevées dans les graines immatures non stressées de Fleur 11. Cependant ces teneurs ont diminué fortement en conditions de stress hydrique où les 2 cvs sont sensiblement équivalents sur ce critère. Les teneurs en C18:1 et C18:2 des coques mûres de 55-437 sont bien supérieures à celles de tous les autres traitements.

En résumé, le stress a plus perturbé le métabolisme des lipides du cv. sensible que celui du cv. résistant, notamment au niveau des teneurs en C18:1 et C18:2 des graines immatures. On remarque par ailleurs une forte teneur en AG C18:1 et C18:2 au niveau des coques mûres du cv. résistant. Il en résulte des valeurs faiblement affectées par le stress au niveau des ratios O/L (acide oléique sur acide linoléique) dans les coques et les graines. Le ratio O/L est même augmenté dans les coques mûres de 55-437 en conditions de déficit hydrique.

Il semble donc que l'on puisse confirmer l'hypothèse d'une relation entre la bonne stabilité du métabolisme des lipides dans les graines en conditions de déficit hydrique notamment dans les graines immatures et la résistance à l'aflatoxine. Il sera également intéressant de vérifier si la résistance est liée à des concentrations élevées en C18 :1 et C18 :2 dans les coques mûres.

Workpackage 3 : Molecular studies

Rappel des objectifs: caractériser la réponse moléculaire des deux cvs de référence,sensible et résistant, à un déficit hydrique croissant pour contribuer à élucider les mécanismes de résistance en pré-récolte. Compte tenu du faible niveau de connaissance sur la réponse moléculaire de l'arachide à la sécheresse, la démarche a consisté à préciser dans un premier temps les mécanismes moléculaires clés impliqués dans la réponse de l'arachide à la sécheresse afin de déterminer par la suite comment cette réponse est modifiée, si elle modifiée, face à l'infestation par *A. flavus*.

Ces activités ont été conduites par laboratoire d'Eco-Physiologie Moléculaire de l'Université Paris 12, et au CERAAS (Sénégal), notamment par une étudiante en Doctorat, dont la soutenance est prévue en décembre 2005. Une synthèse des activités conduites conjointement avec les partenaires 1 (CIRAD) et 2 (CERAAS) pour la mise au point d'un système expérimental standardisé pour l'étude de l'interaction hôte/pathogène (WP1) est présentée dans la première partie du rapport du Partenaire 3 (*Annexe 3, Première partie).* Nous résumons ici les activités relatives aux aspects moléculaires (*Annexe 3, Deuxième partie*).

La stratégie adoptée pour les recherches relatives au WP3 est de caractériser et d'étudier des gènes de fonctions connues et de relier les réponses moléculaires aux réponses agro-physiologiques. Les séquences des gènes cibles ont été obtenues par amplification RT-PCR (Reverse transcriptase-Polymorphism Chain Reaction)à partir d'ARN totaux de feuilles du cv. Fleur 11 au stade S2 (stress modéré). L'expression des gènes correspondants a été étudiée par RT-PCR semi-quantitative ou par PCR en temps réel. Trois ADNc partiels de gènes codant une phospholipase Dα (*ah-pld*, 870 pb), une cystéine protéinase de la famille des papaïnes (*ah-cp*, 232 pb), une sérine protéinase de la famille des subtilisines (*ah-sp*, 1821 pb) et 2 ADNc complets de gènes codant une protéine LEA (Late Embryogenis Abundant) de groupe 1 (*ah-lea*, 582 pb) et un inhibiteur de sérine protéase de la famille des Bowman-Birk (*pbbi*, 561 pb) ont été obtenus. Toutes ces séquences sont décrites pour la première fois chez l'arachide et ont été déposées dans GenBank.

L'identification des ADNc a été effectuée par homologie de séquences avec d'autres espèces et par analyse bioinformatique. Sur la base des homologies de séquences, des fonctions putatives ont été attribuées aux ADNc identifiés chez l'arachide. Il est probable que pour surmonter le déficit hydrique, l'arachide accumule les transcrits de Phospholopase Dα (*PLDα*) afin de réduire les pertes d'eau puisque la PLDα joue un rôle dans la fermeture des stomates et la régulation du statut hydrique de la plante chez *Arabidopsis thaliana* . L'ADNc *ah-cp* code un fragment de protéine de 77 acides aminés identique à 90% à la MCP (membrane-associated cysteine protease), une cystéine protéase isolée chez *Vigna mungo*. La MCP serait impliquée dans la dégradation des protéines de réserve et la maturation post-traductionnelle de pro-*sh-ep*, une autre cystéine protéase responsable de la dégradation des protéines de réserve des cotylédons.

A notre connaissance, c'est la première fois que l'expression d'une sérine protéase en condition de sécheresse est étudiée. Chez l'arachide, l'expression du gène de la subtilisine (*ah-sp*) diminue d'autant plus que le déficit hydrique s'intensifie. Chez l'arachide, les résultats ont montré également que la baisse d'expression de *ah-sp* est plus importante chez le cultivar tolérant, Fleur 11, que chez le cultivar sensible, 73-30. Ce résultat est en accord avec les précédents d'où une implication de *ah-sp* dans la protection contre la sénescence induite par la sécheresse.

Chez certaines plantes le stress hydrique induit l'accumulation de protéines LEA qui protégent les cellules contre les effets délétères du déficit hydrique. Dans les feuilles d'arachide, l'expression de *ah-lea* est fortement induite par le déficit hydrique et de façon plus importante chez le cultivar tolérant que chez le cultivar sensible. Cette accumulation des transcrits *ah-lea* pourrait protéger les molécules

et les membranes des dommages causés par les faibles potentiels hydriques et être associée au mécanisme d'acquisition de la tolérance.

L'activation des inhibiteurs de protéases contribue à la régulation des protéases endogènes pour éviter une protéolyse accrue pouvant menacer la survie de la plante. La stimulation de l'expression de *pbbi* dans les feuilles d'arachide soumis à un déficit hydrique pourrait contribuer à la réduction des activités protéolytiques stimulées par le stress hydrique et parallèlement retarder la sénescence foliaire induite par la contrainte hydrique.

Ainsi, l'utilisation d'outils moléculaires a permis de confirmer les caractéristiques physiologiques et agronomiques des cultivars étudiés. La comparaison de cultivars présentant différents degrés de tolérance à la sécheresse a permis d'observer une réponse différentielle des gènes en fonction de l'intensité du déficit hydrique et du degré de tolérance à la sécheresse du cultivar. Comparé au cultivar sensible (cv. 73-30), le cv. Fleur 11 semble mieux équilibrer l'expression des gènes codant des protéines hydrolytiques (*PLD* et *CP*) et accumule abondamment les transcrits de gènes protecteurs (protéine LEA et inhibiteur *pbbi*). Cette stratégie pourrait correspondre à des caractères de tolérance moléculaire au déficit hydrique. Ceux ci pourraient expliquer la forte tolérance à la sécheresse de ce cultivar, définie sur la base de caractères agronomiques et physiologiques. Par ailleurs, la disponibilité des techniques de transgenèse chez l'arachide rend possible l'intégration de gènes d'intérêt identifiés dans les variétés à améliorer.

La confirmation du rôle adaptatif des protéines codées par les différents ADNc identifiés dans la réponse de l'arachide à la sécheresse devra être entreprise par des tests enzymatiques immunologiques et par transgenèse. Leurs propriétés antifongiques pourront être testées sur Aspergillus flavus dans le but de l'amélioration de la résistance hôte chez l'arachide.

Workpackage 4: Integrated crop management

Rappel des objectifs: définir des mesures préventives (variétés, itinéraires techniques, etc...) pour contrôler la contamination en champ (preharvest) et après récolte (postharvest).

Dans le cadre du WP4, les expérimentations ont été conduites par l'IER (*Annexe 4*) et le CIRAD (*Annexe 1, Deuxième partie*). Tous les essais au champ ont été réalisés en milieu paysan.

1. Activités de l'IER-ICRISAT (Mali, Partenaire 4)

Quatre études ont été réalisées par l'équipe IER/ICRISAT, la première concerne un essai multilocal participatif en parcelles paysannes, la deuxième la détermination de l'activité anti-fongique *in vitro* de souches locales d'actinomycète, la troisième un test en milieu réel de greniers améliores pour limiter la contamination durant le stockage et la quatrième l'étude de l'effet de différents amendements sur le niveau d'infestation par *A. flavus*.

1. Essai participatif de variétés en milieu paysan

Huit variétés ont été testées dans la zone de Kolokani (Mali) en collaboration avec des paysans. La résistance à la contamination des graines par *A. flavus* et à la production de l'aflatoxine dans les conditions naturelles. Les conditions de culture ont suivi les pratiques paysannes.

Les variétés ICG 7, ICG 6101 et 55-437 ont été les plus résistantes à l'infestation par *A. flavus* avec environ 2% d'infestation des graines. Les variétés les plus fortement infestées par le champignon ont

été 47-10 et surtout Fleur 11 avec, respectivement, 25% et 52% de contamination des graines. Les teneurs les plus faibles en aflatoxine ont été observées pour ICG 7, ICG 6101, ICG 622 et 55-437, avec respectivement 0,36ppb, 0,86 ppb, 1,86 ppb et 1,02 ppb. En revanche 47-10 et Fleur 11 ont été très infestées avec 16,95 ppb et 92,49 ppb, respectivement. Aucune différence variétale significative n'a été observée pour les rendements moyens des gousses. Les producteurs ont choisi les variétés IGC7 (résistante) et Fleur 11 (sensible) pour 40% d'entre eux. Les raisons de leur choix sont relatives à leur productivité, la grosseur de leurs graines et à leur goût.

2. Recherche et caractérisation de souches d'actinomycètes inhibiteurs d'*A. flavus*

L'objectif de cette activité est de proposer des souches d'actinomycètes pour la lutte biologique. Les échantillons de terre ont été prélevés dans des champs d'arachide en provenance des principales zones de production de l'arachide et des zones périurbaines de Bamako. Les échantillons ont été récoltés en raison de 325 avant les semis, 326 pendant la floraison et 327 au moment des récoltes. La méthode utilisée consiste à déterminer la taille des zones d'inhibition de la croissance de *A. flavus* par l'actinomycète en boîtes de Petri contenant un milieu de croissance approprié. Ensuite des observations des souches au microscope sont réalisées.

Dix-huit nouvelles souches d'actinomycètes inhibiteurs de la croissance de *A. flavus* ont été isolées et décrites. Cependant les informations obtenues doivent être complétées par l'utilisation des méthodes de taxonomie microbienne permettant d'identifier exactement l'actinomycète et la détermination des propriétés chimiques, physiques et antimicrobiennes, toxiques des molécules responsables de l'inhibition. Des partenariats sont recherchés pour réaliser ces études.

3. Suivi/évaluation sanitaire des stocks en milieu paysan

L'objectif de cette activité est de proposer des greniers pour la conservation des stocks d'arachide villageois à la portée des paysans. Les paramètres de stockage de 4 greniers traditionnels améliorés (2 greniers 00 et 2 greniers 01) construits en briques de terre battue ont été comparés avec ceux des greniers témoins construits sur la même aire. Durant la campagne de 2005, 24 échantillons d'arachide prélevés sur les stocks logés dans les 4 greniers construits à Sotuba ont été analysés.

Les résultats obtenus confirment l'augmentation de la quantité de spores d'*A. flavus* jusqu'en octobre suivie d'une diminution jusqu'en février dans tous les greniers. Cette évolution s'explique par les variations climatiques et notamment par l'évolution du taux d'humidité dans les stocks en fonction des saisons.

La très forte augmentation de l'infestation par A. *flavus* a été confirmée pour les stocks logés dans le grenier amélioré 00 non traité. Celle ci s'explique par l'existence de conditions optimales, notamment d'humidité, pour la prolifération des spores. Les quantités de parasites détectés dans les stocks ont été plus faibles pour les stocks logés dans les greniers améliorés traités. Cette baisse est très prononcée pour le grenier 01. Les résultats indiquent également des taux d'aflatoxine B1 plus faibles dans le grenier 01.

4. Contrôle intégré de l'infestation par *A. flavus* en station

Un essai de gestion intégrée de la contamination par l'aflatoxine a été installé à durant la campagne 2004 dans la station de Samé (Kayes, Nord Mali). L'objectif de cet essai est de développer une gestion intégrée pour réduire la contamination de l'aflatoxine dans l'arachide au champ. Les effets de quatre facteurs ont été analysés. Le premier facteur est constitué par la variété (55-437, variété résistante, et JL 24, variété sensible), le deuxième par un amendement de chaux au semis (avec et sans), le troisième par un apport de fumier au semis (avec et sans) et le dernier facteur par l'utilisation des résidus de cultures de céréale (avec ou sans).Les principaux résultats sont les suivants :

Effets simples :

- Une différence très significative a été observée entre les variétés : 55-437 a été beaucoup moins infestée, avec 2% de contamination, que JL24, qui a présenté 24% de contamination.
- La chaux à 400 kg/ha appliquée 50 jours après semis a permis une réduction de la contamination de 31%.
- Le fumier à 2,5 t/ha appliqué au semis a permis de réduire la contamination de 51%.
- Les résidus de céréales n'ont eu aucun effet significatif.

Interactions:

- L'effet de la chaux dépend de la variété. La variété sensible, JL 24, a mieux répondu à l'application de 400 kg /ha de chaux, avec 31% de réduction de la contamination contre 27% chez la 55-437.
- L'effet du fumier dépend aussi de la variété : la réponse à l'application de 2,5 t/ha de fumier au semis est plus marquée avec JL24 (52,8% de réduction de contamination) qu'avec 55-437 (18% de réduction de contamination).

Effet combiné :

- L'application de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis et de 2,5 t/ha de fumier au semis a réduit la contamination des graines de 37%. Cet effet combiné dépend de la variété avec 65% de réduction pour JL 24 contre 41% chez 55-437.

En résumé les corrections proposées sont toutes efficaces pour limiter la contamination à part l'apport de résidus de récolte de céréales. La variété sensible, JL 24, répond mieux que la variété résistante, 55-437, aux amendements proposés mais les taux d'infestation et de contamination observés sur 55-437 sont toujours meilleurs que ceux de JL24 même après application des corrections. Les résultats concernant la production de gousses et de fanes sont statistiquement similaires bien que montrant une supériorité de 55-437 non significative du fait du nombre élevé de facteurs étudiés dans le dispositif mis en place.

2. Essai du CIRAD/Sénégal

L'objectif de l'opération conduite par le CIRAD au Sénégal est le développement d'une filière arachide de qualité en communautés rurales et la valorisation des produits sur les marchés locaux et internationaux. Cette opération est commanditée par la Banque Mondiale et l'Union Européenne.

Les essais de 2002 et de 2003 avaient été réalisés sous irrigation contrôlée au champ grâce à un modèle d'irrigation basé sur la FTSW (fraction of transpirable soil water) élaboré auparavant par le CIRAD et le CERAAS. Sur le plan scientifique, les principales conclusions de ces essais 2003 ont été que :

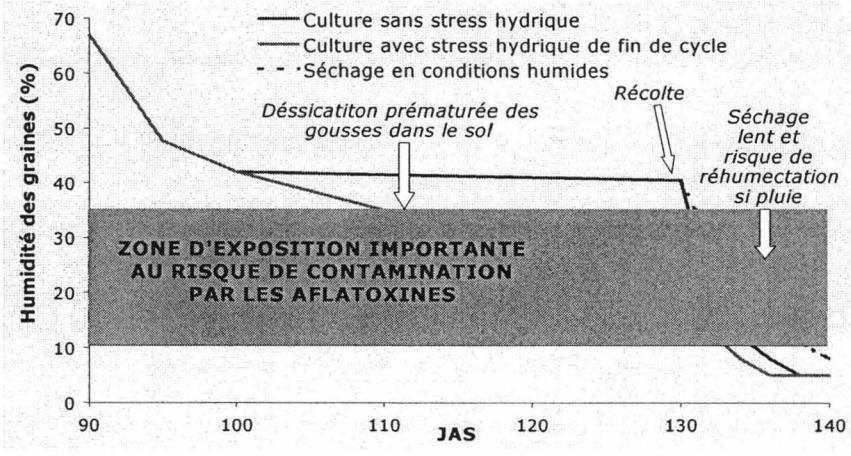
- la croissance végétative, les rendements et la qualité de la production des variétés à petites graines (type 55-437) sont peu affectés par la sécheresse,
- la qualité, le calibre et la maturité des graines de 55-437 ont été maintenues voire améliorées en conditions hydriques limitantes alors que tous ces caractères sont fortement altérés par la sécheresse chez Fleur 11,
- les teneurs en aflatoxine étaient supérieures sur Fleur 11,

L'hypothèse émise était donc qu'une taille de graines limitée et une forte capacité d'évitement sont favorables à la résistance à l'aflatoxine. Ces essais ont conduit à sélectionner sept variétés à cycle court pour les essais ultérieurs de vulgarisation. L'opération test de production d'arachide de qualité par les producteurs de Paoskoto a été conduite sur la base de ces résultats dans l'objectif de mettre au point des techniques et des outils d'aide à la décision ainsi des pratiques culturales (BPA « bonnes pratiques

agricoles ») en conditions pluviales pour la production d'arachide de qualité en milieu paysan. Les questions principales étant :

- Comment gérer la qualité sanitaire de la production dans les zones de production ?
- Comment optimiser le revenu de la filière dans sa globalité ainsi qu'au niveau de chaque acteur ?

Les pratiques préconisées sont fondées sur les connaissances acquises résumées dans le diagramme ci-après présentant l'impact du stress hydrique sur les risques de contamination par l'aflatoxine en pré et en post récolte.



Le dispositif a impliqué 50 producteurs volontaires auxquels des semences et autres intrants ont été fournis afin de cultiver 1 ha d'arachide chacun. Outre la maîtrise des pratiques culturales, le tri post-récolte des gousses (maintien de la qualité à la récolte, techniques d'égoussage, séchage, battage) est une phase clé pour l'obtention d'arachide saines. Cette analyse post récolte a été complété par la détermination des défauts majeurs (DM : gousses moisies, attaquées scarifiées, cassées) entraînant un risque important de contamination par l'aflatoxine et des défauts mineurs (bouts noirs, immatures, tâchées).

Les principales conclusions ont été que :

- la filière petites graines de Spanish (variétés hâtives) est la mieux adaptée aux pratiques mises en œuvre,
- la mise en œuvre de BPA en milieu rural encadré a permis la valorisation en graines HPS (qualité export) avec des rendements moyens supérieurs à 40% comparés aux 20% maxis qu'obtiennent actuellement les industriels,
- la production de semence doit faire partie intégrante de la filière de production,
- les opérations de tri post-récolte constituent point très sensible pour l'obtention d'une bonne qualité de graines.

Sur la base des résultats acquis et des semences produites dans cette phase de test l'opération sera été élargie en 2005 à une centaine d'hectares.

III. Activités de formation / valorisation

Cette quatrième année de contrat a permis une importante valorisation des résultats en matière de formation universitaire et diplômante, de communications et posters présentés lors de congrès internationaux et de publications d'articles dans des revues scientifiques de rang A.

Formation

Mémoires de fin d'étude pour trois étudiants de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture), Bassirou Sarr, Lamine Ba et Djibi Sow, dans le cadre l'opération de Paoskoto (WP4) pour l'obtention du *diplôme d'ingénieur agronome*.

Mémoire présenté pour l'obtention du *Diplôme d'Etudes Approfondies* (*DEA*) en Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop (Dakar), intitulé « Relations entre variétés, conditions environnementales et résistance à l'aflatoxine chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) » soutenu par Appolinaire Traore, le 01 Août 2005.

Mémoire présenté pour l'obtention d'un *Master* en Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux 2 intitulé, « Contamination de l'arachide (*Arachis hypogaea L.*) par l'aflatoxine : mise au point d'un dispositif expérimental pour l'étude de l'infestation en pré-récolte » soutenu par Oumar Diallo,le 13 juillet 2005.

Dernière année de *Doctorat* de l'Université Paris 12-Val de Marne pour une étudiante sénégalaise, Nani K. Dramé. La soutenance est prévue en décembre 2005.

Publications

Revues

Clavel, D, Drame, NK, Macauley, HR, Braconnier, S, Laffray, D., 2005. Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. *Environ. Exp. Bot.* 54: 219-130.

Clavel, D., Drame, NK, Diop ND, Zuily-Fodil,Y. 2005. Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne. Première partie : revue bibliographique *OCL*, Vol 13(3)

Clavel, D, Diouf, O, Khalfaoui, JLK, Braconnier, S. (In press) Genotypes variations in fluorescence parameters among closely related groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines and their potential for drought screening programs. *Field Crops Research.*

Clavel, D, Khalfaoui, JLK Drame, NK, Diop ND, Diouf, O, Zuily-Fodil,Y. 2005. Adaptation à la sécheresse et création variétale. Deuxième partie : une approche pluridisciplinaire pour la création variétale (accepté) par *OCL*

Dramé, KN, Clavel, D, Cruz de Carvalho, MH, Passaquet, C, Zuily-Fodil, Y. Water deficit induces variation in expression of stress responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars differing in their tolerance to drought. Accepté à *Plant Science* sous réserve de modifications.

Acte de colloques

Neves, CL, Campos, PS, Almeida, C, Semedo, J, Domingos, AC, Vales, L, Matos, A, Peito, A, Figueira, M, Matos, MC. Estudo do efeito da seca no desenvolvimento das vagens de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e sua implicação na infecção por *Aspergillus flavus*. V Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas/ VI Congresso Iberoamericano de Ciências Hortícolas. Vol. 1: Olericultura; Plantas Ornamentais, Associação Portuguesa de Horticultura (Ed.). Actas Portuguesas de Horticultura, nº 5, pp. 278-282.

Neves, CL, Campos, PS, Almeida, C, Semedo, J, Domingos, AC, Matos, A, Figueira, ME, Vales, C, Matos, MC. Grain lipid composition as a tool for understanding drought stress tolerance XIV Congresso Nacional de Bioquímica, December 2004, Vilamoura, Portugal. Livro de Actas pp 60.

Congrès internationaux

Clavel, D. Diouf, O, Khalfaoui, JLK, Braconnier, S. Variation in drought adaptation among closely related early groundnut lines. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.

Diouf, O, Clavel, D, Diedhiou, PM, Sarr, B, Braconnier, S. Agrophysiological traits of preharvest contamination in groundnut. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.

Dramé, KN, Passaquet, C, Repellin, A, Zuily-Fodil, Y. Isolation and characterization of a novel protease inhibitor overexpressed by water deficit in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.

Neves, CL, Campos, PS, Almeida, C, Semedo, J, Domingos, AC, Matos, A, Peito, A, Figueira, M, Matos, MC. Does water stress affect seeds and shells groundnut lipid composition? Livro de resumos do IX Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal, p. 201, Évora, 18-21 de Setembro de 2005.

Maria do Céu Matos and Paula Scotti Campos integrated the organizing Comission of the IXth Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal / XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiologia Vegetal, that was held in Évora (18-21 September, 2005).

ANNEXE 1: RAPPORT D'ACTIVITES DU PARTENAIRE 1

RAPPORT D'ACTIVITES DU CIRAD
(Partenaire N° 1)

NOVEMBRE 2004-OCTOBRE 2005

D. CLAVEL
O. DIOUF
A. MAYEUX
H. TOSSIM
O. DIALLO
P. DIEDHIOU
S. BRACONNIER

RAPPORT CIRAD : PREMIERE PARTIE

Mise au point d'un dispositif expérimental en serre pour l'étude en de la contamination de l'arachide par l'aflatoxine en pré récolte (WP1)

La recherche présentée a été conduite de façon conjointe par le CIRAD et le CERAAS. Elle vise à la maîtrise expérimentale des conditions permettant de mettre en évidence des réponses variétales stables par rapport à la contamination en pré-récolte. Le modèle utilisé comprend 2 à 3 variétés présentant un cycle court (90jours) soumises à un déficit de fin de cycle en serre. L'étude conduite en 2005 fait suite aux études des années précédentes qui avaient été réalisées sur un sol non stérile. Elle vise spécifiquement à mettre au point un traitement de témoin absolu (sol stérile) qui avait échoué en 2004.

Cette étude a donné lieu à la soutenance d'un Master Sciences de la Vie et de la Santé à l'Université de Bordeaux 2 (France) dont le responsable est le Dr BARROSO. La partie pratique de ce travail a été réalisée au CERAAS sous la responsabilité du Dr O. DIOUF.

Ont participé à ce travail :

- Oumar DIALLO (Master, Université de Bordeaux II)
- Dr Danièle CLAVEL (CIRAD)
- Dr Omar DIOUF (CERAAS)
- Dr Pape DIEDHIOU (ENSA, Thiès)
- Hodo TOSSIM (CERAAS)

1. Introduction

La majeure partie des évaluations de variétés par rapport à l'aflatoxine ont fait état de résultats conflictuels entre les tests en laboratoire sous infestation artificielle et les tests au champ, et d'une forte variabilité entre les localités (Mehan et al.. 1991; Waliyar et al., 1994; Anderson et al.., 1995; Holbrook et al., 2000). A ce jour, aucune variété totalement résistante n'a pu être identifiée ou sélectionnée (Anderson et al., 1995; Holbrook et al., 2000) du fait de la complexité de l'infestation en pré-récolte qui intervient sous l'effet conjugué de plusieurs facteurs en particulier du déficit hydrique (Cole et al., 1985; Sanders et al., 1985). La sélection s'est principalement heurtée à un manque de répétabilité des résultats et à un défaut de connaissance sur les mécanismes physiologiques de contrôle de l'infestation en pré-récolte.

L'activité décrite a débuté en 2002. Elle rentre dans le cadre d'une étude comprenant des essais au champ et des essais en serre en conditions de déficit hydrique de fin de cycle. Son objectif est la recherche d'indicateurs environnementaux, physiologiques et variétaux caractérisant l'infestation en pré-récolte. L'étude conduite en 2005 avait pour objectif spécifique de préciser les conditions expérimentales en serre permettant de créer un environnement favorable à la contamination par l'aflatoxine en pré-récolte. Les effets des facteurs intervenant dans la contamination ont été analysés afin d'améliorer la compréhension des mécanismes de l'infestation au niveau du végétal et de faciliter les criblages variétaux.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Le matériel végétal utilisé était constitué par deux variétés d'arachides vulgarisées au Sénégal:

- 55-435 (V1), Spanish, variété à port érigé peu ramifié, et cycle court (90 jours), largement utilisée dans cette zone et considérée comme le cultivar africain le plus résistant à l'aflatoxine.
- Fleur 11 (V2), Spanish, également à cycle court (90 jours) généralement sensible à l'aflatoxine. Cette variété est de plus en plus cultivée au Sénégal du fait de sa forte productivité et de sa bonne stabilité de rendement en conditions de déficit hydrique.

Le matériel fongique avec lequel les inoculations artificielles ont été réalisées était une souche d'*A. flavus* (*Af*) isolée à partir d'un échantillon de sol de la station expérimentale de Bambey (Sénégal) régulièrement emblavé en arachide.

2.2. Conditions générales d'expérimentation

Les variétés ont été cultivées en pots dans la serre du CERAAS située à Thiès (Sénégal) où les conditions de température et d'hygrométrie sont régulées grâce à un système de circulation d'eau associé à une soufflerie.

Le contrôle de la température du sol dans les pots était assuré par 8 sondes-sol de type «HOBO». Pour la répétition une, les deux sondes ont été placées sur les unités expérimentales (ue) 1, 9, 18 et 32 pour les plants stressés et sur les ue 2, 14, 23, et 27 pour les plants bien alimenté en eau. Ces sondes ont été placées le 7^{e} jas (jours après semis). Deux sondes-air ont été placées à environ 50 cm au-dessus des pots constituant les répétitions une et trois situées aux deux extrémités du gradient d'humidité inhérent au système de refroidissement de la serre afin d'évaluer la température et l'humidité de l'air.

Un suivi phytosanitaire des plants a été réalisé en pulvérisant, au besoin, les plantes avec un insecticide systémique, le Diméthoate à 300g/ml.

La récolte a eu lieu le 103^{e} jas après semis au lieu des 90 jours prévus car le niveau de maturité des gousses était insuffisant après 90 jours de culture.

2.3. Préparation des pots et semis

Le milieu de culture était de la terre prélevé des horizons superficiels (0-10 cm) d'un sol provenant d'une sole de Bambey régulièrement emblavée en arachide pendant l'hivernage. C'est un sol très sableux, de type «Dior», caractéristique des sols ferrugineux faiblement lessivés sur lesquels pousse l'arachide en Afrique Sub-saharienne. Il contient un faible pourcentage d'argile (7 à 9%), une teneur en matière organique très limité (0,3 et 0,6 %) et un pH neutre (6,5). Ce sol a été tamisé et stérilisé 2 fois à l'autoclave à 120°C, pendant 1 heure. Les pots de culture utilisés étaient constitués par des seaux d'un diamètre de 27 cm et d'une hauteur de 27 cm dont le fond a été tapissé de graviers (basalte) sur 3 cm d'épaisseur avant remplissage. Les pots ont été remplis avec 10 kg de la terre constituant le milieu de culture, tamisée et stérilisée à l'autoclave. Une partie de la terre servant de substrat n'a pas été stérilisée à l'autoclave afin de disposer de pots de contrôle (C). Ces pots étaient destinés à permettre un meilleur suivi de l'état nutritionnel des plantes des pots contenant de la terre stérile afin de pouvoir faire effectuer une correction dans l'alimentation minérale au besoin.

La capacité au champ (cc) du sol a été calculée avant le semis afin de déterminer les quantités d'eau à apporter pendant la culture. Pour cela, trois pots ont été pesés précisément pour obtenir leur poids secs (ps), avant d'être arrosés à ETM (Evapotranspiration maximale) dépassée et réessuyés pendant 24 heures. Les pots ont été repesés pour obtenir leur poids humide (ph). La différence entre ph et ps représente la capacité maximum d'eau évaporable du sol ou cc. Elle a été évaluée à 2,15 kg.

Avant semis, les graines ont été traitées par poudrage au «granox» (Captafol 10%-Benomyl 10%-Carbofuran 20%) à 2g/kg et mises à pré-germer pendant 48 heures. Le semis a été réalisé 24 heures après arrosage à la capacité au champ de l'ensemble des pots à raison de 2 graines pré-germées par pot. Un démariage à une plante par pot a été effectué au 8^{e} jas.

2.4. Alimentation minérale et hydrique des plantes

L'irrigation a été effectuée 3 fois par semaine (lundi, mercredi, vendredi). La quantité d'eau apportée par arrosage est fonction de l'état de développement de la plante. La solution nutritive a été apportée avec l'arrosage du lundi seulement jusqu'au 30^{e} jas. A partir du 31^{e} jas, l'irrigation avec la solution nutritive a été apportée deux fois par semaine: lundi et vendredi à la suite de l'apparition de carence en éléments nutritifs. La concentration de la solution nutritive a été augmentée progressivement à partir du 30^{e} jas, au fur et à mesure de la croissance des plantes passant de 15% au 30^{e} jas à 35 % (concentration finale) au 52^{e} jas. Afin d'éviter la percolation, les irrigations additionnées par la solution nutritive ont été réalisées en deux apports avec un minimum d'intervalle d'1 heure entre les deux fractions.

La solution a été préparée avec l'eau de pluie puisée des réservoirs du CERAAS. La solution de référence utilisée est celle du Docteur Luis Pérez Aranda (*Université Libre de Bruxelles)* adaptée à la plupart des espèces. Cette solution comprend les 6 macro-éléments, de base, azote (KNO_3), phosphore (Na_2HPO_4), soufre ($MgSO_4,7H_2O$), potassium, (KNO_3), calcium , $CaCl_2,2H_2O$) et magnésium ($MgSO_4,7H_2O$), apporté sous forme d'ion et 6 oligo-éléments, fer (Fe^{2+}), bore ($H_2BO_3^-$), cuivre (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), manganèse (Mn^{2+}) et molybdène (Mo^{6+}). Une solution mère est préparée pour chaque élément en dissolvant la masse de sel correspondante dans 1 litre d'eau distillée par agitation magnétique pour obtenir une solution 1000 x concentrée. La détermination de la masse de sels à dissoudre pour chaque solution a été effectuée grâce au logiciel de préparation de solutions nutritives, SOLNUT (*Laboratoire de Physiologie végétale, INA-PG).*

Le stress hydrique a été imposé à partir de 62 jas par suspension partielle de l'arrosage à des quantités allant de 50 %ETM à 25 %ETM.

2.5. Infestations artificielles

L'infestation artificielle de la terre par *Af* a eu lieu le 31^{e} jas par la méthode de Dorner *et al.* (1998) modifiée. L'inoculum était constitué par 10g de riz infesté, versé dans un sillon creusé autour des plants (Figure 1). Le sillon a été immédiatement recouvert de terre et par des granulés d'argile sèche pour piéger les spores de champignon.

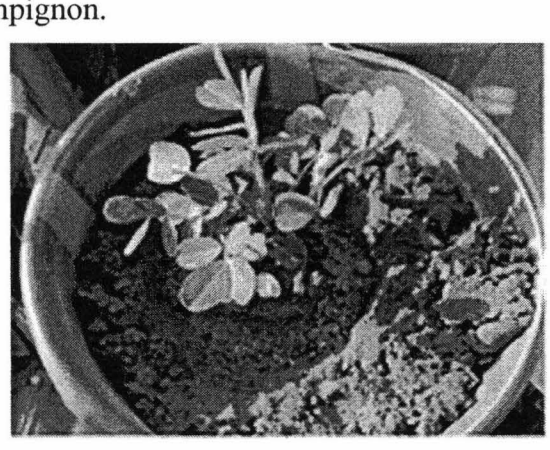


Figure 1. Infestation artificielle des pots à base d'un substrat de riz infesté

La préparation de l'inoculum a été réalisée en plusieurs étapes:

Multiplication de la souche d'Af

Un clone d'*Af* a été isolé à partir du sol de Bambey utilisé dans l'expérimentation puis multiplié en boîtes de Petri contenant un milieu de culture sélectif à base de Dichloran-Glycérine. Le milieu a été obtenu en dissolvant 31,6 g de Dichloran-Glycérine (Peptone 5,0g/l; Glucose 10,0g/l; Potassium

dihydrogénophosphate 1,0g/l; Magnésium Sulfate 0,5g/l; Dchlorane 0,002 g/l, Chloramphénicol 0,1g/l, agar-agar 15,0g/l) dans 1 litre d'eau distillée par agitation magnétique à 105°C et 1ml de Rose Bengal en maintenant l'agitation jusqu'à dissolution complète. Puis une stérilisation à l'autoclave a été réalisée pendant 20 minutes à 120°C. Après refroidissement à 70°C, 0,02 µg de streptomycine ont été ajoutés au milieu avant de couler les boîtes de Petri à inoculer avec *Af.*

Préparation de la suspension standard et inoculation du substrat de riz

Une suspension du champignon a été réalisée à partir d'une boîte contenant des colonies d'*Af* âgées de 5 jours en l'inondant avec 30ml d'eau distillée stérile. Après avoir transvasé la suspension dans un bécher, 2ml de tween 20 ont été ajoutés. La quantité de spores a été dénombrée à l'hémacytomètre et 10ml d'une suspension standard à une concentration de 10^6 spores par ml a été réalisée.

Inoculation du substrat organique (riz)

L'inoculation de 50g d'un substrat stérile à base de riz, a été réalisée sous une hotte avec 1 ml d'une suspension de 10^6 spores d'*Af* bien agitée. La culture a été mise à incuber à 30°C pendant 5 jours.

2.6. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental était constitué par 32 unités expérimentales (ue) de 4 pots chacune. Le dispositif était en factoriel à 3 facteurs x 4 répétitions disposées en blocs complets randomisés. Les 3 facteurs étudiés étaient la variété (55-437 = V1, Fleur 11 = V2), le régime hydrique RH (stress hydrique de fin de cycle = R1 et alimentation hydrique optimale = R2) et le traitement du sol (sol stérilisé infesté = I, sol stérilisé non infesté = NI).

Un total de 128 pots (4 pots par ue x 2 Var. x 2 RH x 2 niveaux d'infestation) a été mis en place. Seize pots de contrôle avec de la terre non traitée (ni stérilisée ni infestée) ont été intercalés dans le dispositif pour aider au suivi de la croissance des plantes et ajuster éventuellement les dosages de solution nutritive.

2.7. Observations et mesures

La date d'apparition de la première fleur chez tous les plants a été déterminée en jours après semis (jas). La température de la géocarposphère a été suivie à l'aide des 8 sondes-sol placées dans le dispositif au niveau des ue 2, 14, 23, 27 pour les plants ayant subi un régime hydrique optimisé (IRR) et au niveau des ue 1, 9, 18, et 32 pour les plantes ayant subi un stress hydrique de fin de cycle (STR).

2.7.1. Mesures physiologiques

Etat hydrique des plantes

Le suivi hebdomadaire du potentiel hydrique foliaire des plantes (Ψf) a été réalisé au moment de l'imposition du stress hydrique, à partir du 63^e jas. La mesure a été effectuée à l'aide d'une chambre à pression (Scholander, MS 650, PMS Instruments Co, Corvalis, Oregon USA).

Efficacité photosynthétique

Ce paramètre a été évalué en utilisant le Plant Efficiency Analyser (PEA, Hansatech Instruments, Ltd, England). Cet instrument fourni une série de valeurs liées à l'émission de fluorescence de la chlorophylle a pigment situé dans les membranes thylakoidales des chloroplastes de la cellule végétale. La fluorescence chlorophyllienne réémise lors d'un exposition à un flash lumineux est inversement proportionnelle au pouvoir de transformation de la lumière en énergie photochimique. Lorsqu'une plante est placée dans un environnement non contraignant, le fonctionnement des photosystèmes présent dans la chlorophylle est optimal et l'énergie lumineuse est alors pleinement utilisée et transformée en énergie chimique. A l'inverse, si la plante subit une contrainte, seule une partie de l'énergie lumineuse reçue sera transformée et l'autre sera restituée sous forme de chaleur et de fluorescence et la photosynthèse sera moins efficace.

Les mesures ont été hebdomadaires et réalisées en même temps que celles du potentiel hydrique à partir de l'imposition du stress. Un clip est placé pendant 30 minutes au niveau de la 3^e feuille à partir

de l'apex de 3 plantes au hasard dans la parcelle utile. Le clip, en soumettant la surface test à l'obscurité, supprime le moteur énergétique de la photosynthèse rendant ainsi les centres réactionnels totalement disponibles. A l'envoi d'une lumière très forte par l'appareil, les centres réactionnels sont saturés et l'excédent d'énergie est réémis sous forme de fluorescence.

Les variables retenues sont le Fv/Fm (ou PHI (Po)), ratio de la fluorescence variable sur la fluorescence maximale et l'indice de vitalité ou SFI (Structure Fonction Index) car elles sont habituellement les plus sensibles à la sécheresse sur l'arachide au champ (Clavel *et al.*, sous presse). Le *Fv/Fm* traduit le rendement maximum de la photochimie après adaptation à l'obscurité et SFI exprime l'habilité d'une plante à éviter la sécheresse et à maintenir son activité physiologique à un certain niveau.

2.7.2. Analyses technologique post récolte

Les plantes des 4 pots constituant une ue ont été récoltées en mélange. Elles constituent l'échantillon qui est égoussé « en vert » (avant le séchage) pour la détermination des poids, maturité et humidité relative des graines.

Les gousses de chaque échantillon ont été pesées pour obtenir leur poids frais (PGo). Puis le dénombrement et le poids des gousses saines ont été réalisés (PdsGoS) ainsi que celui des gousses endommagées ou flétries (PdsGoEnd). Les gousses saines ont été décortiquées en vert et les graines obtenues ont été classées en différentes classes de maturité en fonction de la coloration de la paroi interne de la coque (M1=brun-noir, très mûres, M2=beige-brun clair : mûre et M3=blanc, immature). L'humidité des graines a été évaluée sur chaque classe de maturité. Le poids frais (Pdsgr) de et le poids sec (PdsgrS, séchage à 40°C pendant une semaine) de chaque lot ont été déterminés ainsi que les poids secs des coques vides (Pdscoques S) pour le calcul du taux de décorticage.

Le pourcentage de chaque classe de maturité (M1, M2 et M3) est donné par :

%M1 (M2 ou M3) = NbreM1 (ou M2 ou M3) / Nbre total de graines) x 10

Le taux de décorticage donné par:

(Pdsgr S M1 + M2 + M3) / (Pdsgr S M1 + M2 + M3 + Pdscoques S)

Le nombre total de graines (Nbregr) est donné par:

NbregrS M1 + NbregrS M2 + NbregrS M3

La taille des graines est donnée par le poids de 100 graines (Pds de 100gr):

(PdsgrS M1 + M2 + M3) / Nbregr S) x 100

2.7.3. Les taux de colonisation des graines et du sol par Af

Le taux de colonisation des graines permet de déterminer leur niveau d'infestation par le champignon vecteur en cours de culture (pre-harvest). Cette mesure a été réalisée sur 10 graines provenant de chaque classe de maturité. Les graines ont été trempées dans de l'hypochlorite de sodium (NaClO) pendant deux minutes pour une désinfection de la surface. Elles ont ensuite été rincées dans de l'eau distillée pendant une minute 2 fois de suite. Les graines séchées ont été ensuite placées dans une boîte de Pétri préalablement tapissée de papier Whatman imbibé d'eau distillée stérile à raison de 10 graines par boîte sans contact entre les graines. Le comptage des graines colonisées par Af (graines portant une sporulation verte) a été effectué à l'aide d'une loupe binoculaire au bout de 5 jours d'incubation à 37°C.

Le taux de colonisation des graines (Tx Af), correspond au pourcentage moyen de graines colonisées par le champignon. Il est donné par la formule suivante:

Tx Af (%) = (Nombre de graines colonisées / 10) x 100

Le taux de contamination du sol a été déterminé trois fois : avant et après l'infestation artificielle par Af et le jour de la récolte. Un échantillon homogène de chaque ue a été prélevé et conservé à -20°C

pendant 48 heures puis mis à sécher à l'air libre 48 heures. 4 x 10g de la fraction tamisée ont été pesés : 10g pour la détermination du taux d'Af dans le sol et 3 x 10g pour la détermination de l'humidité relative. 50 ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés au 10g de sol et mélangés avec un agitateur magnétique pendant 5 minutes. Les comptages de colonies ont été réalisés à partir de 0,2ml de chaque dilution (10^{-2} pour les pots non infestés et jusqu'à 10^{-5} pour les pots infestés) étalés sur trois boîtes de Pétri contenant du milieu à base de Dichloran-Glycérine (cf ci-dessus). Les boîtes ont été ensuite mises à incuber à température ambiante pendant 5 jours avant comptage des colonies d'Af qui apparaissent vert pale. Les 3 autres échantillons de sols ont été mis à sécher à l'étuve à 105°C pendant 48 heures afin de déterminer les taux d'humidité relative de chaque échantillon par la formule suivante:

((Poids humides du sol – poids sec du sol) / poids humide du sol)) / 100

Le taux de colonisation du sol par le champignon est donné par le nombre de CFU (Colony forming Unit) par g de sol qui correspond au nombre moyen de colonies des 3 boites de la même dilution x 5 x 0,2 x facteur de dilution x (1 + taux d'humidité de l'échantillon de sol).

2.7.4. Teneur en aflatoxine des graines

Le dosage de l'aflatoxine a été effectué selon la méthode AflaTest développé par VICAM Science and Technologie, (USA). Cette méthode permet de titrer les aflatoxines B1, B2, G1, G2, et M (Trucksess, 1991). Elle s'effectue en 5 étapes principalement:

- Préparation de l'échantillon par broyage au Waring Blender de la totalité des graines de chaque classe de maturité,
- Extraction de l'aflatoxine: 100 ml de méthanol 80 % et 5 g de NaCl ont été mélangé à 25g de broyat à l'aide d'un mixeur pendant 1 minute avant de faire passer la solution a travers un papier filtre (24 cm de diamètre). 20 ml du filtrat ont été dilués dans 20 ml d'eau distillée stérile et un deuxième filtrage a été effectué à travers un papier filtre de 11 cm de diamètre. 10 ml de ce deuxième filtrat ont été alors passés à travers d'une colonne d' AflaTest,
- Fixation de la mycotoxine: dans la colonne AflaTest ont été fixés des anticorps spécifiques des aflatoxines. La colonne a été rincée deux fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les impuretés non fixées qui pourront fausser le dosage.
- Elution des aflatoxines: l'élution a été effectuée à l'aide d'1 ml de méthanol 100 % permettant ainsi de «décrocher» les aflatoxines fixées sur les anticorps par rupture des liaisons covalentes.
- Dosage de l'aflatoxine au fluorimètre VICAM: l'éluât a été alors mélangé à 1 ml de "développeur" qui permet de révéler la fluorescence des molécules d'aflatoxines. La fluorescence émise a été détectée par un fluorimètre optique de type VICAM séries-4. La concentration en aflatoxine de la solution a été déterminée et convertie directement en ppb.

2.8. Analyse statistique

Chaque variable a été analysée par la procédure GLM Proc de l'analyse de variance de SAS (General Linear Model de SAS 9.2002-2003, SAS Institute Inc., Cary, NC,USA). Les différences entre traitements ont été déclarées significatives au seuil de 5 %. Lorsque ces différences étaient significatives, les moyennes ont été comparées par les tests de Student Neuman et Keuls (SNK) au seuil de 5 %: les traitements ont été déclarés significativement différents si la probabilité P d'égalité des moyennes est inférieure à 0,05, très significativement différent si P est comprise entre 0,05 et 0,01 et hautement significativement différente si P étaient inférieure à 0,001. Les données de contamination réalisées par classe de maturité ont été analysées graphiquement et par régression.

3. Résultats et discussion

3.1. Résultats

3.1.1. Date de floraison

La floraison a commencé au 25^{e} jas pour les deux variétés. L'émission de fleurs a été plus rapide chez la variété Fleur 11 avec plus de 60 % des pieds fleuris au bout de 30 jours de culture. Alors que chez la variété 55-437, seulement 50 % des pieds ont fleuri après 30 jours de culture. Par la suite, la floraison a été progressive jusqu'à obtention de 99 % de pieds fleuris au bout du 37^{e} jas.

3.1.2. Evolution de la température du sol et de l'humidité relative de l'air

Au cours de l'expérimentation, les températures minimales du sol ont évoluée de 22°C à 28°C, les maximales ont varié de 36°C à 45°C avec une moyenne comprise entre 29°C et 33°C . Il n'y a pas eu de différences entre les pots stressées et les pots irrigués en fin de cycle (figure 2).

L'humidité relative de l'air dans l'enceinte de la serre a évolué entre 19,9 % et 55 % pour les minimales et entre 55,5 % et 87,7 % pour les maximales avec une moyenne comprise entre 39,77 % et 71,35 %. Les réultats donné par les 2 sonde-air installée sont très proches (figure 3).

Ces gammes de température et d'humidité sont favorables pour le développement du champignon *Af* mais également pour un développement optimal de l'arachide.

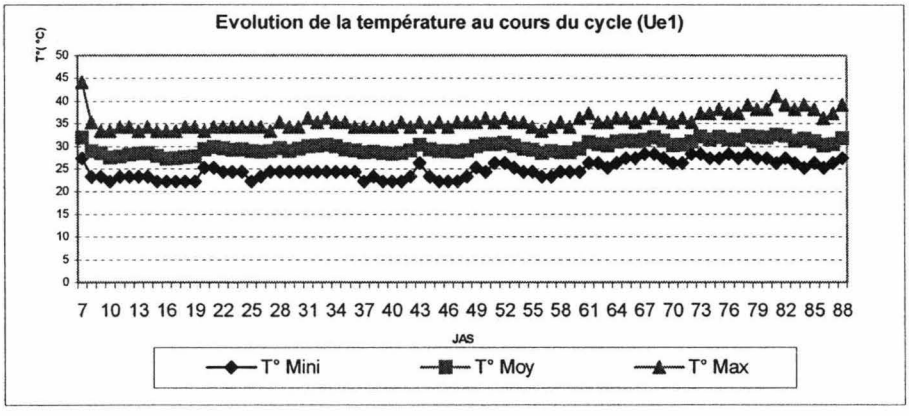


Figure 2. Evolution de la température du sol des pots au cours du cycle de développement (exemple de courbe donné sur un pot bien irrigué)

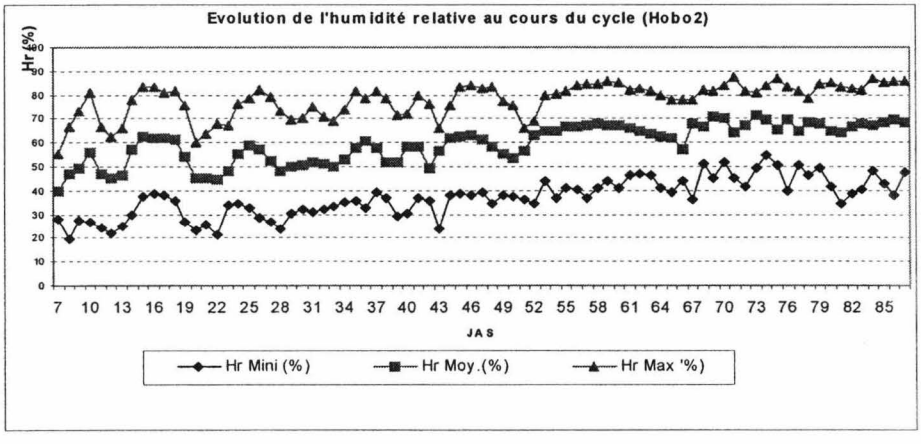


Figure 3: Evolution de l'humidité de l'air au cours cycle de développement (résultats donnés sur la sonde –air Hobo2)

3.1.3. Potentiel hydrique foliaire

Le potentiel hydrique foliaire (Ψf) est un indicateur physiologique de l'état hydrique de l'appareil aérien des plantes et donc de l'intensité du stress hydrique subit par la plante. Le suivi hebdomadaire du Ψf a permis de montrer que lors des 14 premiers jours d'imposition du stress hydrique (jis), la baisse du Ψf n'a pas dépassé -0,5MPa quel que soient la variété et le régime hydrique (figure 4). A partir du 21^{e} jis, un léger effet du régime hydrique sur le Ψf a été observé alors que les plants bien irrigués accusaient également une chute du Ψf avec-2,5MPa en moyenne sur les stressés contre -1,5MPa pour les irriguées. Cet effet a été hautement significatif au 26^{e} et au 33^{e} jis (P<0,0001).

Dans les mêmes conditions, la variété Fleur 11 a présenté des potentiels hydriques toujours inférieurs ceux de 55-437 avec -2,86 MPa contre-2,27 MPa pour 55-437 en fin de cycle. Son feuillage apparaît donc plus sensible à la dessiccation que celui de 55-437.

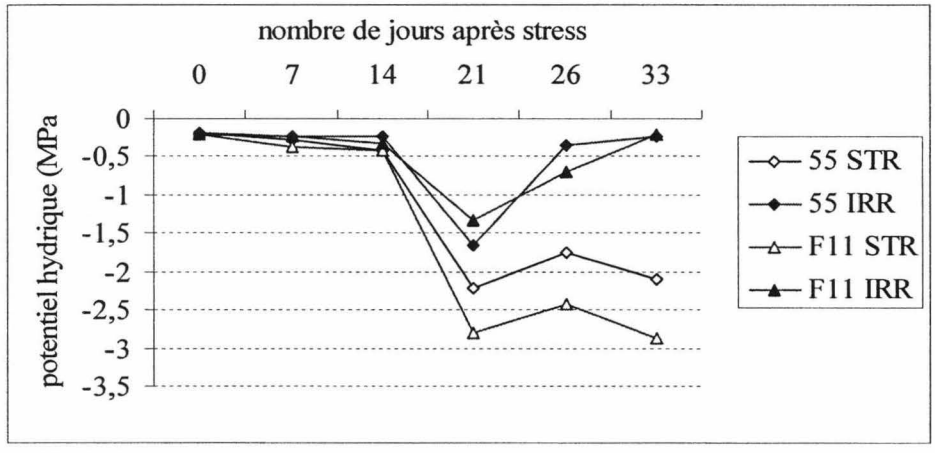


Figure 4. Evolution du potentiel hydrique foliaire après imposition du stress

3.1.4. Fluorescence chlorophyllienne

L'appareil de mesure de la fluorescence utilisé fournit une trentaine de variables liées à l'activité photochimique de la photosynthèse. Dans notre étude, deux paramètres ont été analysés Fv/Fm, le rendement maximum de la photochimie et SFI, l'indice de vitalité qui informe sur l'état de fonctionnement de l'appareil photosynthétique de la plante.

La figure 5 montre l'évolution de l'indice de vitalité, paramètre le plus sensible, durant la période de déficit. Cet indice est resté stable durant les 12 premiers jis puis il a baissé légèrement à partir du 13^{e} jis, Cependant aucune différence entre les variétés et entre les régimes hydriques n'a été significative. La cinétique de l'activité photochimique entre le 19^{e} et le 24^{e} jis (chute sur les deux régimes hydriques vers le 20^{e} jour suivi d'une reprise) correspond à celle des potentiels hydriques foliaires (figure 5). Mais à la fin de la période de stress, la chute de SFI a été modérée alors que les potentiels hydriques étaient bas.

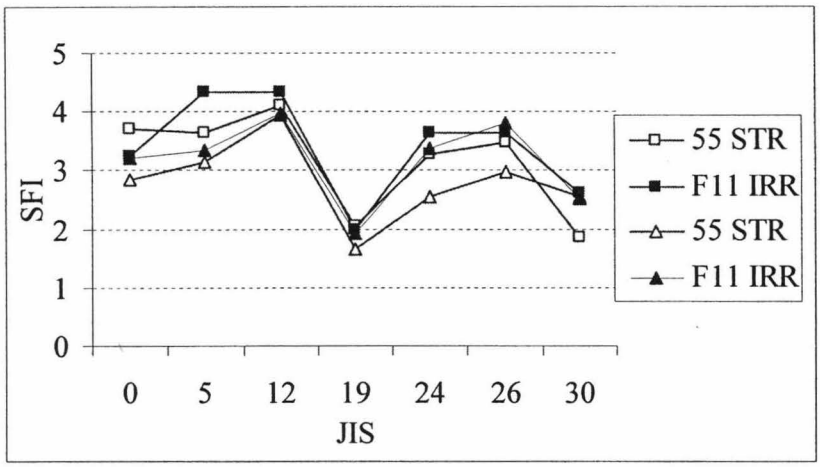


Figure 5. Evolution de l'indice de vitalité (SFI) après imposition du stress hydrique)

3.1.5. Caractères agronomiques

La production, variables poids de gousses et poids des graines, a été fortement diminuée par le déficit hydrique. L'analyse statistique a montré un effet très significatif ($P<0,01$) du régime hydrique sur le poids des graines sèches et un effet très hautement significatif ($P<0,001$) sur le poids de gousses sèches (tableau 2). Le facteur variété n'a pas eu d'effet significatif, ce qui signifie que les deux variétés sont voisines sur les critères de production en serre (tableau 2). On observe toutefois que les rendements de Fleur 11 ont été supérieurs à ceux de 55-437 et que le stress hydrique a fait chuter de 42,70 % le poids des gousses sèches chez 55-437 et de 34,04 % chez Fleur 11 (Figure 6).

L'infestation artificielle du sol n'a eu aucun effet sur l'ensemble des paramètres agronomiques et sur la qualité technologiques des graines (tableau 2) ce qui confirme l'absence d'effet direct d'une forte l'infestation du champignon sur la plante.

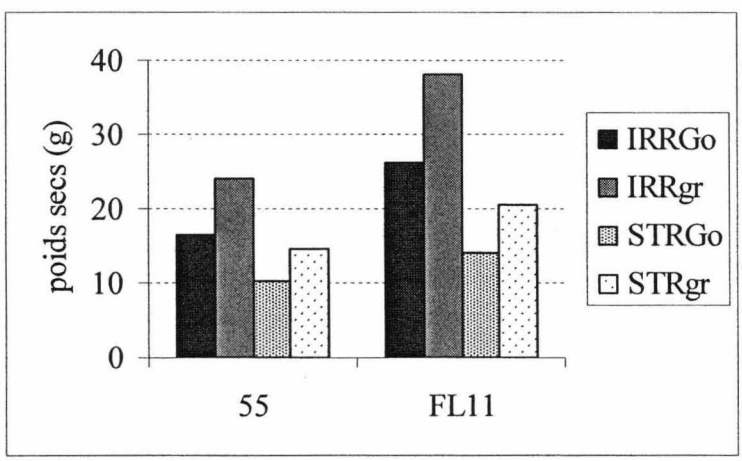


Figure 6. Poids de gousses (Go) et de graines sèches (gr) en fonction du régime hydrique (IRR : plantes bien arrosées et STR : plantes stressées) sur les deux variétés Fleur 11 (FL11) et 55-437 (55)

3.1.6. Qualité technologique des graines

Les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence d'effet significatif des facteurs variété et infestation sur les taux de maturité et de décorticage (tableau 2). Le taux d'humidité n'est pas modifié non plus en fonction des variétés et du régime hydrique, cependant on observe que le déficit hydrique n'a pas d'effet sur les taux d'humidité des graines mûres alors que ce dernier est diminué par le stress dans les gaines immatures (Figure 7).

Un effet variétal hautement significatif a été observé sur la taille des graines (P100gr). La taille des graines de Fleur 11 est plus élevée que celle de 55-437. La taille des graines est une caractéristique variétale (génétique) mais elle est influencée par l'environnement. Les différences variétales sur ce critère observées au champ sont conservées en serre.

Tableau 2: Effet statistique des facteurs variété (VAR), régime hydrique (RH), infestation artificielle du sol (INF).

Facteurs	NbrGo	PdsgrS	% mat	TxGoend	Tx decort	P100gr
VAR	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	***.
RH	***	**	n.s.	*	n.s.	n.s.
INF	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. Effet non significatif
* Effet significatif à P < 0,05
** Effet très significatif à 0,01< P < 0,005
*** Effet hautement significatif à P < 0,001

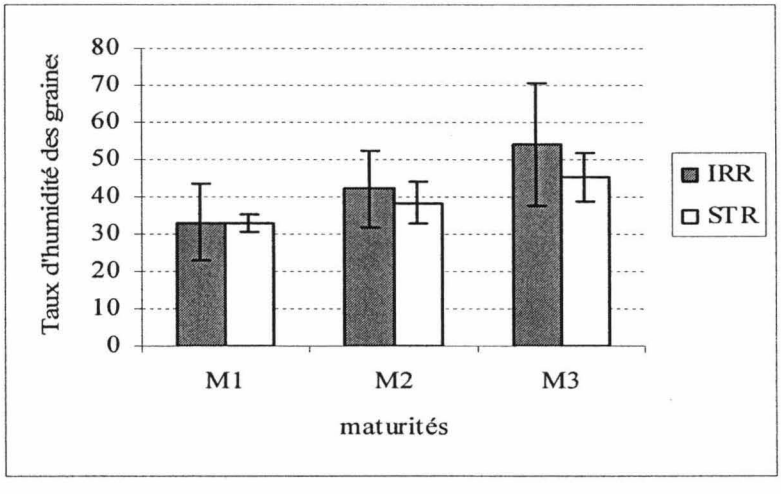


Figure 7. Taux d'humidité des graines en fonction de leurs niveaux de maturité

(M1 : très mûres, M2 : mûres, M3 : immatures)

Le stress hydrique a significativement augmenté le taux de gousses endommagées (TxGoend) qui est passé de 1,17 % sous irrigation à 9,36 % en condition de déficit hydrique (figure 8).

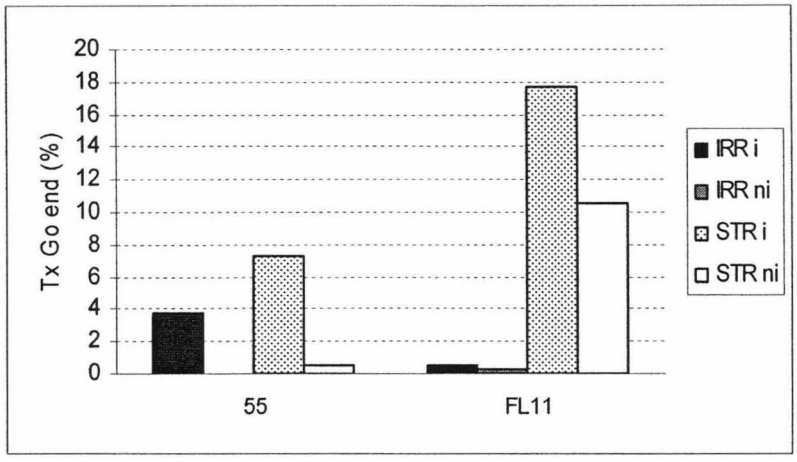


Figure 8. Pourcentage de gousses endommagées et flétries (TxGoend) en fonction du régime hydrique (IRR : plantes bien arrosées et STR : plantes stressées) sur les deux variétés Fleur 11 (FL11) et 55-437 (55)

3.1.7. Taux d'infestation du sol par *Af*

L'infestation artificielle du sol avec *Af* a entraîné une augmentation très importante du nombre de spores viables dans le substrat de culture. En moyenne jusqu'à 689 687,50 CFU par g de sol ont été dénombrées au niveau des pots inoculés artificiellement contre 999,5 CFU par g de sol au niveau des pots non infestés. Les tests de contrôle de l'infestation du sol effectués au 20^{e} jas n'ont mis en évidence aucune spore d'*Af* dans les pots de culture avant infestation artificielle par conséquent les spores observées sur les pots non infestés proviennent probablement de contaminations accidentelles survenues au moment de l'inoculation artificielle. Une augmentation beaucoup plus limité du nombre de spores dans le sol est observée sur les pots soumis à la contrainte hydrique soit en moyenne 811 187,50 CFU/g de sol contre 568 187,50 CFU/g de sol en conditions de bonne alimentation hydrique. Le facteur variétal n'a pas modifié le niveau d'infestation du sol.

3.1.8. Taux de colonisation par *Af* et de contamination par l'aflatoxine des graines

Lorsque les taux de colonisation par *Af* et de contamination par l'aflatoxine sont présentés sur les deux variétés (55-437 et F11) en fonction des niveaux de maturité de leurs graines, les niveaux de maturité M1 et M2 ont été rassemblés en graines mûres et le niveau M3 correspond aux graines immatures car des résultats antérieurs ont montré que le niveau intermédiaire M2 était très semblable au niveau M1 en ce qui concerne la colonisation par le champignon et la contamination par l'aflatoxine.

Les taux de colonisation des graines par Af sont relativement faibles mais non nuls (environ 20 %) du fait d'une contamination accidentelle qui n'a pu être évitée au niveau des pots non infesté alors qu'ils sont en moyenne à 70 % en conditions d'infestation artificielle du sol (figure 9). Le taux d'infestation des graines par Af est plus élevé quand la plante est stressée, notamment sur Fleur 11, en conditions de forte infestation du sol. Fleur 11 apparaît donc plus sensible à la colonisation par Af que 55-437 quel que soit le régime hydrique et le niveau d'infestation.

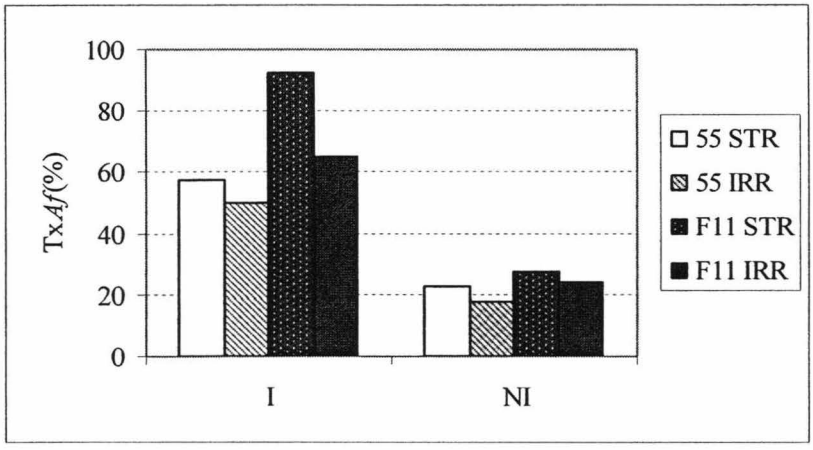


Figure 9. Effet du régime hydrique (STR: plantes stressées et IRR: plantes bien alimentées en eau en fin de cycle) et de l'infestation sur du sol (I: sol infesté, NI: sol non infesté).sur les taux de colonisation par *A. flavus (*Tx-*Af).*

La figure 10 présente les taux de colonisation des graines par *Af* en fonction de la maturité des graines (mature et immature) sans considérer le régime hydrique. L'inoculation artificielle du sol a entraîné une augmentation très sensible du taux d'infestation des graines par *Af* : l'effet de l'infestation du sol a été significatif sur les graines mûres comme sur les graines immatures. Les graines immatures montrent une sensibilité plus élevée à la colonisation par *Af* que les graines matures. En résumé l'augmentation des taux de colonisation par *Af* est plus forte sur Fleur 11 que sur 55-437 en particulier sur les graines non mûres de Fleur 11 qui atteignent 95% de colonisation (figure 10).

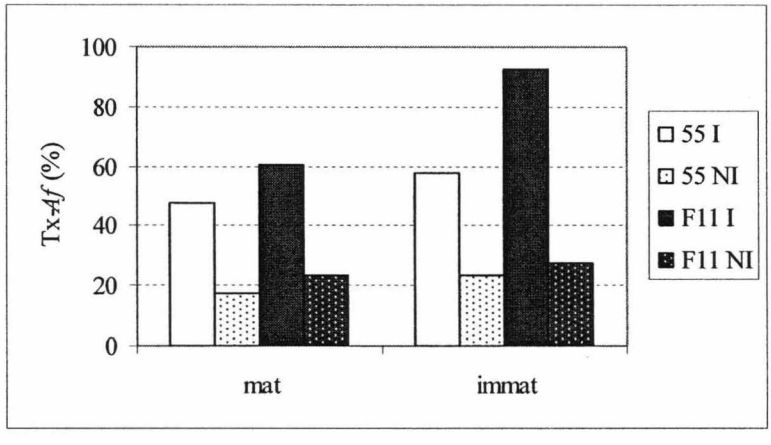


Figure 10. Effet de la maturité des graines (mat: graines matures et immat: graines immatures) et de l'infestation du sol (I: sol infesté, NI: sol non infesté) sur le taux d'infestation des graines par *A. flavus (*Tx-*Af).*

1.6.4. Taux de contamination des graines par l'aflatoxine

Les résultats présentés sur la figure 11 montrent qu'en conditions de non-infestation du sol, le taux de contamination des graines par l'aflatoxine a été quasiment nul quelque soit la variété et le régime hydrique. La teneur en aflatoxine des graines a donc été significativement augmentée par l'infestation artificielle en particulier en condition de stress. C'est le niveau stressé de la variété Fleur 11 en conditions d'infestation qui présente le taux d'aflatoxine le plus élevé avec près de 20 ppb (figure 11).

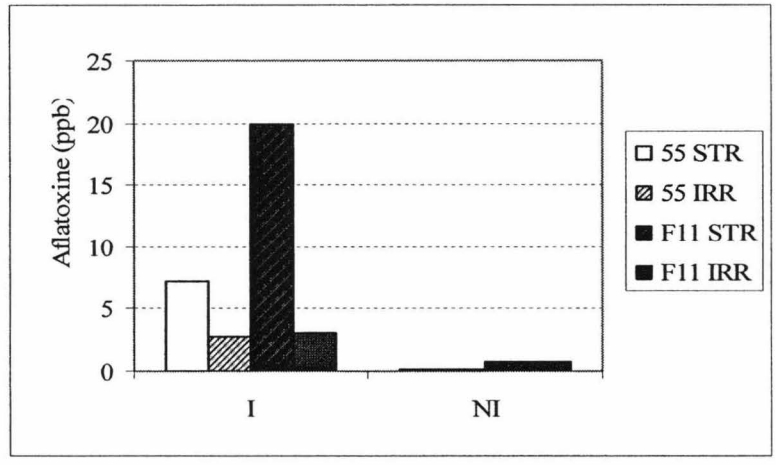


Figure 11. Teneurs en aflatoxine en fonction de l'infestation du sol (I: sol infesté, NI: sol non infesté) et du régime hydrique (STR : plantes stressées et IRR : plantes bien alimentées en eau en fin de cycle).

La figure 12 présente les teneurs en aflatoxine des graines en fonction de leur niveau de maturité. Les taux d'aflatoxine sont très bas en conditions de non-infestation alors que les taux de colonisation par le champignon étaient voisins de 20% (Figure 11). L'infestation du sol a augmenté très significativement les teneurs en aflatoxine sur les deux variétés. Cet effet a été plus fort sur les graines immatures que sur les graines mûres. Les graines mûres des deux variétés ont montré des taux d'aflatoxine supérieurs à 4 ppb en conditions d'infestation. La variété 55-437 a présenté des taux de contamination plus faibles que ceux de Fleur 11. Les graines immatures de Fleur 11 ont été les plus contaminées en conditions d'infestation du sol (Figure 12).

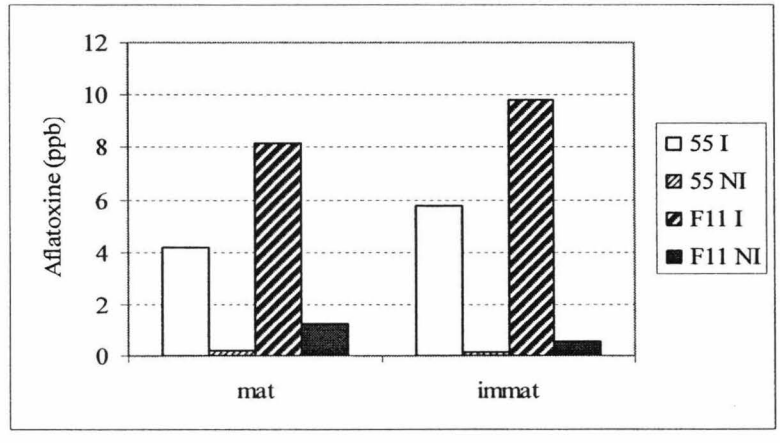


Figure12. Teneurs en aflatoxine des graines en fonction de leur maturité (mat : graines matures et immat : graines immatures).et de l'infestation du sol (I: sol infesté, NI: sol non infesté).

Une corrélation très hautement significative ($r = 0,72$; $P < 0,001$) a été trouvée entre les taux d'infestation par *Af* et les taux de contamination par l'aflatoxine.

Des coefficients de corrélations (r) très significatifs ont été également calculés entre les taux d'infestation par *Af* et les teneurs en aflatoxine lorsque l'on considère uniquement les graines mûres (r

= 0,75) et les graines immatures (r = 0,69). Les valeurs des coefficients de corrélation entre les Tx *Af* et teneurs en aflatoxine sont de 0,69 pour la variété 55-437 et de 0,71 pour Fleur 11 (Tableau 3).

Cœfficients de corrélation (r)	55-437	Fleur 11	Graines mûres	Graines immatures
	0,69***	0,71***	0,75***	0,69***

Tableau 3. Valeur des coefficients de corrélation entre les taux de colonisation par *A. flavus* (Tx *Af*) et les teneurs en aflatoxine selon la variété et le niveau de maturité des graine

3.2. Discussion

Paramètres agronomiques et physiologiques

La mise au point d'un dispositif expérimental discriminant et fiable est la première condition à remplir pour réaliser des criblages variétaux et comprendre les mécanismes de résistance à l'aflatoxine. Au cours de cette expérimentation, les températures moyennes obtenues dans la serre régulée (29 et 33°C) et les humidités moyennes relatives (39,77 et 71,35%) ont permis, comme les années précédentes, l'obtention de conditions environnementales favorables à la croissance de l'arachide et du champignon et à la contamination de l'arachide par l'aflatoxine.

Un retard dans la maturation des graines et donc un allongement du cycle ont été observés (103 jours au lieu de 90 jours). Ce résultat qui n'a pas été observé dans les expérimentations précédentes utilisant du sol non stérile. Pour l'expliquer, rappelons que l'arachide est une espèce à floraison continue par conséquent ce retard résulte probablement d'une perturbation de la floraison dite «utile» (les fleurs formées durant la première semaine de floraison) provoquée par une carence en éléments nutritifs apparue au moment de l'émission des premières fleurs. Sur un substrat stérilisé, des ajustements relatifs à l'alimentation minérale des plantes sont donc nécessaires à ce moment-là du cycle où l'arachide a des besoins importants.

Malgré un dessèchement du feuillage plus sévère chez Fleur 11 en conditions de sécheresse, sa productivité agronomique au champ est généralement meilleure que celle de 55-437 du fait de sa forte tolérance et d'un système racinaire plus performant (Clavel *et al.*, 2005). Dans l'expérimentation 2005 cette différence a été faible car l'exploration racinaire est limitée par la taille des pots ce qui ne permet pas l'expression de ce caractère chez Fleur 11. Sur le plan physiologique, le potentiel hydrique foliaire de Fleur 11 est descendu plus bas que celui de 55-437, à près de -3MPa. Mais cette valeur n'est pas celle que du potentiel hydrique létal pour l'arachide qui est inférieure à -5MPa pour ces 2 variétés. Fleur 11 a montré une sensibilité foliaire au déficit hydrique plus élevée que celle de 55-437 conformément aux observations habituelles en serre comme au champ. Les conditions d'application du stress hydrique en pot (apport hydrique limité mais non nul en fin de cycle) n'ont pas permis l'obtention d'une baisse continue du potentiel hydrique foliaire comme cela s'observe au champ. Dans les conditions de champ en effet, la suspension d'arrosage peut être totale pendant les quatre dernières semaines de culture sans affecter la survie de la plante car cette dernière dispose d'un volume de terre beaucoup plus important pour l'exploration racinaire. La chute modérée de SFI, le « Structure Fonction Index », calculé à partir de la fluorescence émise et l'activité des stomates (*Clavel et al.*, in press) a été modérée ce qui indique que le déficit hydrique appliqué dans l'expérimentation n'a pas endommagé l'appareil photosynthétique des plantes. Ces résultats montrent qu'il doit être possible d'appliquer un déficit hydrique plus sévère afin d'accentuer les différences variétales.

Enfin notons que l'infestation artificielle n'a eu aucun effet sur les variables agronomiques et physiologiques ce qui est conforme aux résultats attendus,

Paramètres de contamination

Les taux de colonisation des graines par *Af* et de contamination par l'aflatoxine ont été plus élevés chez Fleur 11 par rapport à 55-437 et cela pour toutes les classes de maturité. En conditions d'infestation, la teneur en aflatoxine des graines de la variété Fleur 11 est très augmentée par le déficit hydrique. Cette observation a été réalisée lors des deux expérimentations précédentes. Cependant Fleur 11 est plus résistante à la sécheresse que 55-437 en termes de productivité (Clavel *et al.*, 2005). Par conséquent, s'il existe bien une liaison générale entre résistance à la sécheresse et résistance à l'aflatoxine (Cole *et al.*, 1995 ; Holbrook *et al.*, 2000), celle-ci correspond à une résistance à la sécheresse mettant en oeuvre l'esquive c'est-à-dire le niveau de précocité des génotypes. En effet, dans notre situation où sont comparés deux variétés de cycles identiques, cette relation n'est plus vérifiée. Par ailleurs, les graines mûres et les graines immatures de Fleur 11 sont toujours plus sensibles que les graines mûres et immatures de 55-437 en conditions de forte infestation, on peut donc en conclure que la résistance de 55-437 est intrinsèque car elle s'exprime dans toutes les classes de maturité et dans diverses conditions environnementales.

De nombreux auteurs ont montré que les graines immatures étaient plus exposées à la contamination par l'aflatoxine que les graines mûres (Sanders, et *al.*, 1981; Cole, *al.*,1982; Hill et *al.*, 1983; Sanders et *al.*, 1985 ; Cole et *al.*, 1995) car le processus physiologique de maturation des graines est affecté par le manque d'eau. Le ralentissement d'activité métabolique a été traduit dans notre étude par un taux d'humidité des graines immatures diminué en conditions de stress alors qu'il demeurait inchangé par le stress dans les graines mûres. Ce résultat confirme donc l'importance de la précocité des génotypes : lorsque les variétés esquivent le déficit hydrique, leur taux de maturité n'est pas altérée par le manque d'eau.

Le déficit hydrique a provoqué une multiplication du champignon dans le sol sans doute du fait de températures du sol supérieures dans les pot ayant subit le déficit hydrique. Toutefois cette augmentation est très modérée au regard de celle qui est provoquée par l'infestation artificielle. Le déficit hydrique influence donc à la fois la réponse variétale sur le critère de maturité des gousses mais aussi la pression de l'inoculum.

Il n'y a pas eu de différence entre les deux variétés sur les taux de maturité des gousses dans les conditions de l'expérimentation conduite en 2005. Cependant lors d'essais antérieurs et surtout dans les conditions de sécheresse de fin de cycle au champ un défaut de maturation des gousses de Fleur 11 est observé (Clavel et al., 2004). Ce défaut de maturité dans les conditions de champ accentue sa sensibilité à Af et à l'aflatoxine. En outre, le ralentissement métabolique consécutif au stress hydrique augmente la vulnérabilité des gousses aux parasites du sol et le taux de gousses endommagées qui sont la première source de contamination. Cet effet a également été observé en serre mais il reste beaucoup plus limité qu'au champ.

Les taux de colonisation des graines par *Af* ont été significativement corrélés aux taux de contamination des graines par l'aflatoxine. Cette corrélation est rarement mise en évidence lorsqu'un faible nombre de génotypes est comparé car l'échantillonnage pour les dosages de l'aflatoxine entraîne des biais dans l'évaluation de ce paramètre. La valeur du coefficient de corrélation (entre 0,6 et 0,7) est conforme aux résultats obtenus par d'autres auteurs (Dorner *et al.*, 1998; Mehan et *al.*,1988) sur un nombre de génotype plus important. Les niveaux de corrélation sont comparables pour les deux variétés ce qui ne permet pas de distinguer une résistance spécifique à l'infestation par le champignon ou à la contamination par l'aflatoxine chez l'une des deux variétés.

3.3. Conclusion et perspectives

L'expérimentation conduite en 2005 a permis de reproduire en grande partie les résultats obtenus en serre les années précédentes sur un sol non stérilisé en dépit de l'allongement du cycle. Après trois ans d'expérimentation sur des variétés de même cycle et adaptées au même environnement il a été possible de préciser la mise au point d'un modèle expérimental fiable en serre pour simuler les conditions de contamination par l'aflatoxine en pré récolte a été réalisée.Deux types de résultats ont été obtenus le

premier concerne les relations entre l'adaptation à la sécheresse et la résistance à l'aflatoxine chez l'arachide et les seconds sont d'ordre méthodologique.

En ce qui concerne les relations entre résistance à la sécheresse et résistance à l'aflatoxine, on a montré que la stratégie d'évitement associée à une taille de graines réduite, celle de 55-437, est plus efficace que celle de Fleur 11 qui possède une tolérance à la sécheresse supérieure. Par ailleurs 55-437 présente une résistance intrinsèque qui limite l'infestation par Af et la contamination par l'aflatoxine quelles que soient les conditions environnementales.

Du point de vue méthodologique, l'infestation artificielle, les conditions de culture et d'application du déficit hydrique en pots sont maîtrisés. Cette standardisation devrait permettre de limiter les fortes variations et d'améliorer la répétabilité des réponses variétales en matière de résistance-sensibilité à l'aflatoxine en pré-récolte. Par ailleurs, ce type de dispositif permettra de progresser dans la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires de la résistance variétale à la contamination de l'arachide par l'aflatoxine en pré-récolte.

II. Activités de formation / valorisation

Cette quatrième année de contrat a permis une valorisation des résultats en matière de formation universitaire, de posters présentés lors de congrès internationaux et de publications d'articles dans des revues scientifiques de rang A.

Formation

Mémoire présenté pour l'obtention d'un *Master* en Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux 2 intitulé, « Contamination de l'arachide (*Arachis hypogaea L.*) par l'aflatoxine : mise au point d'un dispositif expérimental pour l'étude de l'infestation en pré-récolte » soutenu par Oumar Diallo,le 13 juillet 2005.

Dernière année de *Doctorat* de l'Université Paris 12-Val de Marne pour une étudiante sénégalaise, Nani K. Dramé. La soutenance est prévue en décembre 2005.

Publications

Clavel, D, Drame, NK, Macauley, HR, Braconnier, S, Laffray, D., 2005. Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. *Environ. Exp. Bot.* 54: 219-130.

Clavel, D., Drame, NK, Diop ND, Zuily-Fodil,Y. 2005. Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne. Première partie : revue bibliographique *OCL*, Vol 13(3)

Clavel, D, Diouf, O, Khalfaoui, JLK, Braconnier, S. (In press) Genotypes variations in fluorescence parameters among closely related groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines and their potential for drought screening programs. *Field Crops Research.*

Clavel, D, Khalfaoui, JLK Drame, NK, Diop ND, Diouf, O, Zuily-Fodil,Y. 2005. Adaptation à la sécheresse et création variétale. Deuxième partie : une approche pluridisciplinaire pour la création variétale (accepté) par *OCL*

Dramé, KN, Clavel, D, Cruz de Carvalho, MH, Passaquet, C, Zuily-Fodil, Y. Water deficit induces variation in expression of stress responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars differing in their tolerance to drought. Accepté à *Plant Science* sous réserve de modifications.

Congrès internationaux

Clavel, D. Diouf, O, Khalfaoui, JLK, Braconnier, S. Variation in drought adaptation among closely related early groundnut lines. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.

Diouf, O, Clavel, D, Diedhiou, PM, Sarr, B, Braconnier, S. Agrophysiological traits of preharvest contamination in groundnut. Poster présenté à la conférence INTERDROUGHT II, Rome, 24-28 septembre 2005.

Références bibliographiques

Anderson WF., Holbrook CC., Wilson DM., et Matheron ME., 1990. Evaluation of preharvest aflatoxin contamination in several potentially resistant peanut genotypes. Peanut Sci. **22**: 29-32

Clavel, D., Sarr, B., Marone, E., et Ortiz, R., 2004. Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions. Agronomie, **24**: 1-8.

Clavel D., Drame NK., Macauley HR., Braconnier S., et Laffray D., 2005. Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. Environ. Exp. Bot.**54**: 219-230.

Clavel D., Diouf O, Khalfaoui JLK, Braconnier S..Genotypes variations in fluorescence parameters among closely related groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines and their potential for drought screening programs (in press pour Field Crops Research)

Cole RJ., Hill RA., Blankenship PD., Sanders TH,. Garren KH., 1982. Influence of irrigation and drought stressed on invasion of *Aspergillus flavus* of corn kernels and peanut pods. Dev Ind Microbiol **23**: 229-236.

Cole RJ., Dorner JW., Sanders TH. et Blankenship PD., 1985. Mean geocarposphere temperatures that induces pre-harvest aflatoxin contamination of peanuts under stress. Mycopathologia, **91**: 41-46.

Cole RJ., Dorner JW., Holbrook CC., 1995. Advances in mycotoxin elimination and resistance. *In* Advances in Peanut Sci.: 456-474.

Cole RJ., Timothy H., Sanders TH., Blankenship PD., 1989. Interrelationship of kernel water acticity, soil température, maturity, and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought stressed peanuts. Mycopathologia **105**: 117-127.

Dorner JW., Cole RJ., Blankenship PD., et Hill RA., 1998. Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts. Biological Control **12**: 171-176.

Dorner TH., Cole RH., Sanders RJ. et Blankenship PD., 1989. Interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought stressed peanuts. Mycopathologia **105**: 117-128.

Hill RA., Blankenship PD., Cole RJ., Sanders TH., 1983. Effet of soil moisture and temperature on prehavrest invasion of peanuts by the *Aspergillus flavus* group and subsequant aflatoxine developpment. Appl Environ Microbiol **45**: 628-33.

Holbrook CC., Kvin CK., Rucker KS., Wilson DM., Horn BW., et Matheron ME., 2000. Preharvest aflatoxin contamination in drought-tolerant and drought-intolerant peanut genotypes. Peanut Sci. **27:** 45-48.

Horn BW., DornerJ. W., Greene RL., Blankenship PD. et Cole RJ., 1994. Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seed. Mycopathologia, **125**: 179-191.

Mehan VK, McDonald D. et Ramakriashna N., 1988. Effects of adding inoculum of *Aspergillus flavus* to pod_zone soil on seed infestation and aflatoxin contamination of peanuts genotypes, Oléagineux **43**: 26-28

Mehan VK., Ba A., Mc Donald D., Renard, JL., Nageswara Rao, RC. et Jayanthi S., 1991. Field screening for groundnut to seed infection by Aspergillus flavus. Oléagineux **46**: 109-115.

Sanders TH., Cole RJ., Blankenship PD. et Hill RA., 1985. Relationship of environmental stress duration to *Aspergillus flavus* invasion and aflatoxin production of preharvest peanuts. Peanut Sci. **12:**

Waliyar F., Ba A., Hassan H., Bonkoungou S., Bosc JP., 1994. Source of resistanceto *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in groundnut genotypes in west Africa. Plant Disease **78**: 704-708.

RAPPORT CIRAD : DEUXIEME PARTIE

Opération test de production d'arachide de qualité par les producteurs de Paoskoto (WP4)

Ce rapport de synthèse fait état des résultats obtenus par le CIRAD au cours de la campagne 2004 dans le cadre d'une opération test de production d'arachide de qualité conduite en collaboration avec les organisations de producteurs (OP) de la communauté rurale de Paoskoto regroupées au sein du Comité Local de Concertation des Organisations de Producteurs (CLCOP). Paoskoto est situé dans le département de Nioro du Rip, région de Kaolack.

Cette opération test a été commanditée par l'Agence Nationale de Conseil Agricole et Rural (ANCAR) en accord avec l'Association Sénégalaise pour la Promotion du Développement à la Base (ASPRODEB) et conduite par le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) avec les interventions du Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques (GRET) au Sénégal et de la Division des Semences (DISEM) du Ministère de l'Agriculture du Sénégal. L'opération a pu bénéficier d'un financement complémentaire attribué par le Programme d'Organisation et de Gestion Villageoise (POGV2) qui intervient dans la même zone et du projet INCO « Groundnut Aflatoxin ».

L'équipe du CIRAD, coordonnée par Alain Mayeux (agronome, spécialiste culture arachide) était composée de :

- Mateugue Diack, chercheur
- Kader Ndao, technicien
- Issa Diallo, technicien
- Mamou Diouf, observateur
- Amidou Seck, observateur
- Thierno Sow, observateur
- Oumar Niasse, observateur
- Abdoulaye BA observateur

L'opération a également accueilli trois stagiaires étudiants de l'ENSA, dans le cadre de leur stage de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome.

- Bassirou Sarr
- Lamine BA
- Djibi Sow

SOMMAIRE

1. Introduction 35

2. Objectifs 35

3. Matériel végétal 35

4. Production d'arachide de qualité en milieu paysan 36

4.1 Choix des producteurs *36*

4.2 Dispositif de production *36*

4.3 Mise en place de la culture *36*

4.3.1 Sélection des producteurs 36

4.3.2 Sélection des parcelles 37

4.3.3 Distribution des semences et autres intrants 37

5. Résultats et discussion 38

5.1 Préparation du sol et semis *38*

5.2 Entretien des champs *38*

5.3 Récolte *39*

5.3.1 Densités à la récolte 39

5.4 Rendements *39*

5.4.1 Rendements en gousses et Fanes 39

5.5 Commercialisation *42*

5.5.1 Problème des aflatoxines 42

5.5.2 Procédures de commercialisation 43

5.5.3 Qualité de la production 44

5.6 Suivi socio-économique *47*

5.6.1 Contexte économique 48

5.7 Conditionnement et évaluation de la valeur commerciale *49*

5.8 Les activités de décorticage tri et conditionnement *50*

5.8.1 Phase de pré-usinage 50

5.8.2 Usinage 50

5.9 Coûts du décorticage et tri graines HPS *53*

6. Conclusions et perspectives 53

ANNEXES

1 Introduction

Le présent document synthétise les résultats des activités de recherche et développement menées par le CIRAD dans le cadre d'une opération test de production d'arachides de qualité commanditée par l'Agence Nationale de Conseil Agricole et Rural (ANCAR) et ses partenaires, dans la perspective de mise en en oeuvre d'un projet pilote d'amélioration de la filière de production et de valorisation de l'arachide de bouche au Sénégal.

2 Objectifs

Optimiser et réguler les approvisionnements en arachide et créer une image de qualité des produits sénégalais font partie des objectifs de la filière. Pour cela il s'agit de mettre au point un certain nombre de techniques, d'outils d'aide à la décision et de pratiques de travail à l'usage des acteurs de la filière et des décideurs. A l'échelle de la filière plusieurs questions se posent :
Comment gérer la qualité sanitaire de la production dans les zones de production (bassin arachidier et fleuve) ?
Quelle organisation cohérente de la collecte proposer ?
Peut-on, et comment, certifier la qualité du produit fini «arachide de bouche » d'exportation ?
Comment optimiser le revenu de la filière dans sa globalité ainsi qu'au niveau de chaque acteur ?

3 Matériel végétal

Durant la période précédente, il a été possible de tester certaines variétés issues d'un programme de sélection commun ISRA/CERAAS/CIRAD et de produire à partir des quelques kilogrammes disponibles les quantités détaillées dans le tableau 1. Pour parvenir à ces quantités, deux multiplications sous irrigation ont été conduites dans la zone de Savoigne (région du fleuve Sénégal).

Tableau 1 : Production de semences de base

Variétés	Semences		
	cycle	Graines triées	Coques triées
55-437	90-100	620	8800
Fleur 11	90-100	260	3475
SRV1-19	90-100	500	4350
73-9-11	80-90	0	900
55-33	80-90	0	375
SRV1-3 (ex 119-08-13)	85-95	220	0
78-936	75-85	680	100
ICGV 97052	105-115	80	0
57-216	90-100	400	0
109-15-17	90-100	220	0
H75-0	115-125	600	0
ICGV 97065	115-125	100	0
ICGV 97049	115-125	220	0
ICGV92087	115-125	0	60
55-128	85-95	40	0
55-319	85-95	38	0
55-21	80-90	20	0
ICGV-SM 87003	90-100	0	10
73-30	90-100	25	0
		4023	18070

Pour des raisons de financement, le projet pilote n'a pu démarrer comme prévu en janvier 2004. Pour ne pas perdre les acquis (semences) et maintenir la dynamique de réforme entreprise, l'ANCAR et ses partenaires ont proposé la conduite d'une opération préliminaire sur 50 hectares.

Cette phase préliminaire fait l'objet de ce rapport, elle consistait à encadrer dans la zone sud du bassin arachidier, un groupe de petits producteurs volontaires pour assurer une production d'arachide suivant certaines pratiques agricoles, et tester au sein de la communauté rurale la faisabilité agro-socio-économique d'une filière de production d'arachide de qualité susceptible d'assurer une production semencière communautaire de qualité et de proximité et une meilleure valorisation de la production sur les marchés de l'arachide de bouche ou de confiserie.

4. Production d'arachide de qualité en milieu paysan

Après concertation avec les différents partenaires d'encadrement agricole (ANCAR et ASPRODEB), il a été convenu de retenir la zone de Paoskoto, située dans le sud du bassin arachidier où le risque pluviométrique est faible, les organisations de producteurs dynamiques et l'encadrement agricole bien présent.

Afin d'informer du mieux possible les producteurs et autres acteurs de la filière, un atelier d'information a été organisé le 17 mai 2004 à Paoskoto. Cet atelier a permis de présenter les enjeux de l'opération, de prendre l'avis de tous les acteurs présents et d'arrêter les activités de la campagne.

4.1Choix des producteurs

Le choix des producteurs a été fait en relation avec le Cadre Local de Concertation des Organisations de Producteurs (CLCOP) et sur la base de critères technico-économiques. Il va de soit qu'une production de qualité requière un minimum de moyens techniques à savoir un sol adapté, un équipement de base fonctionnel (semoir, houe, pulvérisateur, souleveuse, etc), une main d'œuvre suffisante et des ressources financières permettant d'acquérir un minimum d'intrants.

4.2 Dispositif de production

La zone a été partagée en cinq sites : Gapakh, Ndémène, Paoskoto, Daga et Firgui rattachés à la communauté rurale de Paoskoto (Cf. carte). Les agriculteurs volontaires appartenaient tous à des organisations de producteurs (OP) de plusieurs villages avec un agriculteur par village afin de permettre à un grand nombre d'agriculteurs voisins, d'apprécier de visu la conduite des activités et de se porter éventuellement volontaires pour la suite du projet en toute connaissance de cause.

4.3 Mise en place de la culture

L'itinéraire technique préconisé est basé sur l'application de bonnes pratiques agricoles (BPA) en conditions pluviales afin d'apporter l'environnement le plus favorable à l'évolution de la culture. Ces BPA (annexe 1) ont fait l'objet d'une formation des encadreurs afin qu'ils puissent conseiller les producteurs et elles ont été régulièrement rappelées par l'équipe technique tout au long de la campagne agricole.

4.3.1 Sélection des producteurs

Les producteurs, tous volontaires, ont été choisis par leurs organisations de producteurs en relation avec l'équipe technique et sur la base de critères (moyens de production) présentés. Une fois sélectionnés, ces agriculteurs ont été conviés à plusieurs réunions d'information concernant l'objet de l'opération et le calendrier agricole.

Calendrier	Opérations
Avant semis	Sélection des parcelles Distribution des intrants Décorticage et traitement des semences Préparation du sol
A partir 10 juillet	Semis
15-20 JAS	Epandage de l'engrais
40 JAS	Epandage phosphogypse
Fonction des observations	Binages et desherbages manuels
Fonction des observations	Traitements insecticides
A partir 75 JAS	Suivi de la maturité
Fonction maturité	Récolte, séchage, égoussage, vannage, tri des gousses
Décembre	Commercialisation
Janvier-mars	Transformation, test de commercialisation

4.3.2 Sélection des parcelles

Après identification des agriculteurs, l'équipe technique a eu à visiter chacun d'entre eux afin de vérifier l'état de la parcelle proposée. Dans certains cas (fortes marques d'érosion, bas-fonds, nombreuses termitières, etc) l'agriculteur a eu à proposer une autre parcelle. Après sélection, chaque parcelle a été mesurée.

4.3.3 Distribution des semences et autres intrants

Les semences, produites en contre saison froide sur le fleuve, ont été transférées début juin et distribuées aux producteurs sur la base de 125 kg base coque par hectare. Chaque agriculteur a décortiqué et trié ses graines qui ont été contrôlées par l'équipe technique avant d'être traitées au Granox®[1] à la dose de 200g pour 100kg de graines. Après décorticage et triage, l'équipe technique a pris soin de contrôler le poids de bonnes semences afin de s'assurer que les quantités disponibles étaient suffisantes pour ensemencer un hectare. Les semences ont été conservées en sacs polypropylène jusqu'au semis. L'engrais (6-20-10) et le phosphogypse (plâtre agricole) ont été commandés par l'opération et mis à la disposition des producteurs sous forme de prêt remboursable à la commercialisation.

[1] Granox® est composé de captafol-carbofuran

5. Résultats et discussion

5.1 Préparation du sol et semis

Pour des raisons de sécurisation de la production et de débouchés (marchés de la petite graine plus favorable aux conditions de production du Sénégal), il a été décidé de tester certaines variétés hâtives – Tableau 5, dans une zone traditionnellement productrice de variétés tardives.

Tableau 2 : Surfaces emblavées par variété

Variétés	Surfaces emblavées (Ha)
55-437	23
Fleur	15
11	5
SR V1-	5
19	2
73-9-11	
55-33	

Ce changement entraîne bien évidemment un calage de la date de semis afin de s'assurer que la période de récolte se fera hors saison des pluies pour éviter tout risque de regermination de ces variétés hâtives de type spanish non dormantes. Les variétés SRV1-19, 73-9-11 et 55-33 sont issues d'un programme de sélection conjoint ISRA/CERAAS-CIRAD, elles ont été évaluées par la recherche, multipliées dans différentes conditions (pluviales, irriguées) et soumises à l'appréciation de certains tradeurs européens qui les ont reconnues comme répondant bien aux critères du marché export de la petite graine.

Suite aux essais antérieurs de date de semis, il a été conseillé aux producteurs de semer après le 10 juillet, ce qui a été appliqué par tous. Ce décalage leur a laissé le temps de semer leurs cultures de mil et d'arachides tardives sur les premières pluies de juin. Ces pluies de juin ont favorisé la levée des adventices ce qui a nécessité un travail (binage) du sol avant le semis de juillet. Les pluies de début de campagne ont été bonnes, les semis ont été effectués dans de bonnes conditions avec une densité moyenne à la levée de près de 100.000 pieds/ha.

Après le semis la pluviométrie a été bien répartie avec un cumul moyen de 800 mm – Tableau 6. Plusieurs champs voisins, non concernés par l'opération, ont été suivis comme témoins. Tous ces champs ont été semés avec la variété tardive 73-33 traditionnellement produite dans cette zone. Dans ces champs, la densité moyenne constatée a été de 72.000 pieds/ha.

Tableau 3 : Pluviométrie décadaire (mm) - Paoskoto.

	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.
Décade 1	22.1	47.0	105.0	20.0	13.0
Décade 2	67.1	51.5	115.5	122	0
Décade 3	33.1	134.5	73	26	19
Total mensuel	122.3	233.0	293.5	168.0	32
Cumul		355.3	648.8	816.8	848.8

5.2 Entretien des champs

L'entretien des champs, déterminant pour une bonne installation et un bon développement des plantes vis-à-vis de la faible ressource en eau, a été globalement bien conduit avec en moyenne 3,7 binages par champ à la houe sine (traction animale) et 1,6 binages manuels entre les pieds sur les lignes.

La pression parasitaire a été normale et sans grande conséquence sur les rendements. Cette zone a heureusement échappé aux attaques de criquets qui ont gravement endommagé certaines zones de production du Sénégal.

5.3 Récolte

A partir du 80ème jour après le semis puis tous les 5 jours, des tests de maturité ont été faits sur quelques pieds pris au hasard dans chaque parcelle pour un examen de toutes les gousses et un classement suivant la consistance et la couleur du parenchyme interne de la coque. La maturité est considérée comme atteinte lorsque de petites taches brunes apparaissent sur ce parenchyme interne de la coque. Suite à ces tests, la récolte a été effectuée entre le 15 et le 25 octobre suivant les variétés.

5.3.1 Densités à la récolte

Le traitement des semences et le bon entretien des champs ont permis d'obtenir une densité moyenne à la récolte voisine de 85 000 pieds/ha soit 85% de la densité à la levée contre seulement 57 500 pieds (79%) pour la variété témoin 73-33 – Figure 2. Le plus fort taux de mortalité pendant le cycle végétatif a été enregistré sur la variété Fleur 11 (25,5%) contre 16,3% pour les variétés 55-437 et 73-9-11 et seulement 8% pour la variété SRV1-19.

Par rapport aux écartements recommandés de 50 cm entre les lignes et 15cm entre les pieds sur une même ligne, les écartements moyens mesurés entre les lignes confirment le respect de cet écartement avec en moyenne : 48,6cm à Gapakh, 43,1cm à Paoskoto, 45,8cm à Ndéméne et 50,5cm à Dagga. Par contre, l'écart avec la densité théorique de 133 000 pieds/ha provient essentiellement d'un écartement irrégulier entre les pieds d'une même ligne dû à une mauvaise distribution des graines, conséquence d'une part de la vétusté des semoirs et d'autre part des disques par toujours adaptés à la taille des graines ou des disques de fabrication artisanale mal ajustés au système d'entraînement. En général les producteurs ont utilisé le disque type 24 trous pour la variété Fleur 11 et le disque type 24 crans pour les autres variétés.

5.4 Rendements

Juste avant la récolte, des échantillons de pieds ont été prélevés dans chaque champ (carrés de rendements) afin dévaluer la production en gousses et fanes et aider à l'organiser de la commercialisation (besoins en trésorerie, en sacherie, logistique de transport, etc).

5.4.1 Rendements en gousses et fanes

Les estimations de rendement prévoyaient d'excellents rendements avec une moyenne de 1600 kg/ha. Dans une situation de crise semencière et malgré l'engagement des producteurs, une partie de la production a été conservée par ces derniers. Malgré tout, le rendement moyen en gousses obtenu à partir des quantités livrées est très correct avec 1168 kg/ha avant tri par les producteurs et 1068 kg/ha après tri (Fig. 3), contre seulement 700 kg/ha pour la production non triée à partir des champs témoins. Cette opération à permis de produire et commercialiser 58 401 kg sur les 50 hectares emblavés. Le rendement moyen en fanes a été de 2180 kg/ha ce qui est largement équivalent aux rendements obtenus avec les variétés tardives de cette zone et satisfaisant pour les producteurs qui comptent beaucoup sur cette ressource fourragère pour nourrir en priorité les animaux de trait et d'embouche.

Dans le détail, il n'y a pas de différence significative entre les variétés pour le rendement gousses en kg/ha (sur la base des quantités livrées). Par contre il y a une différence importante entre les variétés concernant le rendement en gousses par pied (Tableau 7) qui varie de 13 à 33 g. Le plus fort rendement est obtenu avec la variété Fleur 11 mais comme très souvent pour l'arachide, le rendement par pied est fortement corrélé à la densité (r = -0873) – fig. 4, ce qui fut le cas dans les conditions de cette campagne, la variété Fleur 11 ayant obtenu la plus faible densité. Les rendements les plus faibles ont été obtenus sur le site de Dagga, la différence avec les autres sites peut être attribuée à des sols relativement plus lourds qui ont occasionné des pertes à l'arrachage par des « restes en terre ».

Figure 1 : Densités à la récolte par variété et par site (pieds/ha)

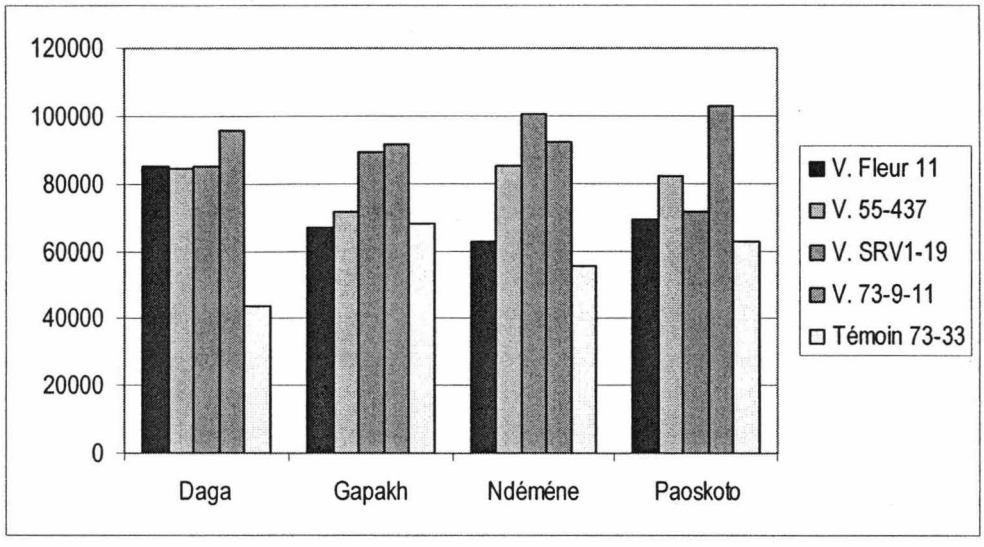


Figure 2 : Rendements moyens en gousses & Fanes. (kg/ha)

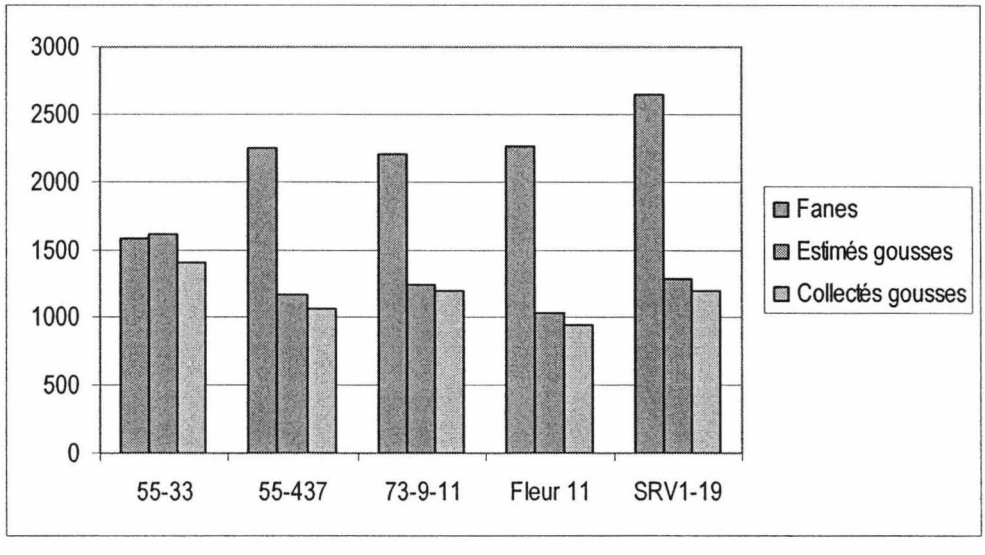
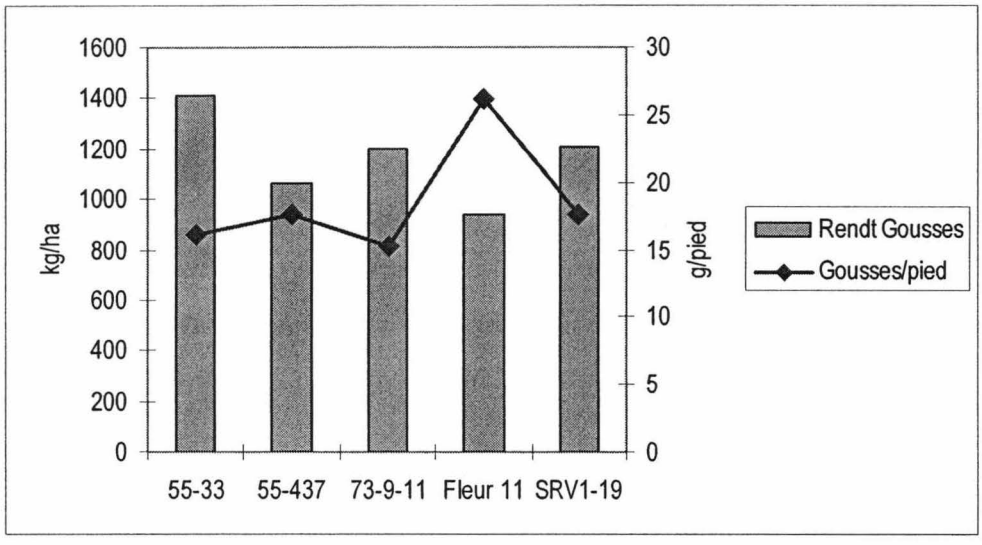


Figure 3 : Rendements moyens en gousses



Ces variétés devront être confirmées au cours des prochaines années en espérant pouvoir les associer à d'autres variétés. Il est important que la recherche nationale (ISRA) poursuive son programme de sélection visant à obtenir des variétés hâtives et dormantes[2] qui permettront de mieux sécuriser la production même en cas de pluies tardives au moment de la récolte.

Tableau 4 : Rendements en gousses par variété et par site.

	55-437		Fleur 11		SRV1-19		73-9-11		55-33		Moyennes	
Sites	Kg/ha	G/pied	Kg/ha	G/pied	Kg/ha	G/pied	Kg/ha	G/pied	Kg/ha	G/pied	Kg/ha	G/pied
Firgui	995	16.3	1068	33.5	1156	15.6	1047	16.9	-	-	1046	17.0
Gapakh	986	13.1	1182	23.4	1021	18.0	1141	14.5	-	-	1069	21.2
Paoskoto	1294	19.4	971	32.0	1371	19.6	1060	13.0	-	-	1179	22.1
Ndémène	1146	17.3	913	25.5	1549	16.7	1687	20.4	1655	19.3	1165	20.3
Dagga	942	17.1	780	22.1	915	17.8	1059	11.2	1164	13.0	918	18.1
Moyennes	1063	17.0	942	26.2	1202	17.5	1199	15.2	1410	16.1		

5 .5 Commercialisation

5.5.1 Problème des aflatoxines

L'objectif de qualité d'une arachide de bouche ou de confiserie ne peut être atteint qu'au travers de la maîtrise et de la sécurisation des différents stades de la production, de la transformation, du stockage et

[2] Chez l'arachide, les variétés hâtives du groupe Spanish contrairement aux variétés tardives (Virginia) sont dites non dormantes car elles regerment dès qu'elles ont atteint leur maturité physiologique et si les conditions sont favorables (sol humide par exemple).

de la distribution. Dans les contrats de vente des produits arachidiers (graines, gousses, pâtes, etc.), les paramètres analytiques courants (teneur en eau, grades, etc.), sont complétés par de nouvelles exigences ayant trait à la sécurité alimentaire et tout particulièrement les limitent concernant un certain nombre de contaminants dont les plus courants sont :

Mycotoxines (aflatoxines)
Résidus de produits phytosanitaires
Contaminants environnementaux (métaux lourds, dioxines, etc.)
Pathogènes humains (Salmonelles, coliformes, etc.)

Les aflatoxines, produites par *Aspergillus flavus* et *parasiticus*, affectent régulièrement les arachides cultivées et transformées dans de mauvaises conditions. Ces toxines sont présentent au nombre de 4 dans les arachides (aflatoxines B1, B2, G1 et G2) et ont des propriétés carcinogènes (foie) et mutagènes. Elles favoriseraient également l'occurrence de la maladie du Kwashiorkor chez les enfants. Ce phénomène est amplifié au niveau des populations rurales dont l'arachide constitue souvent une des bases de l'alimentation.

Ces composés thermostables sont éliminés par traitement à l'ammoniac lors du raffinage de l'huile, mais il n'existe, jusqu'à présent, aucun moyen de les extraire des arachides de bouche et dérivés (pâte d'arachide, etc.). Au contraire, une partie des arachides consommées localement au Sénégal provient des écarts de tri de l'industrie de bouche qui sont vendus aux commerçants locaux alors qu'ils représentent une menace sanitaire pour les consommateurs.

Dans ces conditions, la limitation du risque sanitaire associé à la consommation d'arachide contaminée oar l'aflatoxine passe par l'amélioration des pratiques de culture, de transformation et d'hygiène sur l'ensemble de la filière arachide de bouche et la mise en place du système de gestion de la qualité avec pour objectif d'améliorer la qualité globale du produit et de destiner des lots non conformes ainsi que les écarts de tri vers l'industrie d'huilerie. Les produits contaminés sortiront donc du circuit de commercialisation en arachide de bouche ce qui participera à réduire leur présence sur le marché sénégalais et ainsi diminuer les risques d'exposition des consommateurs locaux aux aflatoxines.

Dans le cadre de cette opération test, de nouvelles variétés ont été introduites dans cette zone, notamment la variété 55-437 reconnue pour sa tolérance à l'aflatoxine, ainsi que des pratiques culturales visant à mettre la plante dans les meilleures conditions, afin qu'elle puisse exprimer toutes ses capacités de défense notamment par la production de phytoalexines qui la protège des attaques de champignons.

5.5.2 Procédures de commercialisation

Les graines contaminées sont essentiellement contenues dans des gousses immatures, percées, cassées, bruchées, etc., il a donc été convenu avec les producteurs, qu'ils éliminent ces gousses et les débris végétaux afin d'améliorer la qualité des lots livrés. Une fiche technique de présentation de ces différents défauts à été remise au producteurs un mois avant la récolte (Annexe 2). Ce tri primaire représente un début de transfert des activités de contrôle de la qualité vers les producteurs dans la perspective de les associer à cette démarche mais également de favoriser le transfert de plus-values par une rémunération indexée à la qualité. En concertation avec les producteurs il a été décidé d'appliquer trois tarifs suivant le niveau de qualité exprimé par le taux de défauts sur gousses et le rendement au décorticage.

Ce système a relativement bien fonctionné avec 65,2% des lots qui ont été classés en B et 18,5% en C. Un quart de la production est restée en A (Fig. 6). Les deux principales raisons de l'absence de tri pour

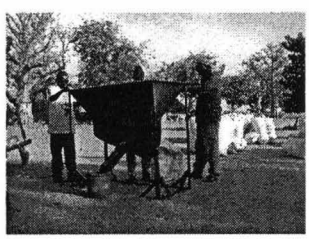
25% des producteurs sont : le manque de temps pour les 2/3 de ces producteurs et le manque de main d'œuvre pour l'autre tiers. Il reste donc à mieux apprécier le coût (humain, financier, etc.) de ce tri pour ajuster au mieux les tarifs et les rendre incitatifs pour les producteurs.

5.5.3. Qualité de la production

Pendant la période de séchage, de vannage et de tri, l'équipe technique a eu à visiter tous les producteurs afin de constater l'avancement de ces activités, conseiller les producteurs et distribuer la sacherie ainsi que des bâches (8m x 10m) pouvant servir aussi bien à faire sécher les gousses qu'à les protéger en cas de besoin.

La commercialisation a débutée le 9 décembre 2004, elle a été effectuée par site pour éviter de trop longs déplacements aux producteurs. Une équipe mobile, équipée d'une bascule 500 kg, d'un échantilloneur, du matériel d'analyse et des fonds de commercialisation, s'est donc déplacée de site en site sur une période de 15 jours suivant un calendrier fixé d'avance en concertation avec les producteurs.

Figure 4 : Echantillonneur.



Dans un premier temps chaque lot a été échantillonné avant d'être pesé. L'échantillonnage consiste à prélever quelques kilogrammes d'arachide dans chaque sac et passer la totalité dans un échantillonneur – Figure 5, afin d'obtenir un échantillon soumis de 1 à 2 kg. Cet échantillon est immédiatement analysé par un tri des gousses suivant les défauts apparents pour un classement en défauts majeurs et mineurs puis est calculé le pourcentage de ces défauts pour déterminer la catégorie du lot. Les gousses remélangées sont décortiquées pour déterminer le rendement au décorticage. Avec la participation des producteurs, cette opération demande environ 15 minutes par lot. Les résultats sont inscrits sur un reçu de commercialisation ainsi que le poids livré, le montant des retenues (intrants avancés) et le prix net payé. Le producteur et l'opérateur signent ce reçu et une copie est remise au producteur.

La qualité technologique de la production achetée aux producteurs est globalement bonne avec un rendement au décorticage tout venant (TV) moyen de 71,2%. En comparaison le rendement au décorticage obtenu à partir des productions des champs témoins traditionnels a été de 67%. L'application de phosphogypse a certainement contribué à ce meilleur résultat.

Le rendement moyen en graines sélectionnées HPS est également très bon pour une production en conditions pluviales puisqu'il atteint une moyenne de 56,4% contre 44,0% pour la variété 73-33 produite en conditions traditionnelles notamment sans engrais ni amendement calcique. Le poids de 100 graines est bon avec 53,5 g pour la variété Fleur 11 qui produit les plus grosses graines et aux alentours de 35 g pour les autres variétés.

L'analyse des lots en fonction de leur catégorie de classement révèle également des différences importantes – Tableau 8. L'élimination notamment des défauts majeurs qui passent de 11,6% en catégorie A à seulement 3,5% en catégorie C, contribue à l'augmentation du rendement en graines HPS qui passe de 55,3% à 60,3% (Figure 8). Dans le détail l'élimination des gousses percées (Figure 7), a une forte incidence sur le rendement en graines HPS (R=-0,3681). L'élimination de ces gousses non conformes permet d'augmenter la densité des lots. Cette densité des lots a une bonne corrélation avec le pourcentage de graines HPS avec R=0,3028 (Figure 9) et peut être un bon indicateur d'analyse au moment de la commercialisation.

Tableau 5. : Analyse technologique par catégorie.

Catégories	% défauts majeurs	% défauts mineurs	Densité moyenne g/l	Rendt décorticage TV	Rendt décorticage HPS
A	11,6	31,7	315	69,7	55,3
B	6,6	29,7	324	71,6	57,4
C	3,5	13,3	328	73,5	60,3

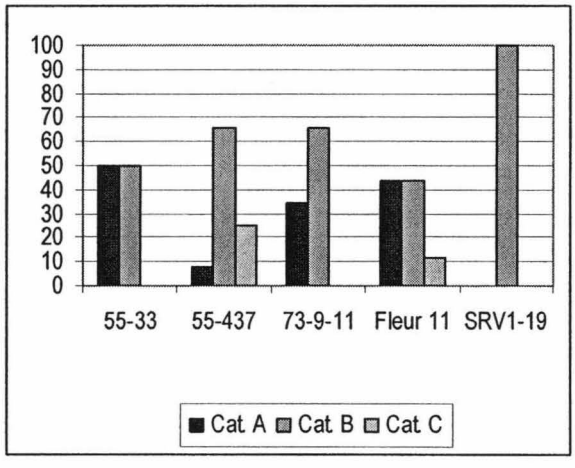


Figure 5 : Répartition des lots par variété et par catégorie.

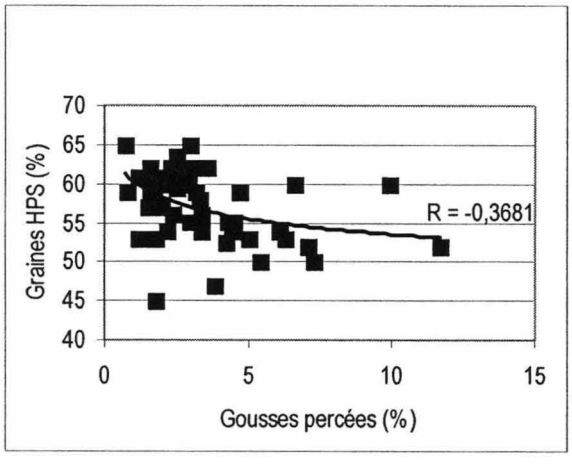
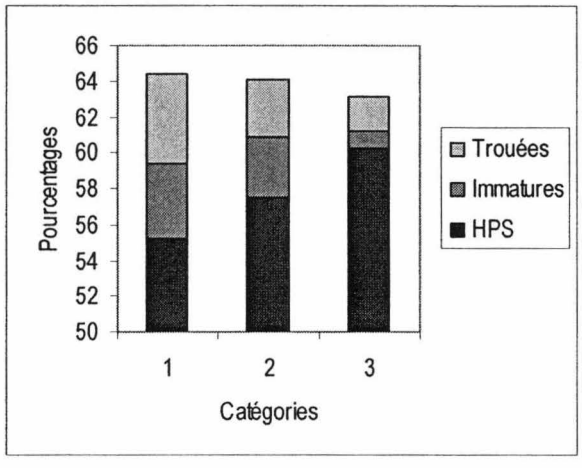


Figure 6 : Corrélation gousses percées/HPS



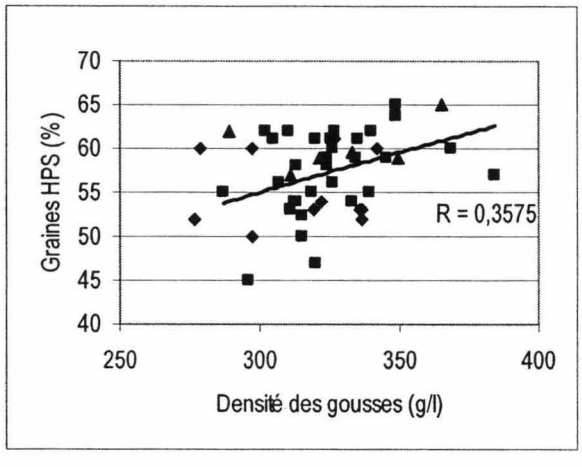


Figure 7 : Taux de graines HPS et défauts par catégorie

Figure 8 : Corrélation densité des gousses-Rdt HPS.

► Défauts majeurs

Suivant le cahier des charges des utilisateurs, ces défauts sur gousses sont les plus révélateurs d'une colonisation par les *Aspergillus sp.* donc susceptibles de présenter le plus fort taux de contamination

par les aflatoxines. Les gousses moisies, percées ou attaquées, bruchées et scarifiées constituent ces défauts majeurs. La moyenne générale des défauts majeurs pour l'ensemble des lots livrés a été de 7.3% contre 12,3% pour la variété témoin 73-33

► Défauts mineurs

Ces défauts concernent les gousses à « bout noir », cassées et tachées. En moyenne générale le taux de défauts mineurs a été de 29 % contre 33,8 % pour la variété témoin.
Toutes ces variétés présentent sensiblement les mêmes taux de défauts mjeurs et mineurs - Figure 10.

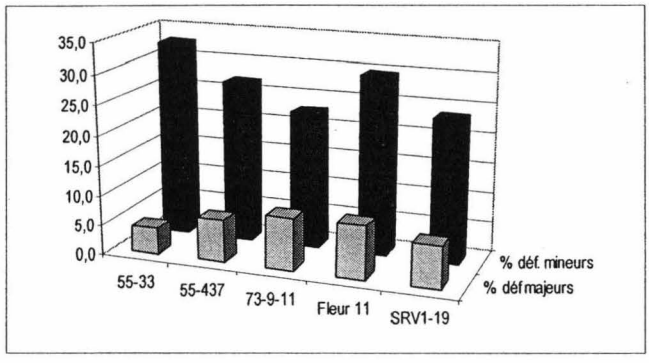


Figure 9 : Défauts majeurs et mineurs par variété (%).

L'analyse détaillée de ces défauts montre une différence significative entre eux (Figures 11, 12). Pour les défauts majeurs on note une majorité de gousses percées et scarifiées ce qui permet de conclure à la présence importante de termites dans les champs. Pour les défauts mineurs c'est la catégorie gousses tachées qui est la plus importante. Ces taches sont la cause d'une pluie après la récolte, au tout début du séchage au champ.

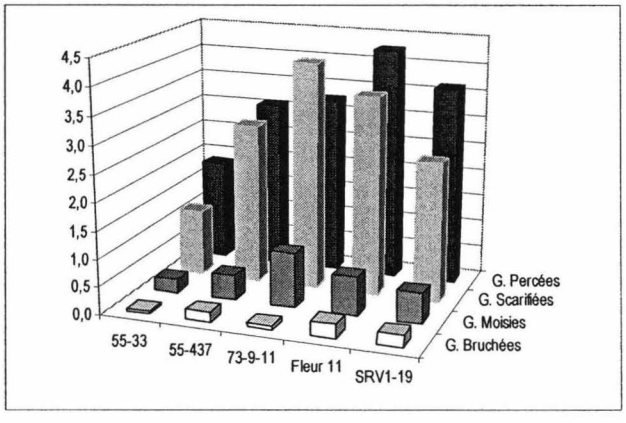


Figure 10 : Défauts majeurs par variétés (%).

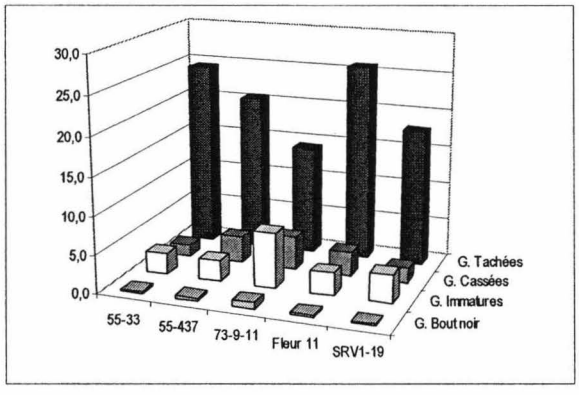


Figure 11 : Défauts mineurs par variété (%).

5.6 Suivi socio-économique

L'adhésion des producteurs et leurs réactions est un point important de cette opération. Trois étudiants de l'ENSA de Thiès ont été accueillis par l'opération et encadrés pour leur stage de fin d'études. Sont résumés ci-après les résultats d'enquêtes et suivis les plus significatifs.

Sur le plan démonstratif, cette opération a eu un impact significatif sur la population agricole de la zone puisque 86% des producteurs annoncent avoir reçu la visite de voisins ou de proches pour s'informer et visualiser leurs champs.

Au vu des résultats, on peut penser que les thèmes techniques proposés par la recherche devraient être adoptés par les producteurs et être considérés comme une suite d'innovations simples pour la production d'arachides de qualité.

Cette opération a également permis d'identifier certaines contraintes ou points faibles qui doivent faire l'objet d'un travail complémentaire avec les producteurs et/ou un appui de l'Etat. Ce sont notamment des contraintes de main d'œuvre et d'équipements, qui pour certains constituent un frein à l'adoption des itinéraires techniques et expliquent le non-respect de certaines recommandations ou retard dans l'exécution.

Cette étude a été effectuée dans un environnement socio-économique, caractérisé par une main d'œuvre limitée (8,6 UTH) pour une exploitation moyenne de 15ha, avec un faible niveau d'équipement souvent vétuste, et un système d'exploitation des sols relativement intense, excluant presque totalement la jachère. Cette situation est d'autant plus critique qu'actuellement l'utilisation d'engrais est très faible et ne compense que partiellement les exportations de la plante.

L'analyse de la qualité amène à constater que 73% des producteurs ont effectué un tri de leur production avec cependant un niveau de qualité des lots livrés qui reste à améliorer. Les premières causes évoquées sont le manque de temps et de main d'œuvre et pour certain un prix encore insuffisamment motivant.

L'entretien de la culture (sarclages, binages) représente une activité très mobilisatrice de main d'œuvre qui peut être une contrainte pour certains producteurs. Là aussi, un meilleur équipement, une augmentation de la traction animale pourraient être bénéfique à ces exploitations.

L'évaluation du matériel prouve son état de vétusté et l'impact que cela peut avoir sur le comportement de la culture notamment avec des semoirs qui ne permettent pas toujours d'atteindre les densités recommandées. Il serait souhaitable qu'un programme d'appui aux agriculteurs leur permet d'accéder plus facilement à ce type d'équipement. Le crédit d'équipement constitue avec les crédits de campagne deux composants indissociables du financement de la production.

Il faut que les producteurs puissent accéder et recevoir les intrants à temps. Ainsi, il est important de mieux organiser la filière d'approvisionnement. Au même titre que les équipements, les producteurs devraient pouvoir bénéficier de facilités financières pour se procurer des semences, des engrais et des produits phytosanitaires. Leur faible pouvoir financier les oblige très souvent à n'acheter que des arachides ordinaires comme semences avec comme conséquences un développement moyen de la culture et des faibles rendements.

Enfin, le transfert de l'innovation doit être accompagné d'une formation et information continue des producteurs. Il est important de poursuivre cette formation et de l'élargir à d'autres thèmes comme les

pratiques de commercialisation, le crédit, les normes de qualité des produits, la production semencière, etc. Plusieurs fiches techniques concernant les bonnes pratiques agricoles, l'identification des défauts sur gousses pour faciliter le tri, les procédures de commercialisation ont été distribuées au cours d'ateliers de formation organisés pendant cette opération.

5.6.1 Contexte économique

Dans les conditions de cette campagne, toutes les exploitations présentent des résultats économiques intéressants. En moyenne, la culture d'une arachide de qualité rapporte une marge nette moyenne de 269 751Fcfa par hectare sans valorisation de la main d'œuvre familiale et 206 618 FCfa avec valorisation de la main d'œuvre familiale, ce qui est relativement satisfaisant comparé à l'arachide d'huilerie.

Parmi les charges de productions, les intrants et l'entretien des animaux représentent les postes les plus coûteux si l'on ne tient pas compte de la main d'œuvre familiale. Si cette main d'œuvre est prise en compte, elle représente le premier poste –Tableau 9.

Tableau 6: Répartition des coûts de production (%).

	Moyenne sans MOF	Moyenne avec MOF
Amortissement	3%	1%
Entretien des animaux	16%	7%
Main d'œuvre temporaire (MOT)	3%	2%
Intrants	75%	33%
Autres	2%	1%
Main d'œuvre familiale (MOF)	0%	55%

Source : Enquêtes étudiants

Une analyse des facteurs de production a été faite au niveau des exploitations pour essayer de dégager des différences entre les exploitations, cet exercice n'a pas fourni les résultats escomptés. Le compte d'exploitation moyen – Tableau 10, présente les charges fixes[3] indépendantes des rendements, les charges variables[4] influencées par le niveau des activités menées.

[3] L'amortissement du matériel est théoriquement calculé sur une période de 10 ans. Dans cette étude le matériel est largement amorti ont donc été pris en considération les coûts de réparation. Pour la traction animale ce coût correspond qu'à l'entretien sachant que bien souvent les animaux sont revendus plus chers qu'ils n'ont été achetés.

[4] . La main d'œuvre extérieure est assez rare, les coûts correspondent aux frais de nourriture. Le coût de la main d'œuvre familiale est rarement pris en compte, dans le cas présent elle a été calculée sur la base du prix de la journée de travail estimé à 500 Fcfa dans la zone.

Tableau 7 : Compte d'exploitation moyen avec valorisation de la m.o. familiale

	Unité	Moyenne
I. Charges fixes		
Amortissement du matériel	FCFA/ha	1672
Entretien des animaux		8 400
Total Charges fixes	FCFA/ha	10 072
II. Charges variables		
MOF	FCFA/ha	63007
MOT		1714
Intrants		37604
Autres		1179
Total charges variables		103504
III. Total charges		113576
Prix unitaire gousses	FCFA/kg	162
Prix unitaire fanes	FCFA/kg	83,33
Rdt gousses	T/ha	1087,9
Rdt fanes	T/ha	1713,3
Revenu gousses	FCFA/ha	175 744
Revenu fanes	FCFA/ha	142 778
IV. Produit monétaire	FCFA/ha	318 522
V. Marge Brute	FCFA/ha	215 018
VI. Marge Nette	FCFA/ha	204 946
VII. Cash flow	FCFA/ha	206 618

Source : Enquêtes étudiants

Le coût des intrants est minimisé puisque l'opération n'a facturé les semences qu'à 100 Fcfa/kg alors que le prix du marché peut aller jusqu'à 450 FCfa et plus. Il conviendra de confirmer ces résultats au cours de la campagne prochaine.

5.7 Conditionnement et évaluation de la valeur commerciale

L'objectif de cette campagne était d'évaluer la capacité des producteurs à appliquer un itinéraire technique amélioré afin d'assurer une production de qualité pour la filière semencière d'une part et la filière arachides de bouche ou de confiserie d'autre part. Toute la production de cette opération (54 tonnes) rachetée aux producteurs, a été transférée dans un magasin de l'ISRA Nioro. Ce magasin a été entièrement réhabilité par l'opération (fermetures, électricité, peintures). Les équipements de conditionnement (décortiqueuse, gradeuse, ensacheuse) ont également été transférés de St Louis.

Il est prévu que la majeure partie de la production (environ 38 tonnes) soit conservée comme semences pour l'opération pilote de 2005 et que le reste (15 tonnes) soit tester sur le marché. A cet effet la société Chocosen[5] a été contactée pour tester la qualité du produit livrée par l'opération. Cette société transforme des graines d'arachide en farine ou en pâte pour la consommation humaine, elle traite environ 1800 tonnes par année. La présence régionale de sa maison mère lui ouvre un marché

[5] Chocosen : Cette société Sénégalaise appartient au groupe Barry Callebaut très présent en Afrique (Cameroun, Côte d'Ivoire, Gabon, Ghana). Chocosen a été créée en 1981, est spécialisée dans la fabrication de chocolat pâté.

important qui compte plus de 200 millions de consommateurs. La société Chocosen qui a été certifiée ISO 9001 Version 2000 en septembre 2003, s'engage clairement vers la qualité en achetant notamment des matières premières de qualité afin de pouvoir répondre aux exigences des marchés notamment régionaux et internationaux, ce qui n'est pas toujours possible actuellement pour la pâte d'arachide, compte tenu du niveau de contamination en aflatoxine de la matière première commercialisée au Sénégal. L'expérimentation avec cette société pourrait porter sur la transformation de graines en farine dans le cadre d'un programme conjoint avec le PAM (alimentation infantile) et la transformation en pâte comme ingrédient du produit phare destiné à la consommation nationale et à l'export.

Il était prévu de commercialiser à l'export une petite partie en gousses. Après étude de ce marché il est apparu que les quantités prévues n'étaient pas assez importantes pour une évaluation sur le marché équitable européen qui était visé. Cette opération pourra être reprise ultérieurement. Un autre point négatif par rapport à cet objectif à été la présentation générale de gousses qui, ayant subi une petite pluie au moment du séchage, présentaient un aspect taché non conforme au cahier des charges des importateurs. Le coût du tri manuel était trop prohibitif pour entreprendre ce travail sur de grandes quantités. Ce constat est révélateur de la démarche à adopter pour une exportation en gousses de qualité à savoir, qu'il faut absolument exiger un égoussage en vert des gousses exportables (les autres pouvant être laissées sur le pied pour un séchage traditionnel) suivi immédiatement d'un séchage sécurisé en couches minces pour conserver l'apparence physique des gousses et une qualité sanitaire maximale.
l'expérimentation de variétés hâtives dans cette zone, avec les précautions nécessaires, a permis d'obtenir d'excellents rendements tant quantitatifs que qualitatifs et la valorisation en graines HPS devrait être significative avec des rendements moyens supérieurs à 40% comparé aux 20% et quelque fois moins qu'obtiennent actuellement les industriels. C'est sans doute pour l'instant la filière petite graines de Spanish (variétés hâtives) la mieux adaptée aux pratiques en cours.

5.8 Les activités de décorticage tri et conditionnement

5.8.1 Phase de pré-usinage

Au moment de la commercialisation auprès des producteurs, tous les lots ont été analysés et classés par catégorie (ségrégation) avec codage de chaque sac (traçabilité). Les lots commercialisés ont été placés sous bâches de protection avant d'être évacués vers le site de transformation/stockage (Figure 13). Cette précaution est indispensable pour assurer le maintien de la qualité des lots qui sont exposés à diverses sources de dégradation physique et sanitaire. De plus pour limiter ce risque, les lots ont été très rapidement transférés (moins d'une semaine après commercialisation).

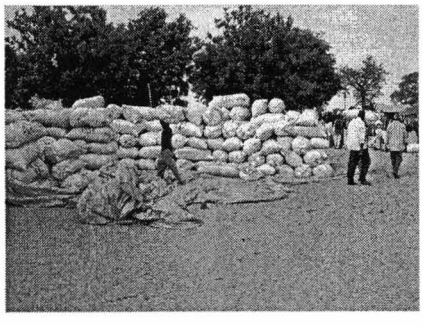
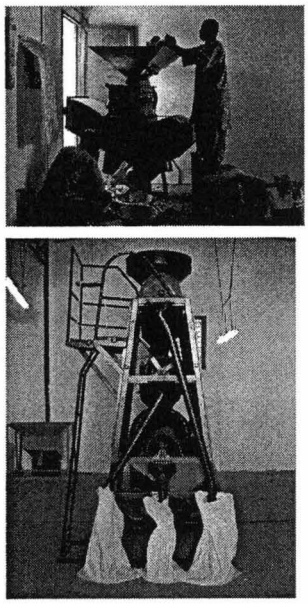


Figure 12 : Point de collecte et de commercialisation.

5.8.2 Usinage

Cette phase d'usinage consiste à décortiquer, trier, calibrer et conditionner les arachides de bouche. La mise au point d'une petite décortiqueuse et d'une gradeuse/calibreuse permettent de traiter la production dans de bonnes conditions (Figure 14). Les lots sont traités individuellement et chaque sac conserve son étiquetage avec son code de traçabilité. Après décorticage, le produit décortiqué subit un premier tri manuel (tamis) pour éliminer les petites gousses non décortiquées. Les graines sont ensuite passées à la gradeuse. Pour les variétés utilisées cette année, la gradeuse était équipée de 3 jeux de grilles 8,5 – 7,5 et 6,5mm permettant de séparer le lot de graines en 3 catégories suivant leur taille. La

qualité des gousses a permis d'obtenir un rendement moyen de 40% en graines HPS (grade supérieur) – Tableau 12, bien supérieur à la moyenne de 10-20% enregistrée par les industriels à partir de gousses tout venant.



Cette première opération laisse penser qu'il faille encore améliorer la qualité des gousses et notamment prévoir une opération prè-décorticage qui permettrait soit de calibrer les gousses pour ajuster ensuite la décortiqueuse au calibre des gousses sans augmenter le taux de casse très important lorsque l'on traite de la semence, soit d'éliminer les plus petites gousses pour réduire au maximum le pourcentage de gousses non décortiquées. Dans les deux hypothèses l'objectif étant d'augmenter le taux de rendement au décorticage machine qui est de 63,5% dans le cas étudié contre 71% à la main et réduire au maximum le coût du tri avant gradage.

L'opération de gradage est complétée par un tri manuel sur le grade supérieur qui permet d'améliorer la qualité des graines HPS. Les premiers résultats d'analyse[6] de contamination en aflatoxine confirment cette opération – Tableau 11.

Figure 13 : Décortiqueuse et gradeuse

Tableau 8 : Analyse partielle des lots de graines

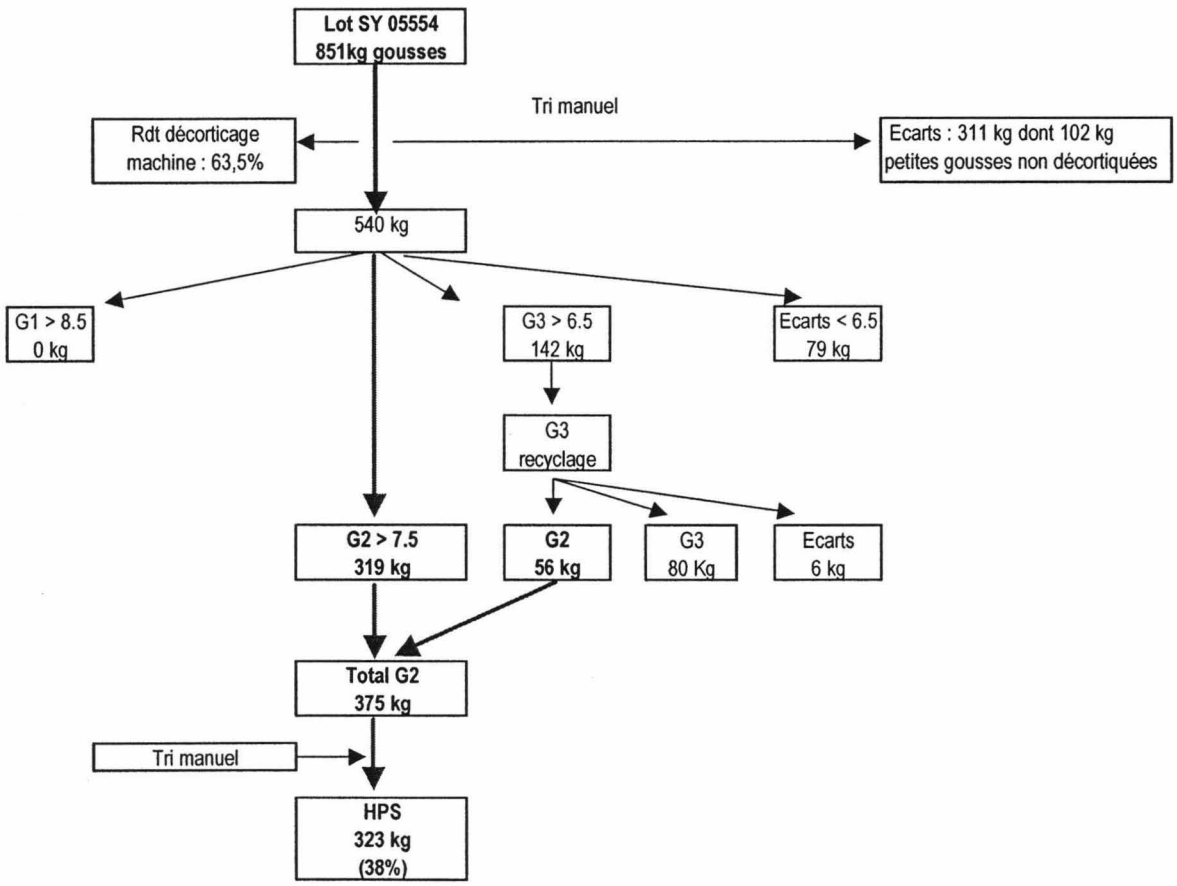
Lots	Graines	% huile	% Tourteaux	Aflatoxine B1 dans les tourteaux	Aflatoxine B1 dans les graines
BI 05 554	Sorite gradeuse	50,51	49,49	< 02	< 02
	Sortie tri HPS	49,66	50,34	< 02	< 02
SY 05 554	Sorite gradeuse	49,01	50,99	22	11
	Sortie tri HPS	49,52	50,48	< 02	< 02
GA 05 554	Sorite gradeuse	49,54	50,46	99	50
	Sortie tri HPS	48,40	51,6	< 02	< 02
BR 01 554	Sorite gradeuse	49,91	50,0	< 02	< 02
	Sortie tri HPS	49,41	50,59	< 02	< 02

.L'analyse réalisée sur 4 lots de la variété 55-437 est très révélatrice de la qualité de la production puisque seuls deux lots non triés présentent une légère contamination par l'aflatoxine B1 et aucun lot après tri manuel ne présente un taux de contamination supérieur à 02 µg/kg (ppb).

Ce bon résultat est réconfortant et démontre que l'on peut produire des arachides de bonne qualité en respectant certaines pratiques.

[6] Les analyses ont été effectuées par le laboratoire de la SONACOS Kaolack fin février 2005.

Tableau 9 : Exemple de décorticage/triage sur un lot.



Après usinage, le stock d'arachide sera traité et stocké pour une conservation de la qualité semencière des lots jusqu'en juin 2005. Afin de préserver la qualité physique des lots, ils seront bâchés à l'intérieur du magasin et fumigués au PH_3 suivant les doses présentées dans le tableau 13.

Tableau 10 : Doses recommandées pour la fumigation au PH3 des coques et graines d'arachide.

	Nombre de pastilles de 3g		Matière active	Matière active efficace
Produit à traiter	/m^3	/tonne	(PH_3 en g/m^3)	(PH_3 en g/m^3)
Grosses arachide en coque (type GH 119-20)	2	8	2	0.95
Petites arachide en coque (type 55-437)	3	8	3	1.5
Graines d'arachide	2	4	2	0.65

La durée de fumigation conseillée est de 5 jours pour les températures inférieures ou égales à 25°C et de 4 jours pour les températures supérieures à 25°C. Il convient d'assurer un niveau minimum d'humidité en plaçant par exemple des coupelles d'au à côté des pastilles, pour favoriser la vaporisation de PH_3.

5.9 Coûts du décorticage et tri graines HPS

Un premier calcul économique a été entrepris sur un lot de 5330 kg de gousses – Tableau 14.

Tableau 11 : Analyse économique des coûts de production d'ARB (Unité pilote de Nioro 2004/05).

	Quantité	Prix unitaire	Total
Achat gousses	5330	162,5	866125
Transport magasin	5330	15	79950
Décorticage/calibrage	5330	55	293150
Amortissement équipements	5330	8	42640
Salaire responsable unité	5330	18	95940
Gardiennage	5330	2	10660
Sacherie HPS	2130	10	21300
Electricité	5330	4,5	23985
Vente écarts	1330	200	-266000
Coût total			1167750
F Cfa/Kg HPS			548
Marge transformateur 15%			82
Prix départ unité transformation			630

Le rendement au décorticage mécanique est de 65%. Ce bon rendement a pu être obtenu en assurant un flux d'approvisionnement minimum de la machine mais avec une augmentation du temps de travail. Pour éviter le maximum de casse (split, brisures), l'écartement entre la grille de fond de la décortiqueuse et les batteurs a été ajusté sur une taille moyenne des gousses mais avec comme conséquence une augmentation du pourcentage de gousses non décortiquées (différence entre décorticage manuel et mécanique) et donc obligé à un tri de ces gousses non décortiquées avant passage des graines dans la gradeuse. L'amortissement des équipements a été calculé sur une période de 5 ans. Le coût de la main d'œuvre est un peu sous-évalué pour une main d'œuvre temporaire par rapport à des saisonniers ou des permanents. Il n'y a pas de coût d'infrastructures (bâtiments) dans ce premier calcul.

Dans la configuration de cette campagne, le coût du décorticage paraît élevé. Il faudra réduire le coût de certains postes en essayant par exemple d'augmenter la rentabilité des machines, mécaniser certaines activités, former le personnel et bien sûre améliorer encore la qualité de la matière première.

6. Conclusions et perspectives

Cette opération pilote a démontré qu'en respectant un itinéraire technique adapté, il était possible de produire une arachide de qualité dans cette zone du Sénégal et que s'il était encore nécessaire de le prouver, une grande majorité des producteurs a cette capacité. Cependant, le contexte socio-économique dans lequel ils évoluent n'est pas très favorable avec notamment, peu de moyens pour l'acquisition de l'innovation technique, pour la conduite de la culture et pour le traitement correct de la production. Dans les conditions de cette campagne agricole, l'augmentation des rendements a été très significative et avec un prix indexé à la qualité, les producteurs de l'opération ont eu des revenus en nette augmentation. Au niveau de la transformation, la qualité initiale de la matière première a également permis d'augmenter significativement le rendement moyen en arachide HPS et permet d'entrevoir d'une façon concrète la spécificité d'une filière arachide de bouche et non plus d'un

produit obtenu par « écrémage » d'une partie de plus en plus réduite et de moins en moins rentable, d'arachides issues de la filière huilerie.

Bien que la réduction des coûts de production puisse être envisagée sans un optimisme démesuré, par rapport aux premiers résultats de cette opération, la qualité a un coût et ne peu donc être rentable que si elle est reconnue sur les marchés. Au Sénégal, la concurrence d'un marché traditionnel sans régulation sanitaire risque d'être pénalisante pour une arachide de bouche de qualité si les consommateurs n'accordent pas d'importance à ce facteur ou si les pouvoirs publics n'envisagent pas d'appliquer et de faire respecter une réglementation sanitaire conforme à lune bonne protection de la santé publique. La question est de savoir si les industriels, les grossistes et les détaillants sont intéressés à commercialiser une arachide de bouche de qualité maîtrisée et, à combien sont-ils prêts à payer la matière première pour sécuriser leurs approvisionnements. Par contre, cette approche intégrée répond bien pour une exportation d'arachides de bouche avec un marché international en évolution constante depuis plusieurs années. Indépendamment du marché de l'arachide en graines HPS sur lequel le Sénégal peut se positionner avec des atouts importants (traditions de production de l'arachide, proximité de l'Europe, marché petite graine plus ouvert, etc,), il est possible que certaines sociétés nationales envisagent la transformation de ces graines (arachides blanchies, salées, grillées, pâtes, beurre etc,) pour ajouter de la plus value et toucher des marchés assez rémunérateurs aussi bien régional qu'international. Ces marchés sont cependant soumis à des normes élevées de qualité qu'il convient de respecter si l'on souhaite s'y maintenir de façon durable. La qualité de la matière première est au cœur de la filière et dans tous les cas le producteur devra être considéré comme un partenaire à part entière et être associé techniquement et financièrement dans cette démarche intégrée de l'élaboration de la qualité et de sa valorisation.

La qualité de l'arachide a des implications au-delà de la simple consommation de la graine puisque l'on peut retrouver l'aflatoxine dans les tourteaux et dans le lait des vaches laitières ayant consommé des tourteaux contaminés.

L'opération a permis l'accueil de trois élèves ingénieurs de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) de Thiès dans le cadre de leur stage de fin d'études. Ces trois étudiants ont pu soutenir leurs travaux de stage avec succès pour l'obtention de leur diplôme. La formation technique est indispensable et ne peut que renforcer les compétences et la vision de ces futurs responsables de l'agriculture.

L'opération au eu à organiser plusieurs visites dont une journée porte ouverte avant la récolte qui a permis à de nombreux visiteurs d'apprécier la qualité des champs et recueillir les appréciations des producteurs.

Le partenariat a permis de fédérer des acteurs travaillant dans cette zone et de valoriser des moyens humains et financiers au profit d'un objectif commun. Ce partenariat a également facilité la circulation de l'information.

Cette opération apport un début de réponse à la faisabilité du développement d'une filière de production d'arachide de qualité au Sénégal. Cependant, ce développement sous-entend un encadrement et une formation des producteurs et un partenariat fort avec le secteur de la transformation. Il paraît également nécessaire que la filière puisse bénéficier de conditions favorables afin de réduire les distorsions du marché international.

Il est important de poursuivre cette opération à une échelle plus importante (les semences sont disponibles pour emblaver 200-300 ha en 2005) en développant un partenariat fort et motivé avec le secteur privé dans le but d'identifier clairement les marchés et leurs exigences tout en intégrant parfaitement les contraintes de la production, en assurant un encadrement technique (intrants

appropriés, pratiques culturales, techniques post-récolte), financier (accès aux intrants, remplacements des équipements, soutien du prix de l'arachide ARB) et structurel (appui aux organisations de producteurs, cadre de concertation et de décisions, formation, etc) aux producteurs.

Cette opération appuyée par les organismes de recherche et de développement, doit contribuer et participer à la mise en place des bases d'une filière professionnelle et assurer le transfert progressif vers les organisations de producteurs tout en développant des relations techniques et commerciales avec les autres acteurs de la filière.

Dans les perspectives, les principales activités à développer concernent :
► Les nouvelles normes à l'export sur le marché mondial en matière de contamination par les aflatoxines posent un défi considérable pour les pays exportateurs d'arachides de bouche. Il est donc important de continuer la promotion de cette filière associant, les autorités, la recherche, les producteurs, les industriels et autres acteurs. Il advient donc de continuer les activités menées dans ce sens et d'entreprendre assez rapidement la mise en place d'un plan de contrôle et de certification et de renforcer l'outil laboratoire. Un système d'assurance qualité sur toute la filière (depuis les semences jusqu'au contrôle à l'exportation), doit être développé afin de sécuriser et de maîtriser toutes les étapes de production et de transformation des arachides de bouche et d'atteindre les objectifs « qualité » fixés par les cahiers des charges et réglementations des transformateurs et des pays importateurs

► Le post-récolte (maintien de la qualité à la récolte, techniques d'égoussage, séchage, battage) et transformation (équipements de décorticage et de trié) reste une étape importante sur laquelle l'opération doit travailler en s'associant à des entreprises capables de développer une technologie appropriée.

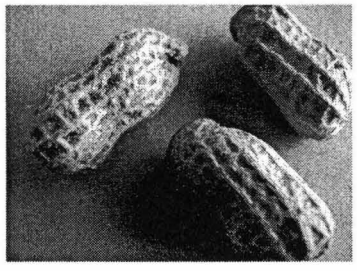
► Au Sénégal, pour les produits issus de la transformation artisanale, la fixation du prix s'effectue par confrontation de l'offre et de la demande sur le marché local. Il ressort de différentes études de ces marchés, que les prix locaux sont déconnectés du prix mondial. Dans la formule de fixation du prix officiel de l'arachide en gousses par l'interprofession, on prend en compte les coûts de collecte de transport, de transformation qui sont très peu contrôlés. Il n'y a donc aucune incitation au progrès de productivité et de qualité de la filière. Du fait de la mauvaise qualité de la matière première, certains industriels de la transformation n'ont pas actuellement la possibilité d'exporter. La reconnaissance de la qualité par un prix supérieur au tout venant, permettrait d'une part d'inciter les producteurs à appliquer des pratiques mieux appropriées (emploi de bonnes variétés, application de bonnes pratiques de production, de récolte et de séchage) et contribuerait à une augmentation des rendements ainsi qu'une meilleure répartition des plus-values et serait profitable à toute la filière. L'opération pilote conduite au Sénégal a mis en place une **rémunération à la qualité** prenant en compte le taux de gousses non conformes (moisies, percées, immatures, cassées, etc) dont dépend essentiellement la contamination par les aflatoxines. Néanmoins, le mécanisme de prix fixé doit être soutenu par une **protection aux frontières** suffisante pour assurer une préférence nationale ou communautaire, lorsqu'il s'agit d'une union douanière, et permettre une différence entre le cours mondial et les prix à l'intérieur du marché.

► L'information, la mise en place d'un observatoire de la filière, la promotion, sont des outils indispensables à l'interprofession qu'il faut développer.

ANNEXES

Annexe 1 : Formation aux Bonnes pratiques Agricoles

ARACHIDE DE BOUCHE



* * *

FORMATION DES ENCADREURS AGRICOLES AUX BONNES PRATIQUES DE PRODUCTION D'ARACHIDES DE QUALITE

CIRAD

A. MAYEUX - CIRAD-CA - Equipe Arachide

L'arachide, avec 31 millions de tonnes produites en 2000, représente environ 12% de la production mondiale de graines oléagineuses alimentaires et moins de 5% des échanges internationaux de produits oléagineux, dont une part croissante sous forme d'arachide de bouche (ARB). L'essentiel de la production (90%) est assuré en milieu paysannal dans les pays du sud, largement auto-consommateurs, qui aspirent à se faire une place sur le marché particulièrement rémunérateur de l'ARB, dominé par les USA. L'Union européenne est le principal client. Les cours sont très régulièrement supérieurs, de 30% au moins, à ceux du soja et du tournesol qui dominent le marché ; en juillet 2001, les prix moyens de l'huile et du tourteau étaient respectivement de 325 et 210 USD pour le soja et de 775 et 180 USD pour l'arachide. Le prix des graines triées-calibrées d'une catégorie équivalente à celle que produit le Sénégal atteint 800 USD la tonne.

La part de l'Afrique représente un cinquième de la production mondiale sur un tiers des superficies (respectivement 12% et 17% pour l'Afrique de l'ouest), ce qui traduit une productivité faible imputable en partie à la qualité des semences utilisées.

Avertissement

Ce manuel s'adresse aux encadreurs et techniciens d'une opération de production d'arachides de qualité conduite par l'Agence Nationale de Conseil Agricole et Rural (ANCAR) et ses partenaires ; action préliminaire au projet pilote d'amélioration de la filière de production et de valorisation de l'arachide de bouche au Sénégal.

Cette opération est conduite en conditions pluviales dans la région de Nioro (sud du bassin arachidier) et vise à évaluer la faisabilité d'une production d'arachide de qualité par les communautés rurales, pour des semences certifiées et pour les marchés de l'arachide de bouche et de confiserie.

Objectif de la formation

La culture de l'arachide demeure une priorité dans l'agriculture sénégalaise par rapport au grand nombre d'acteurs concernés et de l'impact que cette culture peut avoir sur la réduction de la pauvreté. Par des choix stratégiques, l'Etat du Sénégal vise à réformer la filière arachide afin de la rendre plus performante par rapport à la diversité des marchés tout en gérant durablement les ressources naturelles et l'environnement.

Beaucoup d'agriculteurs ont un accès très limité aux nouvelles variétés développées par les organismes de recherche publics ou privés. Certaines dispositions doivent être prises pour faciliter cet accès notamment par l'émergence de petites entreprises semencières (PES) privées et le développement d'un marché compétitif. Dans cette perspective, l'Agence Nationale de Conseil Agricole et Rural (ANCAR) et ses partenaires souhaitent développer une filière arachide compétitive s'appuyant sur un modèle semencier de proximité, géré par les organisations de producteurs (OP). Ce modèle sera développé au travers d'un projet pilote par lequel les partenaires de la recherche et du développement souhaitent tester des principes de base de « bonnes pratiques semencières » visant à la promouvoir l'utilisation de semences améliorées par les agriculteurs et au-delà le développement du métier de semencier. L'encadrement des agriculteurs volontaires de ce projet pilote devra être de qualité afin d'assurer le meilleur transfert des connaissances, c'est l'objectif principal de cette formation.

LA CONTRAINTE SEMENCIERE

Quelques données agronomiques de base : La graine d'arachide est volumineuse et fragile, donc difficile à conserver surtout en milieu paysannal. Les quantités de semences sont importantes et le taux de multiplication est faible (inférieur à 10 dans la sous-région Afrique de l'ouest et du centre) : il en faut entre 100 et 150 kg (en coques) pour ensemencer un hectare, contre en moyenne 4 kg pour le mil et 20 kg pour le maïs. Même si l'autogamie de l'arachide permet en principe à l'agriculteur de produire sa propre semence, puisque la graine se reproduit identique à elle-même, il est recommandé de renouveler la semence tous les trois ans afin d'éviter la dégradation de la qualité germinative des graines ainsi que les mélanges de variétés. La recherche agronomique au Sénégal estime à 35% la plus-value de rendement obtenue avec des semences sélectionnées. L'approvisionnement en semences de qualité appropriée en quantités requises constitue donc un préalable nécessaire à toute action d'amélioration de la culture en milieu paysannal africain, où les conditions de production sont aléatoires et le rendement particulièrement faible (800 kg à l'hectare en moyenne africaine contre 1900 kg en Chine et 3000 aux USA).

La semence sélectionnée produite en très faibles quantités par les services de recherche et de vulgarisation ne fait pas l'objet d'un suivi adéquat. Le faible revenu de la culture, ainsi que les habitudes prises dans un contexte précédent d'étatisation de la filière, n'incitent pas les opérateurs compétents à investir dans ce secteur.

Dans la plupart des pays, la diffusion de nouvelles variétés et la sécurisation du capital semencier ne sont pas assurés faute d'une stratégie cohérente et d'un dispositif approprié associant les divers intervenants de la filière semencière, dont au premier chef les agriculteurs eux-mêmes.

Les opérations semencières qui ont obtenu de bons résultats en Afrique sont ou étaient basées sur un système généalogique à plusieurs stades ou niveaux (générations) imposé par le faible coefficient de multiplication de l'arachide et par les faibles quantités de semences de base disponibles au départ. Les agriculteurs sont les principaux acteurs de la multiplication, puisqu'ils en assurent l'essentiel (90%) représenté par la dernière génération, pour leur propre compte ou en relation contractuelle avec des opérateurs spécialisés, commerciaux ou organisations paysannes.

LA SEMENCE D'ARACHIDE

Dans le langage courant, il est fréquent d'employer des termes tels que « élite », « sélectionnée », « contrôlée ». Il est souhaitable d'utiliser la terminologie internationale (indispensable dans le cas d'exportation) définie par l'ISTA (International Seed Testing Association) qui utilise le terme de *semence certifiée*

Lorsque l'on parle de semence certifiée cela suppose que le lot de graines est d'une pureté satisfaisante à la législation semencière en vigueur et que les graines semées sont à même de reproduire à l'identique les critères qui représentent l'identité génétique de la variété utilisée.

Ces semences certifiées d'une variété donnée, sont issues d'un « noyau génétique » produit par la recherche qui est multiplié pour produire des semences de « pré-base » et « de base » qui sont maintenues et conservées rigoureusement.

NORMES DE PRODUCTION

Pour certaines espèces comme l'arachide, il est possible que la catégorie semence certifiée soit subdivisée en plusieurs générations mais la dernière génération n'est pas susceptible de produire des semences. Elle est uniquement utilisée pour la production.

Dans le cas précis du Sénégal et en raison du faible coefficient de multiplication de l'arachide, les différents niveaux ne sont pas produits jusqu'à maintenant dans des conditions et critères de qualité identiques pour ne pas alourdir le schéma et faciliter la production par un grand nombre de producteurs.

Cependant l'agriculteur n'adhérera à ce type de démarche que si ses besoins quantitatifs sont assurés et si la semence améliorée lui assure une meilleure production, des indices de récolte plus élevés, une réduction des risques liés à la pression des agents pathogènes et des revenus supérieurs. Ce schéma ne peut fonctionner, dans les conditions de la production paysannale africaine, que si les producteurs sont étroitement associés aux choix des variétés (recherche participative) à la multiplication, au conditionnement et à la gestion de stocks de sécurité (in situ).

SYSTEMES DE PRODUCTION

Il est nécessaire d'adapter cette production à deux niveaux, celui de la production amont faisant appel à des structures spécialisées de production, de conditionnement, de stockage et de commercialisation d'une part, et celui d'une production de semences de ferme destinée à couvrir les besoins directs de l'exploitation ou de la collectivité villageoise d'autre part. Pour cela, la mise en place d'une filière semencière arachide nécessite une organisation particulière qui s'appuie sur une réglementation et un suivi efficace. Pour rétablir une certaine confiance les consommateurs et les acteurs de la filière doivent être informés : d'où viennent les semences, comment ont-elles été produites, quelles sont leurs caractéristiques (germination, traitements,...). En dehors de la réglementation semencière pouvant être appliquée, des outils peuvent être utilisés tel que l'étiquetage qui est un élément essentiel de la **traçabilité.**

LES BONNES PRATIQUES SEMENCIERES

Ces bonnes pratiques semencières (BPS) ont pour objectif d'atteindre un niveau de qualité en toute transparence vis-à-vis du consommateur. Elles doivent pouvoir décrire toutes les étapes d'élaboration du produit fini, enregistrer les différentes interventions, garantir la traçabilité sur les produits et finalement répondre à la demande.

LE CHOIX DES PARCELLES

Les conditions environnementales sont fondamentales pour une production de qualité.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Type de sol Sols lourds ou compacts : Difficulté de levée : baisse de la densité Barrière mécanique à la pénétration des gynophores : baisse des rendements Difficulté à la récolte : augmentation des restes en terre et baisse de rendement	Pas de semis en sol lourds ou dégradés
Problèmes phytosanitaires Augmentation des risques liés aux pathogènes du sol de par l'absence de rotation Augmentation du risque aflatoxine par les restes en terre et les pieds morts	Respecter une rotation Eliminer les restes en terre et les pieds morts
Pollution L'arachide étant une plante autogame, l'isolement du champ n'est pas obligatoire.	Eviter cependant de cultiver dans des champs d'arachide contigus, ce qui pourrait entraîner des mélanges de graines au semis et de pieds au moment de la récolte.

LE MATERIEL VEGETAL ET LA PURETE VARIETALE

Le champ ne doit pas contenir un nombre de pieds étrangers (polution) supérieur à 1 pour 1000 pour les semences de base et 1 pour 200 pour les semences certifiées.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Qualité des semences Utilisation de semences à faible valeur culturale[7] Mauvaise levée (faible densité) Utilisation de semences avec mauvaise pureté variétale : Etalement de la maturation dû à l'hétérogénéité variétale (baisse du rendement en gousses matures, augmentation du risque aflatoxines et du taux de mauvaises graines) Utilisation de variétés inadaptées aux contraintes de production Grade, forme ou couleur ne répondant pas à la demande des consommateurs (difficulté de	Utilisation de semences certifiées par services compétents (DISEM) Utilisation de variétés adaptées aux contraintes et aux marchés

[7] Quantité de semences pou ensemencer 1 ha fonction de la densité espérée, du poids de 100 graines, du rendement au décorticage, du rendement en semence et de la faculté germinative.

commercialisation) Utilisation de semences mal stockées Dégradation des semences due aux attaques de ravageurs ou moisissures (mauvaise levée, baisse de rendement)	Utilisation de semences bien conservées, stockées au sec, bien conditionnées et protégées.

LE SEMIS

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Date inadaptée Variétés précoces : Risques de regermination à maturité (perte de rendement) Sol mal préparé faible densité et baisse des rendements Pluviométrie insuffisante Mauvaise levée	Semis à la date recommandée - 2ème décade de juillet Semer sur un sol propre, un nettoyage suivi d'un scarifiage superficiel peut suffir Semer sur sol suffisamment humide (après une pluie de 20 mm au moins)
Densité inadaptée Semis superficiel : mauvaise levée Disque de semoir inadapté à la variété mauvaise densité, endommagement des graines (perte de semence, baisse de rendements) Semis avec espacements irréguliers : Difficulté entretien mécanique Difficulté de récolte (soulevage mécanique) Coût de production plus élevé	Semer à la bonne profondeur : 4-5 cm Vérification du semoir Utiliser disques appropriés Semer à la bonne densité : variétés hâtives 130-150 000 pieds/ha. Variétés tardives 110-120 000 pieds/ha. Semer à espacements réguliers pour faciliter passage outils (meilleur entretien)
Problèmes phytosanitaires Absence de traitement fongicide/insecticide des semences avant semis Forte mortalité à la levée	Poudrage des semences immédiatement après décorticage (Granox® ou Spinox® à la dose de 200g/100kg de graines)

LA FERTILISATION ET AMENDEMENT CALCIQUE

La fertilisation en milieu traditionnel est soumise à des aléas climatiques et économiques contraignants qui en limitent l'utilisation. L'utilisation des engrais à faible dose est cependant un moyen de maintenir à long terme le niveau de fertilité et de production. L'action des engrais phosphatés est très marquée avec des teneurs du sol en P_2O_5 souvent inférieures à 150ppm. Le phosphatage de fond est surtout intéressant dans les zones où la pluviométrie est supérieure à 600 mm/an. L'arachide répond efficacement à un apport de soufre. Le soufre contenu dans le superphosphate simple, le sulfate d'ammoniaque ou le phosphogypse peut suffire sinon apporter 10 kg/ha de soufre.

L'azote est souvent apporté en combinaison avec le soufre sous forme de sulfate d'ammoniaque. La fumure azotée doit être apportée précocement pour jouer un rôle de stater.

La potasse n'est nécessaire qu'en cas de carence (cas de la zone de Patar par exemple).

Au Sénégal l'emploi d'engrais combinés sous forme ternaire est le plus courant comme le 6-20-10.

Le calcium permet d'améliorer l'acidité des sols et améliore la qualité technologique du produit notamment la valeur semencière.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Apports inappropriés Mauvaise fertilisation minérale : pas de réponse de la culture : carence en N,P,K,S avec baisse du rendement et de la fertilité des sols perte financière : pas de retour au niveau de la culture carence en Ca : baisse du rendement, de la qualité semencière. Augmentation de la susceptibilité des graines aux attaques des pathogènes du sol (dont *A. flavus*)	Respecter la fumure préconisée Apporter la fumure au moment opportun : Au semis pour la fumure N,P,K (ex. 6-20-10)à la dose recommandée par la recherche En début de fructification (40-50 jas) pour le calcium à raison de 400 kg de phosphogype en side-dressing pour une production de semences. Ajuster les équipements (épandeurs) ou bien évaluer dose à apporter par ligne.
Qualité des engrais et amendements Utilisation d'engrais ou amendements de mauvaise qualité ou mal formulés : Pas de réponse Contamination des arachide par des résidus	Utiliser des engrais et des amendements de qualité, commercialisés par des firmes reconnues
Environnement Rejet des emballages dans la nature Pollution environmentale	Récupérer les emballages

LUTTE CONTRE LES ADVENTICES, LES MALADIES ET RAVAGEURS

La maîtrise rapide des adventices est fondamentale pour une bonne installation de la culture. Les jeunes plantes sont sensibles à la sécheresse et une concurrence des mauvaises herbes vis-à-vis de la la ressource en eau peut leur être fatale. Le binage pour la destruction des mauvaises herbes est également bénéfique à la pénétration des gynophores (sol ameubli). Le traitement chimique est possible mais nécessite des moyens appropriés.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Traitements inefficaces Désherbage tardif : Mauvaise installation de la culture Compétitivité vis-à-vis de l'eau disponible Mauvaise floraison (perte de rendements) Difficultés à la récolte Utilisation de molécules non adaptées ou à des doses non recommandées Application des produits par grand vent ou forte chaleur	Semer sur un sol propre Désherber en temps opportun : minimum de 3 binages dont le premier juste après la levée complète Respecter les doses et consignes du fabricant
Contamination Utilisation de produits non autorisés ou à des doses	

non conformes	Respecter la réglementation en vigueur (DPV)
Sécurité - environnement Non respect des règles de sécurité lors de la manipulation ou non respect des dates d'application Contamination de fanes et gousses (non commercialisables)	Suivre les recommandations du fabricant et la réglementation nationale

L'EPURATION VARIETALE ET LA RECOLTE

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Epuration des champs Présence de pieds étrangers : Pureté variétale non conforme (production non commercialisable) Hétérogénéité de la maturité (baisse de la qualité) Risque de contamination (*A. flavus* dans gousses immatures)	Passages fréquents dans le champ pour éliminer pieds étrangers ou hors-type (ne pas laisser les pieds arrachés dans le champ)
Date de récolte Récolte à la mauvaise date : Perte de qualité Risque d'attaques d'insectes Risques de regermination (variétés hâtives)	Tests de maturité par prélèvements réguliers de pieds et analyse (présence d'au au moins 70 % de gousses mûres). Récolter les variétés hâtives quand 2% des pieds présentent une regermination
mode de récolte Outil mal adapté : Blessure des gousses Restes en terre (perte de rendements)	Utiliser un outil (souleveuse) en état et bien réglé et une force de traction suffisante pour bien sectionner les pieds sous la zone de fructification
Contamination Récolte des pieds morts et restes en terre Très forte augmentation du risque aflatoxine (augmentation du % de graines moisies)	Ne pas mélanger ces gousses avec la récolte

L'EGOUSSAGE, LE SECHAGE, LE VANNAGE

L'égoussage consiste à séparer les gousses du pied. Cette opération doit protéger l'intégrité de la coque et de la graine surtout lorsque l'arachide est amenée à être conservée en gousses ou que les graines sont utilisées comme semences. L'égoussage manuel est généralement le plus courant. Il peut se faire directement après la récolte, on parle d'égoussage en vert ou après séchage des pieds on parle de battage (utilisation d'un bâton pour taper sur le tas d'arachide et séparer les gousses des pieds). Dans les zones de savane sèche, après arrachage, les pieds d'arachide sont d'abord regroupés en petits tas (meulons) pendant quelques jours pour un ressuyage rapide puis regroupés en meules pour terminer leur séchage avant le battage. Cette technique laisse du temps au producteur et ne représente donc pas une opération contraignante. Par contre l'arachide laissée au champ est exposée aux attaques d'insectes (punaises, bruches) et autres déprédateurs qui peuvent considérablement altérer la qualité de l'arachide

notamment destinée à la semence. Il existe aussi un risque climatique (pluies de fin de cycle) qui peut entraîner de la regermination pour les variétés non dormantes et altérer la qualité semencière.

Dans le cadre de cette opération sera évaluée la technique de l'égoussage en vert, suivie d'un séchage naturel des gousses avec mesure de l'impact sur la qualité. A la récolte, le taux d'humidité des gousses est d'environ 40%, le séchage est considéré comme terminé quand la teneur en eau des gousses est inférieure à 8%.

Le vannage consiste à séparer les gousses des fanes et tiges après séchage et battage manuel et à éliminer les gousses immatures, cassées et autres débris non conformes à la qualité du produit recherché.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Egoussage Gousses avec leurs gynophores : Allongement de la période de séchage Obligation de reprendre l'égoussage (perte de temps et d'argent)	Prendre soin de bien séparer les gousses et ne conserver que les gousses intactes et bien remplies
Mauvais séchage Occurrence des pluies tardives Regermination, moisisures : baisse de la qualité et du rendement Meules compactes Allongement du temps de séchage dans des conditions de température et d'humidité élevées (dégradation de la qualité physique et sanitaire – baisse de rendements)	Egoussage en vert puis séchage en couches minces sur bâche Moyettes avec cheminée centrale pour l'aération avec protection au sommet et gousses orientées vers le centre. Si possible envisager séchage sur support type « perroquet »
Mauvais battage et vannage Trop longue attente au champ : Augmentation des attaques de ravageurs et du risque aflatoxines (dégradation de la qualité physique et sanitaire) Mélange de gousses immatures et débris de paille Augmentation du risque aflatoxines Refus possible des lots à la commercialisation	Battre les arachides dès que l'humidité des gousses et des fanes le permet Commercialiser immédiatement les gousses après vannage et tri. Trier correctement les gousses pour atteindre les standards fixés par la commercialisation

LA COMMERCIALISATION

Dans le cadre de cette opération, la production triée est destinée à être commercialisée auprès de l'unité pilote. Dans la perspective d'une reconnaissance de la qualité, une rémunération à la qualité sera testée. Cette qualité sera établie sur la base de critères mesurables tels que la pureté variétale, le rendement au décorticage, le pourcentage de gousses et graines détériorées (Annexe 2), le poids spécifique. Ces critères seront mesurés à partir d'un échantillon moyen prélevé au moment de la livraison et mentionnés sur le bordereau de livraison.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Mauvais triage	

Pourcentage important de gousses non conformes Déclassement du lot en catégorie inférieure Rejet du lot comme semences Mauvaise valorisation du travail au champ	Respect de l'itinéraire post-récolte (séchage, tri et stockage avant livraison)
Livraison tardive Contamination des arachides à la ferme Dépréciation du lot (déclassement, perte d'argent)	Conserver soigneusement les gousses (sacs propres, local nettoyé et protégé et livrer dès que possible

LE CONDITIONNEMENT, ETIQUETAGE STOCKAGE (UNITE PILOTE)

Les arachides arrivant au point de collecte et de commercialisation seront échantillonnées (cf. § précédent) puis passées au crible et ensachées avec un étiquetage portant le nom du producteur et un n° de lot servant de référence. Ce n° suivra le lot jusqu'à son traitement final : décorticage, calibrage, ensachage, traitement phytosanitaire et stockage. Les interventions et les résultats d'analyses qui suivront (pureté variétale, valeur germinative) figureront sur une étiquette finale qui reprendra le n° du lot, le nom du producteur, le site et l'année de production ainsi que les cachets de contrôle et de certification des services compétents. Les sacs devront être placés dans un local propre, protégé pouvant garder l'intégrité des semences jusqu'à leur commercialisation.

Risques identifiés et impacts	Mesures préventives
Mauvaise identification Mélange entre les lots Déclassement de la production	Prise en charge du producteur dès son arrivée S'assurer du bon nettoyage des outils d'échantillonnage entre chaque prélèvement
Perte de l'identification Perte de traçabilité Déclassement du lot	S'assurer de la lisibilité, de la solidité des étiquettes et de la pertinence des informations
Mauvais stockage Attaques d'insectes et autres déprédateurs Déclassement des lots, perte de marchandise et de revenu Diminution de la valeur semencière : perte de marchandise, produit non commercialisable, perte de crédibilité.	S'assurer du nettoyage préalable du magasin. Vérifier qu'il n'est pas utilisé pour le stockage d'autres produits susceptibles de contaminer les semences.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Delbosc G. Les semences certifiées (1983). Revue Oléagineux vol. 38 n°2.

Mayeux A., Da Sylva A., Schilling R. (1997). La production de semences d'arachide en Afrique de l'Ouest. Revue Agriculture et développement n°14.

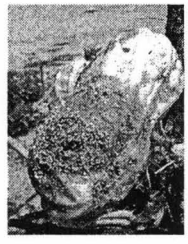
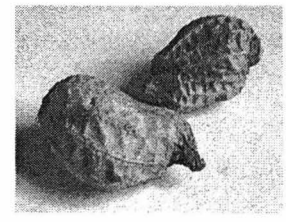
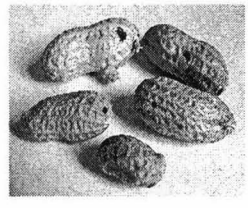
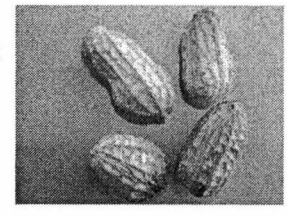
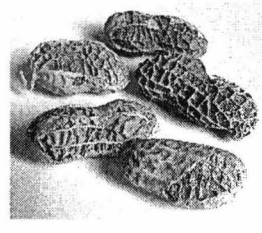
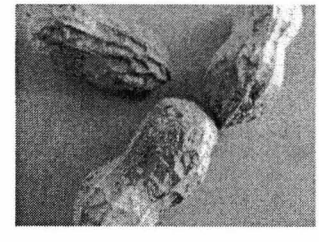
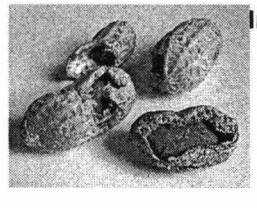
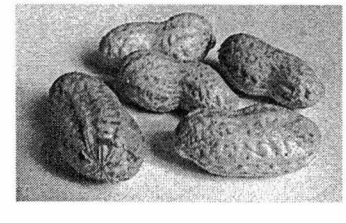
Mayeux, A. (2002) L'approvisionnement des petits producteurs africains en semences d'arachide. Doc. Interne Cirad.

Projet GGP (2001). Dossier technique sur les normes de production, de stockage et de distribution des semences d'arachide en milieu paysannal.

Sagarra, L. (2003) Rapport d'activités campagne 2002.

Schilling R., Ndoye D., Mayeux A. (2001). Les semences d'arachide en milieu paysannal africain. Revue OCL vol. 8 n°5 sept/oct. 2001

Annexe 2 : défauts sur gousses

Critère	Définition	Illustration	Critère	Définition	Illustration
Moisie	Gousse couverte en partie ou totalement de moisissure ou en présentant des traces		**Bout noir**	Avortement d'une partie de la gousse avec formation d'une pointe noire	
Attaquée	Gousse percée suite à des attaques d'insectes (iules, termites)		**Immature**	Gousse récoltée avant maturité complète présentant une coque ridée	
Scarifiée	Gousse dont la coque a été dégradée sur + de 25% de la surface (termites)		**Tachée**	Coloration anormale de la gousse sur plus de 25%	
Cassée	Gousse dont la coque endommagée laisse apparaître la graine		**Intacte**	Gousse ne présentant aucun des critères répertoriés	

RAPPORT DU CERAAS
(PARTENAIRE N° 2)

NOVEMBRE 2004-OCTOBRE 2005

O. DIOUF (CERAAS)
I. DIENG (CERAAS)
H.TOSSIM (CERAAS)
S. BRACONNIER (CIRAD - THIES)
P. DIEDHIOU (ENSA-THIES)

Workpackage 1 : Physiological processes of pre-harvest contamination

Auteurs : Omar DIOUF (écophysiologie, CERAAS, Thiès)
Serge BRACONNIER (écophysiologie, CERAAS/CIRAD)
Ibnou DIENG (biométrie, CERAAS, Thiès)
Hobo TOSSIM (technicien supérieur, CERAAS, Thiès)
Pape M. DIEDHIOU (phytopathologiste, ENSA)

Le présent rapport fait le point des résultats de l'évaluation multilocale portant sur l'étude des « Relations entre variétés, conditions environnementales et résistance à l'aflatoxine ». Cette activité a été reconduite en 2005 et les analyses d'aflatoxine sont en cours.

Relations entre variétés, conditions environnementales et résistance à l'aflatoxine

L'infestation de l'arachide par *A. flavus* et *A. parasiticus* est fonction de la sensibilité variétale et est placée sous l'impulsion conjuguée de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Les spores sont abondants dans l'air et le sol des zones de productions arachidières (CLOUVEL et al., 2000). Ainsi, les conditions favorisant l'infestation par *Aspergillus flavus* et la contamination par les aflatoxines sont assez bien connues (déficit hydrique, température du sol, niveau de fertilité…). En zone semi-aride, le déficit hydrique de fin de cycle constitue le facteur le plus important. Ainsi, l'arachide cultivée dans ces conditions présente des risques d'infestation par *Aspergillus flavus* et de contamination consécutive par les aflatoxines. La consommation des graines contaminées par ces toxines entraîne des risques graves pour la santé humaine et animale, dépréciant ainsi leur valeur commerciale au niveau du marché international. La sélection variétale pour la résistance à l'aflatoxine est, cependant, limité par le manque de connaissances des mécanismes de résistance variétale.

Les études comparatives des réponses agrophysiologiques à la contamination de deux variétés (55-437 et Fleur 11) montrent que Fleur 11, avec un potentiel de rendement plus élevé, apparaît plus affectée par le stress hydrique que 55-437 au point de vue physiologique. Fleur 11 apparaît plus contaminée que 55-437 qui présente un évitement de la déshydratation foliaire et une meilleure capacité de maturation des graines.

Les réponses à la contamination pouvant dépendre de la variété et des conditions pédoclimatiques, l'objectif de ce travail est de caractériser le comportement de 10 variétés d'arachide sénégalaises à cycle court (75 à 90 jours) dans trois sites en étudiant leur niveau d'infestation par Aspergillus flavus et A. parasiticus et de contamination par l'aflatoxine. Il s'agit d'évaluer les niveaux de contamination des variétés et les effets interactifs des conditions du milieu sur leurs réponses.

Matériel et méthodes

Présentation des sites expérimentaux

L'essai a été conduit sur trois sites situés dans le centre bassin arachidier (Bambey) et le sud bassin arachidier (Nioro et Paoskoto) :

- le site de la station de Nioro (13°45'N, 15°47'W) : un sol de type « dior » caractérisé par un pH<5,6 et une teneur en matière organique relativement faible (0,3 à 0,6%) ; climat de type soudano-sahélien ;

le site de Paoskoto : 5 km de Nioro, avec un sol et un climat semblables à ceux de Nioro ;

le site de la station de Bambey (16°28'N, 15°42'W) : un sol de type « dior-deck » caractérisé par une couleur brune foncée, un taux de matière organique variant entre 0,5 et 0,7%, un pH de 7 à 8 et un taux d'argile+limon compris entre 150 et 250 g/kg (AGETIP, 1995). Le climat est de type sahélien.

Deux autres sites, Thilmakha et Meckhé, étaient compris dans le dispositif mais ont été éliminés à cause des dégâts importants dus à l'attaque marquée des criquets.

A Nioro, le semis a eu lieu le 16 juillet après une pluie utile de 28 mm enregistrée 2 jours avant. A Paoskoto, le semis a eu lieu le 19 juillet après une pluie utile de 13 mm. A Bambey, le semis a eu lieu le 26 juillet après une pluie utile de 62 mm.

Matériel végétal

Dix variétés d'arachide à cycle court ont été utilisées pour l'expérimentation. Deux ont été caractérisées par rapport à leur tolérance à l'aflatoxine : 55-437 a été considérée comme tolérante et Fleur 11 comme sensible.

Tableau 12 : Liste des variétés

Variétés	Origine	Cycle (jours)
55-128	Isra/Ceraas/Cirad	80
55-319	Isra/Ceraas/Cirad	80
55-33	Isra/Ceraas/Cirad	80
55-36	Isra/Ceraas/Cirad	80
55-437	Isra/Ceraas/Cirad	90
73-30	Isra/Ceraas/Cirad	90
78-936	Isra/Ceraas/Cirad	75
Fleur11	Isra/Ceraas/Cirad (Nouveau cultivar)	90
GC8-35	Isra/Ceraas/Cirad (Nouveau cultivar)	80
JL24	Isra/Ceraas/Cirad (Nouveau cultivar)	90

Le dispositif expérimental

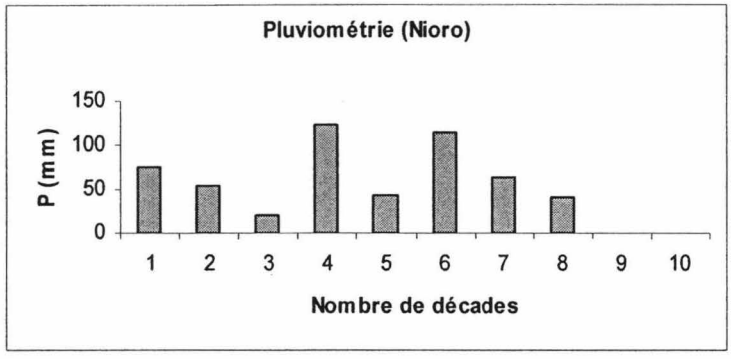
Dans chaque site, le dispositif a été en blocs complets randomisés avec 4 répétitions. Les facteurs étudiés étaient :

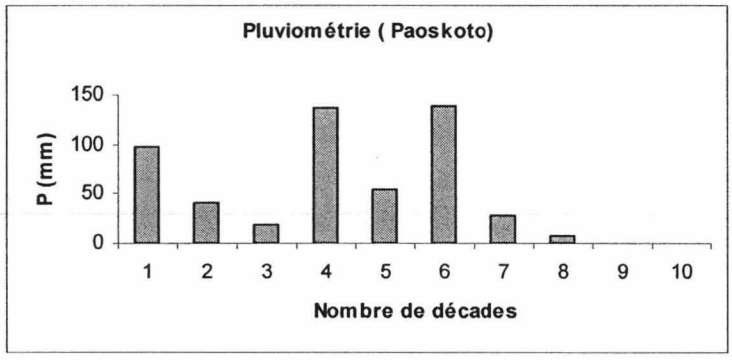
le facteur localité à 3 niveaux correspondant aux trois localités que sont Nioro, Paoskoto et Bambey ;le facteur variété à 10 niveaux correspondant aux 10 variétés du tableau ci-dessus (tableau 1).

La parcelle élémentaire (unité expérimentale) a été constituée de 5 lignes de 6 m avec un écartement de 50 cm entre les lignes et de 15 cm entre les poquets et théoriquement 205 pieds par parcelle. Les trois lignes centrales ont constitué la parcelle utile à l'intérieur de laquelle toutes les observations, mesures et prélèvements ont été faits. Le carré de rendement central a été délimité sur la parcelle utile et mesurait 3 m2.

Conditions climatiques

Les cumuls pluviométriques sont de 536 mm à Nioro, de 523 mm à Paoskoto et de 443 mm à Bambey. A Nioro et à Paoskoto ce sont les décades 4 (123 mm ; 137 mm) et 6 (115 mm ; 117 mm) qui ont réçu plus de pluies tandis qu'à Bambey ce sont les décades 1 (120 mm) et 6 (102 mm) qui ont enregistrées des quantités d'eau importantes (figure 1).





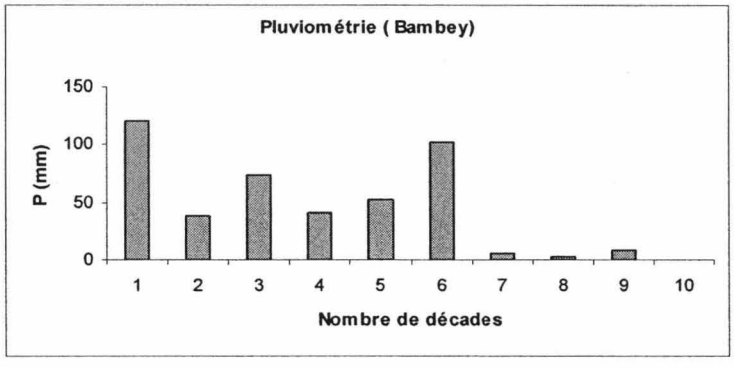


Figure 1 : Répartition de la pluviométrie décadaire à Nioro, à Paoskoto et à Bambey au cours du cycle cultural

Les températures maximales ont varié entre 27°C et 40°C à Nioro et à Paoskoto et entre 27 et 41°C à Bambey (figure 2). Les minimales ont oscillé entre 21°C et 27°C à Nioro et à Paoskoto et 19,4 et 26°C à Bambey. La température moyenne au cours de l'essai a été de 28,45°C à Nioro, de 28,53°C à Paoskoto et de 29,08°C à Bambey.

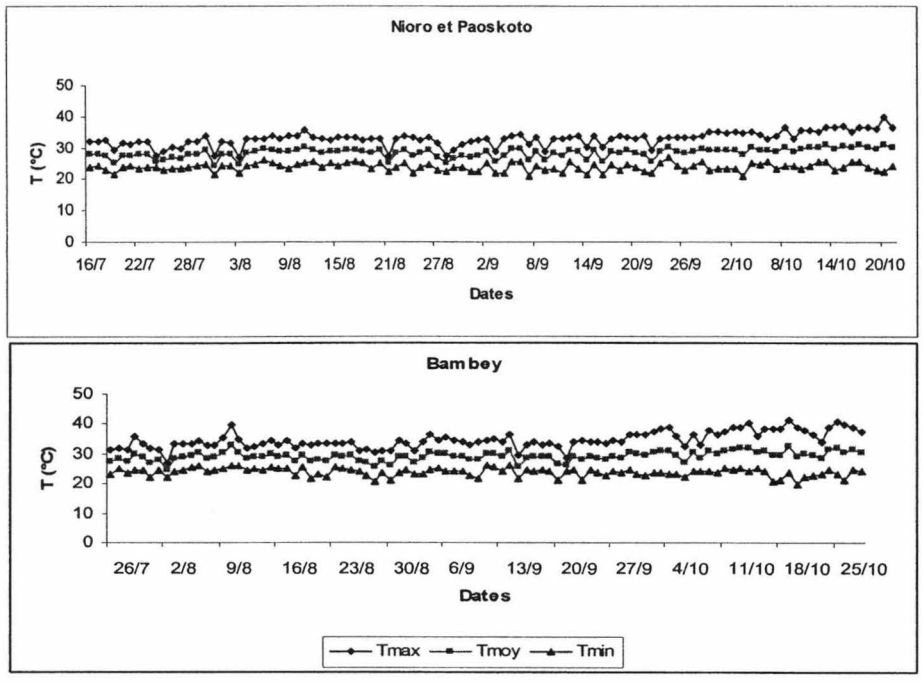


Figure 2 :Evolution de la température de l'air à Nioro, Paoskoto et à Bambey

Les humidités maximales ont varié entre 90% et 100% à Nioro et à Paoskoto et entre 80% et 100% à Bambey (figure 3). Les minimales ont été comprises entre 41% et 92% à Nioro, entre 38% et 92% à Paoskoto et entre 18 et 93% à Bambey. Les moyennes minimale et maximale ont été respectivement de 68% et 94% à Nioro et Paoskoto et de 53,5% et 96,5% à Bambey.

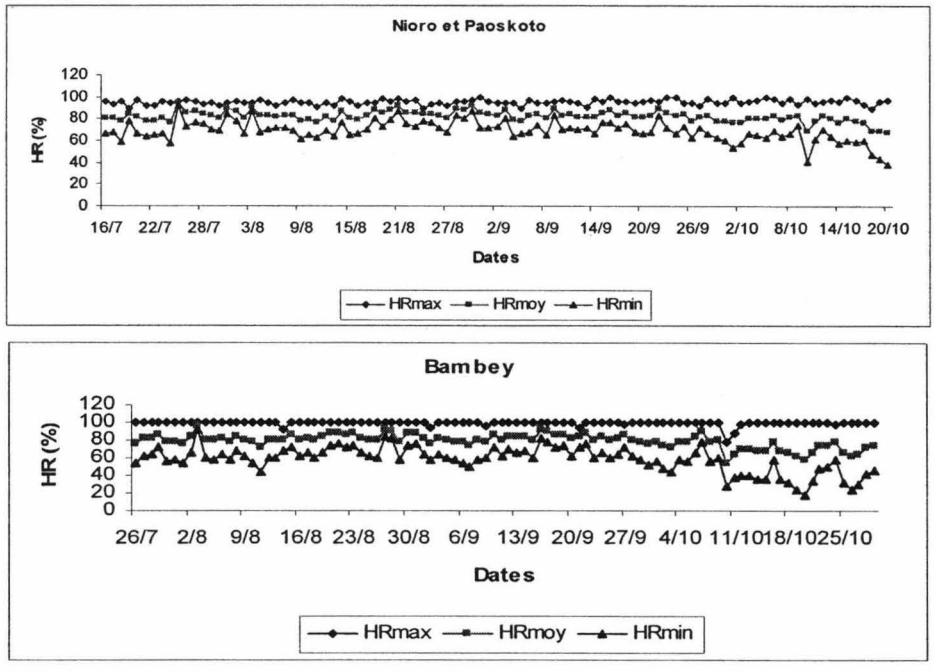


Figure 3 :Evolution de l'humidité relative de l'air à Nioro et Paoskoto et à Bambey

Observations et mesures

L'indice de surface foliaire a été suivi chaque semaine jusqu'à la récolte à partir du 53^{è}JAS pour Nioro et 51^{è}JAS pour Paoskoto. A Bambey deux mesures ont été faites aux 52^{è} et 59^{è}JAS.

Une analyse de maturité a été effectuée en fonction de la coloration de la paroi interne de la coque (figure 4). Ainsi, trois classes de maturité ont été déterminées : M1 (graines très mures), M2 (graines mûres) et M3 (graines immatures). Pour chaque classe le pourcentage d'humidité des graines a été déterminé. Les taux de contamination naturelle par A. flavus (TCN) ont été déterminés en boîtes de

Pétri sur 10 graines pour chaque lot de maturité. Le comptage des graines colonisées par A. flavus s'est fait à partir du 5^{e} jour d'incubation. Enfin, certaines variables agronomiques telles que les rendements gousses et fanes, taille des graines et taux de maturité ont été déterminées.

Figure 4 : Graines regroupées en 3 classes de maturité/variété

Le dosage de l'aflatoxine a été fait selon la méthode AflaTest^{R} développé par VICAM Science and Technology (USA).

Résultats et discussion

Les dates de 50% de floraison obtenues indiquent que la 78-936 est la variété la plus hâtive dans les 2 sites tandis que la JL 24 est la plus tardive. La localité n'a pas influencé la floraison.

D'une façon générale, la 78-936 a présenté le LAI le plus bas tandis que celui de la Fleur 11 a été supérieur à ceux des autres dans les 3 sites (figure 5). Le fort potentiel de développement de la surface foliaire de Fleur 11 a déjà été mis en évidence dans les études précédentes (TOSSIM, 2003 ; DIOP, 2004). Ces derniers ont montré également que cette grande surface transpiratoire pourrait constituer un handicap lorsqu'un déficit hydrique sévère s'installe. Les faibles LAI de la 78-936 sont liés à la petite taille de cette variété et à sa précocité (75 jours).

On note que le pourcentage de classe M1 est presque identique à Nioro et à Paoskoto et plus élevé à Bambey. Suivant le site, les taux de M1 ont été différents pour les variétés. On constate ainsi qu'à Nioro c'est la variété 55-128 qui a le taux de M1 le plus élevé, à Paoskoto, la variété JL 24 et à Bambey, la 73-30 (figure 6).

Les plus bas taux de la 78-936 en graines M1 et des taux très élevés de M3 de cette variété proviennent de l'appréciation de la maturité basée sur la coloration du tégument des graines et de la paroi interne des coques qui ne s'applique pas exactement à cette variété très précoce. A la récolte à Paoskoto, elle avait même commencé à germer.

Quelque soit le site, le taux des graines M1 est supérieur à celui des M2, le taux des graines M3 est le plus faible. Ces variations relatives des proportions des classes de maturité montrent que les récoltes ont été bien effectuées à la maturité et que les variétés n'ont pas subi de déficit hydrique marqué. En effet, lorsque le stress hydrique est sévère certaines variétés comme la Fleur 11 tendent à présenter autant ou plus de graines M3 (BADIANE, 2003 ; Rapport INCO-Aflatoxin, 2002-2003).

Les études antérieures s'accordent sur le fait que la contamination des graines varie selon leur maturité. En effet Diouf et al., (2003) observent un effet de la maturité sur le niveau de contamination quelles que soient les conditions de cultures (ETM ou stress), l'intensité du stress, ses modalités d'application et l'intensité de la pression parasitaire. De même, Dorner et al., (1989) ont remarqué qu'il y avait une forte probabilité d'observer une faible contamination chez les graines mûres. Ces résultats se révèlent concordant dans notre cas car quel que soit le site, les graines M3 sont plus contaminées que les graines M2 et M1 (figure 7). A Paoskoto où les différences variétales ont été significatives, la tolérance de la 55-437 a été confirmée car les graines M1 et M2 de cette variété n'ont pas été colonisées.

Les TCN plus élevés notés à Bambey seraient dûs à la pluviométrie plus faible comparativement aux autres sites et l'attaque des criquets qui ont provoqué des défoliations qui pourraient avoir affecté le processus de maturation de certaines variétés. De plus, l'inoculum initial plus important à Bambey pourrait contribuer à favoriser la contamination par le champignon. Par contre, les faibles nombres de colonies obtenues dans le sol de Paoskoto peuvent être à l'origine des TCN plus faibles obtenus dans ce site qui, comme Nioro, est plus pluvieux.

Dorner et al., (1989) ont montré que la production de phytoalexines ne peut avoir lieu qu'à des aW supérieures à 0,95. Dans tous les sites les aW moyennes enrégistrées sont supérieures à cette valeur.

A Nioro la forte aW observée chez la GC8-35 est liée aux taux élevés de graines M2 et M3 tandis que les faibles valeurs de aW notées chez la 55-437 sont dues aux faibles taux de graines M2 et M3 de cette variété (figure 8). De même, Diouf et al., (2003) ont montré que le principal facteur de variation des aW des graines est le degré de maturation des graines. Ces auteurs ont montré que les graines immatures M3 présentaient les aW plus élevées et donc plus humides. Si cette relation a été observée à Nioro, il n'en est pas de même à Paoskoto et à Bambey. Les faibles valeurs de l'aW de Paoskoto sont dues au nombre de graines insuffisant pour certaines mesures (notamment les graines M2 et M3). En effet, lorsque le nombre de graines est faible, le temps d'équilibre augmente et rend les résultats moins précis. De même, l'absence de différence de aW en fonction des classes de maturité à Bambey pourrait s'expliquer par une précision moindre de cette méthode de mesure lorsque l'humidité des graines est faible. En effet, l'humidité moyenne des graines a été plus faible à Bambey (34,32%) qu'à Nioro (40,38%) et Paoskoto (37,02%) (figure 9). Cette variation de l'humidité des graines à la récolte est en relation avec les hauteurs d'eau reçues en fin de cycle (figure 1). Au point de vue méthodologique, ces résultats montrent que l'estimation de l'état d'hydratation des graines par gravimétrie semble plus précise et moins variable que la mesure de l'activité de l'eau telle que opérée par cet appareil.

Les champignons du genre *Aspergillus* ne se développent que sur des tissus morts ou à activité métabolique réduite (cas des graines). On sait que l'infestation est favorisée lorsque l'humidité relative est supérieure à 10% (DIENER et DAVIS, 1986). Les humidités relatives ainsi obtenues sont favorables à la contamination des graines par les champignons aflatoxinogènes.

Comme pour le TCN, la contamination par l'aflatoxine est en relation avec les classes de maturité (figure 10). En effet, les graines M3 sont les plus contaminées en aflatoxines suivies des graines M2, les graines M1 étant les moins contaminées. Ces résultats vont dans le sens des observations de Dorner et al., (1998) qui ont noté que les graines immatures étaient plus contaminées que celles matures car ces dernières ont la capacité de synthétiser des phytoalexines en réponse à l'attaque fongique. Ces mêmes auteurs ont mis en évidence l'effet du stade de maturité des gousses sur la contamination, les plus matures échappant à la contamination même en période de déficit hydrique. Cependant, par rapport aux variétés et aux sites, les résultats présentent une forte variabilité de la contamination car les variétés ne présentent pas la même contaminatiuon selon le site. En effet la 55-36 apparaît comme la moins contaminée à Nioro et à Paoskoto et plus contaminée à Bambey tandis que la 78-936 qui est la moins infestée à Bambey est plus infestée dans les 2 autres sites. Des études antérieures avaient évoqué cette forte variabilité qui s'expliquerait par le fait que l'infestation de l'arachide par A. flavus et A. parasiticus est fonction de la sensiblité variétale et dépend de l'impulsion des facteurs abiotiques et biotiques. Ces facteurs étant différents d'un site à l'autre sont à l'origine des variabilités observées.

La 55-128 apparaît comme la variété ayant des teneurs faibles dans les 3 sites alors qu'elle présente des TCN élevés. Cette variété semble présenter une résistance à la production d'aflatoxine malgré une colonisation importante. Cette résistance à la production d'aflatoxine reste liée à sa bonne capacité à mûrir ses graines car elle a les taux de maturité les plus élevés dans les 3 sites et éventuellement à une plus grande capacité à synthtétiser des phytoalexines (Dorner et al., 1998).

Les fortes teneurs observées chez les graines M3 des variétés 55-319, 73-30 et GC8-35 sont justifiées par les TCN également élevés chez les graines M3 chez ces variétés respectivement 55%, 85% et 57%.

Les graines destinées à l'exportation font l'objet de tris qui ne retiennent que les graines M1 et M2. Par rapport à cette condition, si on considère les teneurs moyennes en aflatoxine des graines M1 et M2 à Nioro et Paoskoto (5 ppb) et à Bambey (9,5 ppb), on constate les conditions de culture et les choix variétaux permettent de satisfaire les normes européennes à Nioro et Paoskoto et américaines à Bambey. La contamination plus élevée à Bambey serait liée au taux élevé d'inoculum du sol et à la pluviométrie plus faible.

Les rendements en gousses et en fanes (données non présentées pour les fanes) obtenus sont similaires aux rendements obtenus en conditions pluviales au Sénégal (DOUCOURE, 1999 ; CERAAS, 2003 ; CLAVEL et al., 2004 a ; CLAVEL et al., 2004 b ; DIOP, 2004). Les rendements les plus bas en gousses et en fanes ont été obtenus à Paoskoto (tableau 2). Au niveau de ce site les plantes étaient moins développées que dans les autres sites. Les meilleurs rendements en gousses enregistrés à Bambey sont liés à la bonne levée observée dans ce site. De même les bons rendements en fanes de Nioro sont dûs à la faible densité de levée qui a permis aux plantes de développer leur partie aérienne car la compétition pour l'espace était moindre. De plus, l'attaque des criquets a provoqué des défoliations des pieds à Bambey baissant les rendements en fanes de ce site.

A Nioro et à Paoskoto, les rendements en gousses et en fanes de la Fleur 11 sont supérieurs à ceux de la 55-437 confirmant les résultats antérieurs qui montrent que la Fleur 11 a un potentiel de production plus élevé que la 55-437 (CIRAD, 2002, TOSSIM, 2003 ; DIOP, 2004).

On constate que la 78-936 est la moins productrice en gousses et en fanes dans les 3 sites comparativement à ce qu'avait obtenu le CIRAD en 2002 dans la région de Saint-Louis (Sénégal). Cette faible productivité est liée en partie à sa précocité qui peut être avantageuse lorsque la durée de l'hivernage est courte. Cette variété est plus destinée aux zones nord du bassin arachidier.

Le poids des 100 graines, caractéristique technologique importante qui permet de définir le grade de l'arachide de bouche à l'exportation révèle que les graines des variétés 78-936, Fleur 11 et JL 24 diffèrent de celles des autres variétés par leurs poids plus élevés (tableau 3). Ces variétés se révèlent aussi les plus sensibles aux dommages des insectes du sol et des outils de récolte et ont les plus forts taux de graines moisies surtout à Nioro où la pluviométrie est la plus élevée (tableau 4).

Les rendements en « Tout Venant » sont supérieurs à 60% dans tous les sites. Les écarts entre les rendements en « TV » et les rendements de graines « Semences » proviennent du tri effectué pour séparer les graines immatures et celles qui ne sont pas saines de celles qui peuvent servir de semences. Les graines ainsi écartées constituent le lot des graines moisies, percées, splittées et dépelliculées qui traduisent la sensibilité variétale aux attaques des insectes du sol, des iules car le tégument séminal peut opposer une certaine résistance à la pénétration du champignon (ZAMBETTAKIS et al., 1981). En effet les études menées sur des tests d'infestation naturelle au laboratoire et les tests de contamination naturelle au champ ont montré que les variétés étaient moins contaminées au champ. Cela a mis en évidence le rôle possible des coques et du tégument séminal dans la résistance de l'arachide face à la pénétration des champignons aflatoxinogènes (ZAMBETTAKIS et al., 1981 ; HOLBROOK et al., 2000 ; UPADHYAYA et al., 2000).

Conclusion et perspectives

Cet essai multilocal a permis de caractériser le comportement des 10 variétés d'arachide suivant la localité. Il a aussi permis d'étudier leurs niveaux de contamination en fonction des conditions du

milieu. L'évaluation de l'infestation naturelle des graines et leur contamination par les aflatoxines a permis de confirmer que les graines M3 sont les plus sensibles ce qui conforte les résultats antérieurs qui considèrent la capacité de maturation comme critère clé dans la tolérance à la contamination. Cette capacité serait ainsi liée au cycle de la variété, au degré de tolérance au déficit hydrique, à la taille des graines et aux conditions édaphoclimatiques. En d'autres termes, en conditions de déficit de fin de cycle, les variétés à cycle court et celles tolérantes au déficit hydrique présenteraient une meilleure capacité de maturation minimisant ainsi la contamination. Cependant, par rapport aux variétés et aux sites, les résultats présentent une forte variabilité de la contamination. En effet les variétés ne présentent pas la même contamination selon le site.

La 55-128 apparaît dans les 3 sites moins contaminée par les aflatoxines alors qu'elle présente des taux de contamination naturelle relativement élevés. La très bonne maturité des graines de cette variété favoriserait une bonne production de phytoalexines permettant ainsi de minimiser la contamination par les aflatoxines.

A Nioro, la contamination de la 55-437 est la même que celle de la Fleur 11 alors que lors des études antérieures cette dernière apparaît plus contaminée. Cela relèverait de la pluviométrie élevée qui n'a pas permis de discriminer ces 2 variétés. Cette discrimination se réalise sous des pluviométries plus déficitaires et en condition de stress hydrique.

Au point de vue méthodologique, il apparaît aussi que l'humidité relative est plus explicite que la mesure de l'activité de l'eau pour expliquer les teneurs en eau des graines car les mesures de l'aW deviennent peu précises lorsque le nombre de graines est insuffisant.

L'expérimentation a aussi montré que ce sont les variétés à grosses graines (78-936, Fleur 11 et JL 24) qui ont subi le plus de dommages, portes d'entrée des champignons aflatoxinogènes dans les gousses et graines.

Dans la reconduite de cette expérimentation, il faudrait envisager des analyses physicochimiques du sol de chaque site. En effet, la maturité qui joue un rôle primordiale dans la contamination, est fortement influencée par certains éléments du sol comme le calcium. Ceci pourrait contribuer à mieux cerner la variabilité des résultats en fonction des sites.

Ce travail a servi à former un étudiant Burkinabé en DEA de l'Université de Dakar.

Références bibliographiques

Badiane, M., 2003 : Mise au point d'un dispositif expérimental pour l'étude en serre de la contamination en pré-récolte de l'arachide par l'aflatoxine. *Mémoire de DEA du département de Biologie Végétale* (UCAD), 48 pp.

CIRAD, 2002 : Comparaison inter-variétale de la sensibilité à la contamination par les aflatoxines en conditions hydriques limitantes, optimales et excédentaires. *Rapport d'activités du CIRAD*, Novembre 2001-Octobre 2002, 17 pp.

Diop, M.S., 2004 : Tolérance à l'infestation par Aspergillus flavus et à la contamination par l'aflatoxine en conditions de pré-récolte chez l'arachide : implication des caractères agro-physiologiques. *Mémoire de fin d'études* (ENSA-Thiès), 44 pp.

Diouf, O., Dieng, I., Tossim, H., Braconnier, S., et Diediou, P., 2003 : Mise au point de conditions expérimentales en conditions contrôlées pour l'étude de la contamination en pré-récolte de l'arachide. *Rapport du contrat ICA4-CT-2001-10007/ Groudnut-aflatoxin : Novembre 2003-Octobre 2004.*

Dorner, J.W., Cole, R.W. Sanders, T.H. and Blankenship, P.D., 1989 : The interrelationship of kernel water activity, soil temperature, maturity and phytoalexin production in preharvest aflatoxin contamination of drought-stressed peanuts. *Mycopathologia* **105** : 117-128.

Dorner, J.W., Cole, R.J. and Blankenship, P.D., 1998 : Effect of Inoculum Rate of Biological Control Agents on Preharvest Aflatoxin Contamination of Peanuts. *Biological Control* **12** : 171-176.

Holbrook, C.C., Wilson, D.M. et Matheron, M.E., 2000 : Sélection de l'arachide pour la résistance à la contamination par l'aflatoxine avant la récolte. *Comptes rendus de la septième réunion régionale de l'ICRISAT sur l'arachide en Afrique Occidentale et centrale, Cotonou, Bénin* : 6-8 décembre, pp : 27-29.

Rapport intermédiaire d'avancement des recherches de « New tools for groundnut aflatoxin control in the Sahel regions of Africa : Analyse physiologique et moléculaire de la contamination en pré-réccolte de l'arachide par l'aflatoxine. Période du 01/11/2002 au 31/10/2003, pp :19-30.

Tossim, H-A., 2003 : Résistance à l'infestation par Aspergillus flavus et parasiticus en conditions de déficit hydrique de fin de cycle chez l'arachide : caractérisation des mécanismes physiologiques. *Mémoire de fin d'études* (ENCR Bambey), 58 pp.

Upadhyaya, H.D., Nigam, S.N. et Thakeur, R.P., 2000 : Amélioration génétique pour la résistence à la contamination de l'arachide par les aflatoxines. *Comptes rendus de la septième réunion régionale de l'ICRISAT sur l'arachide en Afrique Occidentale et centrale, Cotonou, Bénin* : 6-8 décembre, pp : 32-39.

Zambettakis, C., Waliyar, F., Bockelée-Morvan, A., et Pins (de) O., 1981 : Résultats de quatre années de recherches sur la résistance de variétés d'arachide à l'*Aspergillus flavus*. *Oléagineux* **36 (7)** : 378-385.

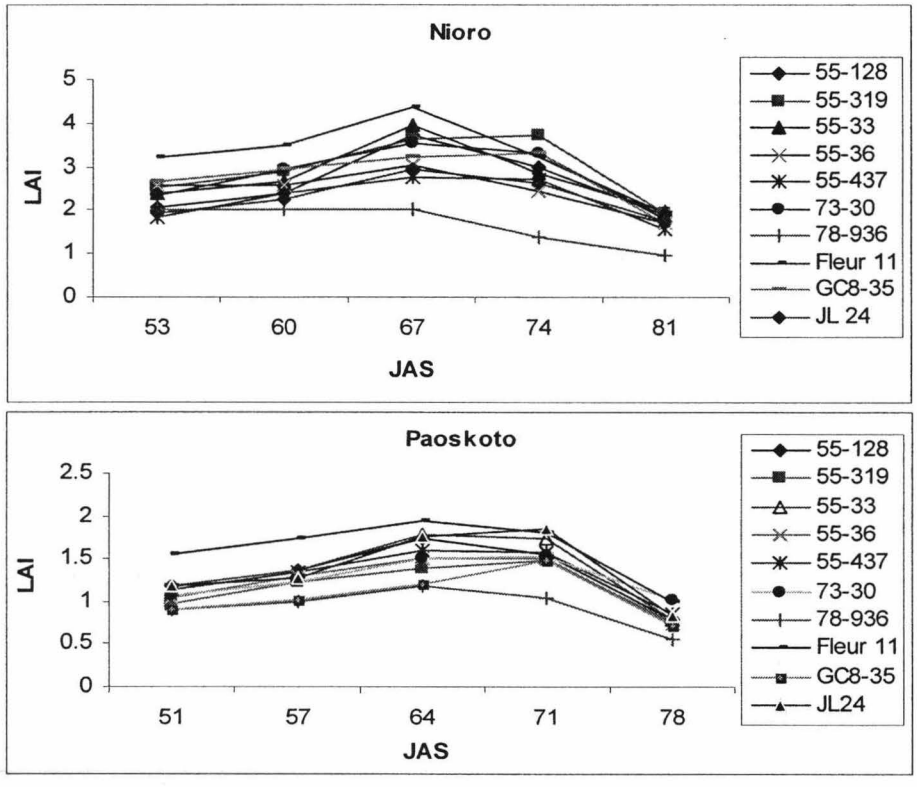


Figure 5 : Evolution du LAI au cours du cycle cultural à Nioro et à Paoskoto

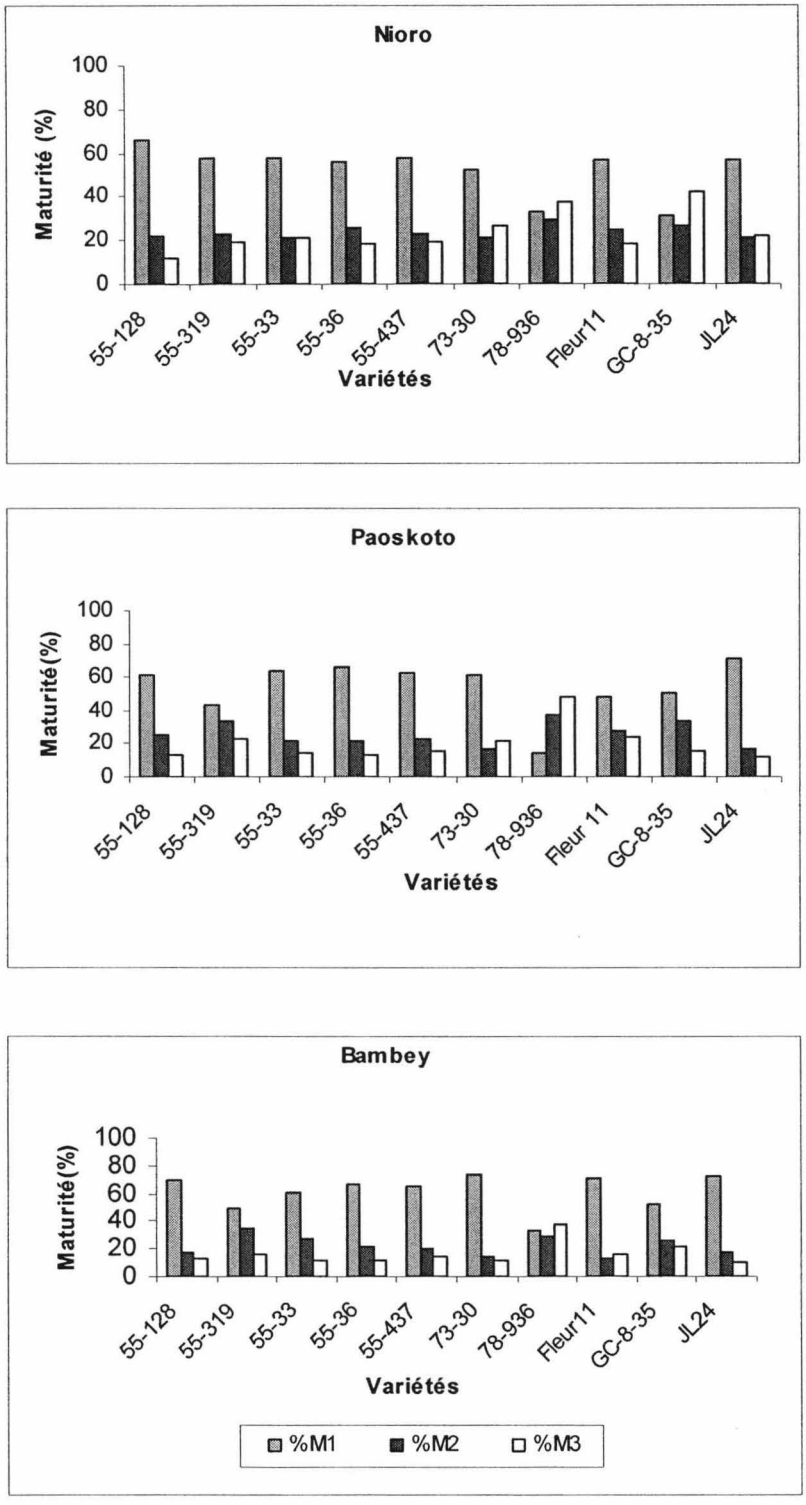


Figure 6 : Variations des pourcentages graines M1, M2 et M3 à Nioro, à Paoskoto et à Bambey en fonction des variétés

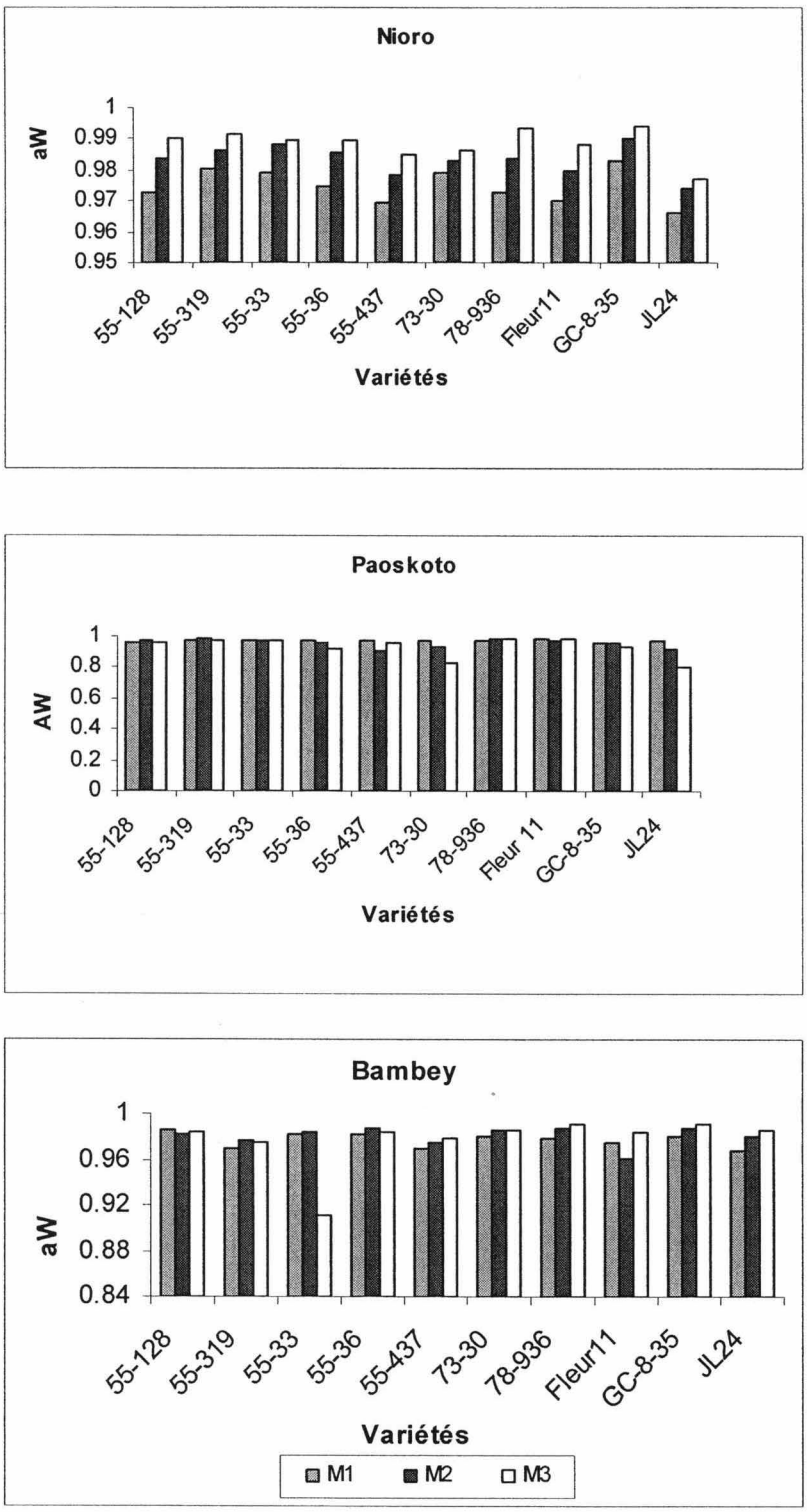


Figure 7 : Variation de l'activité de l'eau des graines en fonction des variétés et des classes de maturité à Nioro, Paoskoto et à Bambey

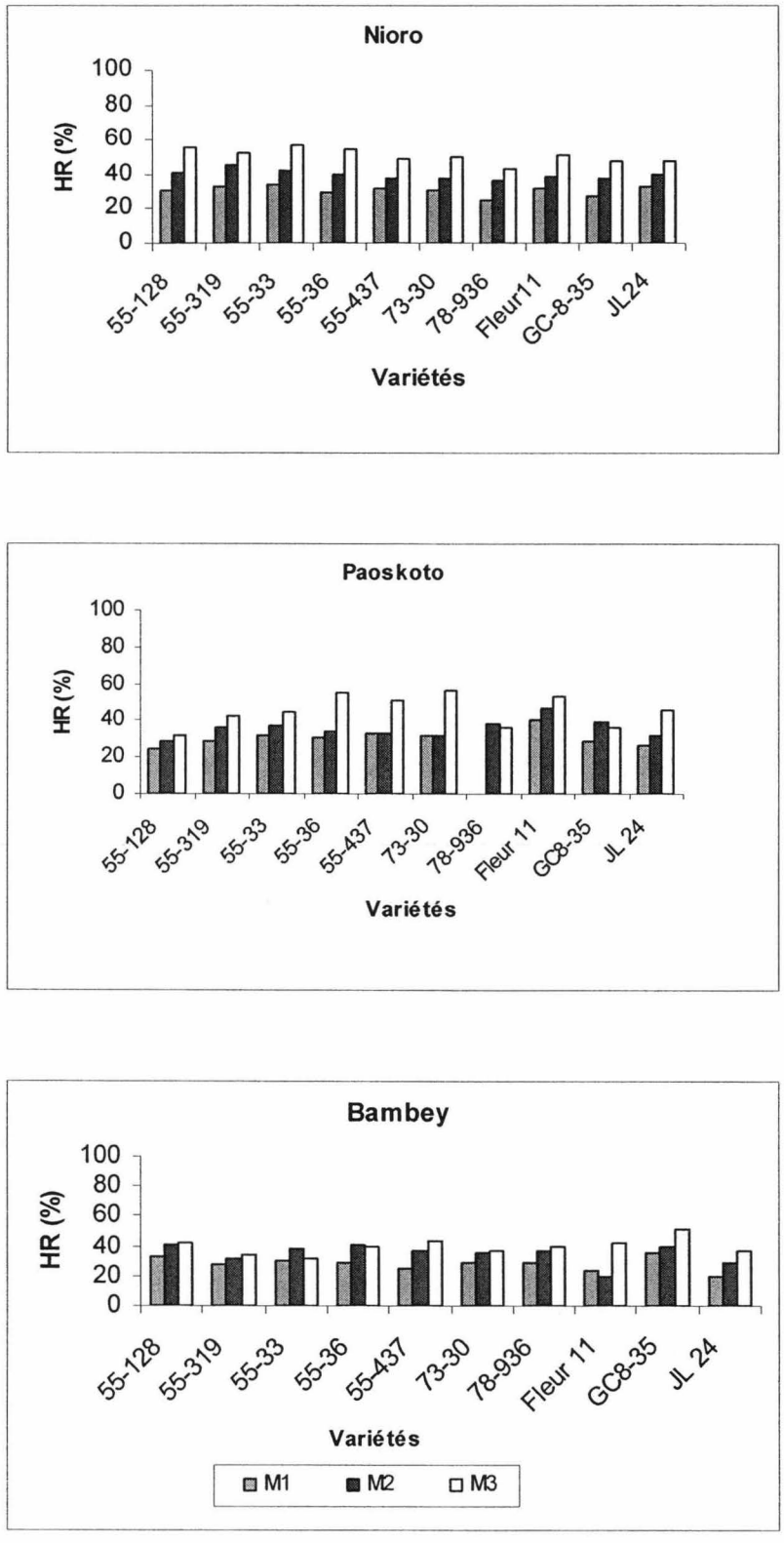


Figure 8 : Variation de l'humidité relative des graines en fonction des variétés et des classes de maturité à Nioro, à Paoskoto et à Bambey

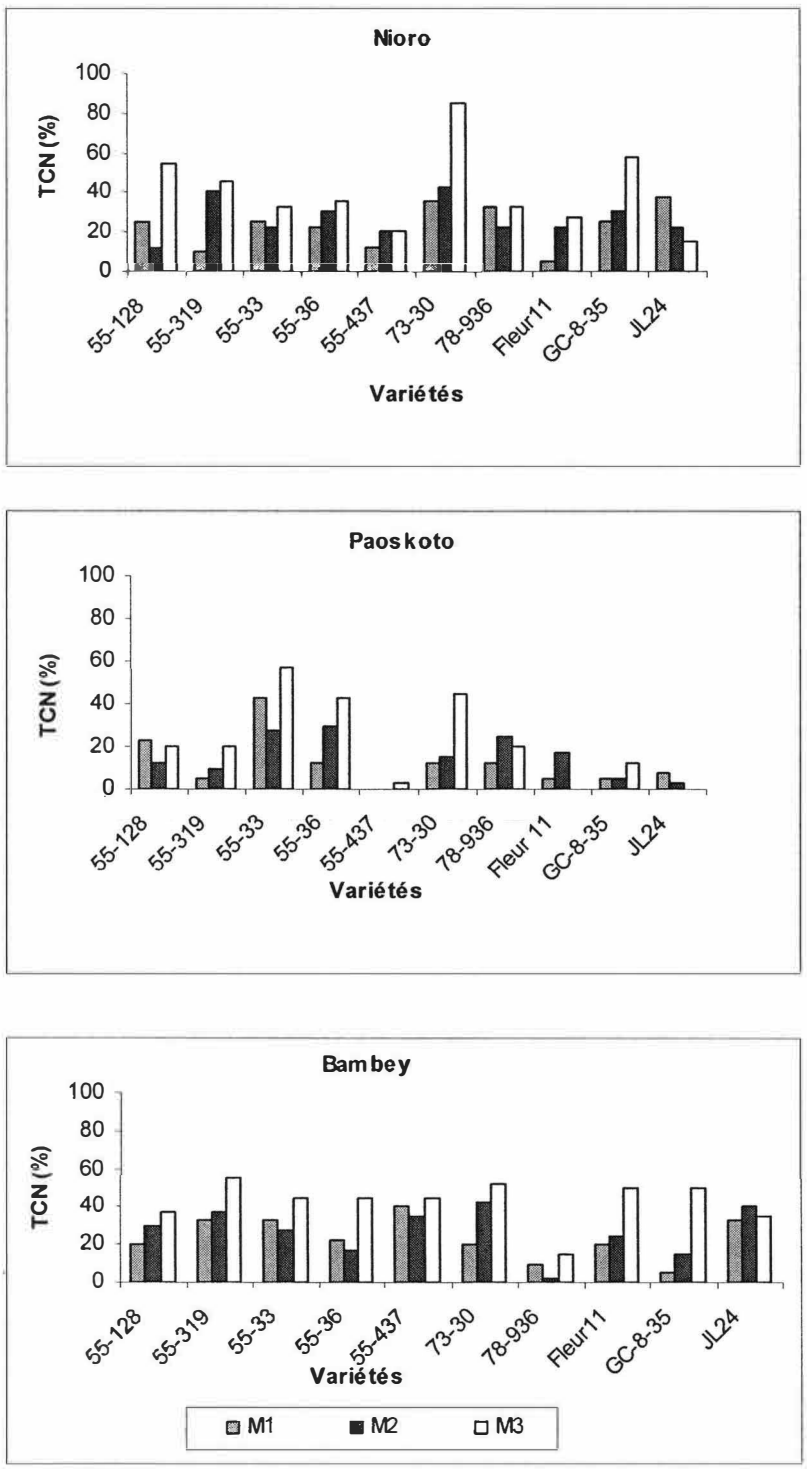
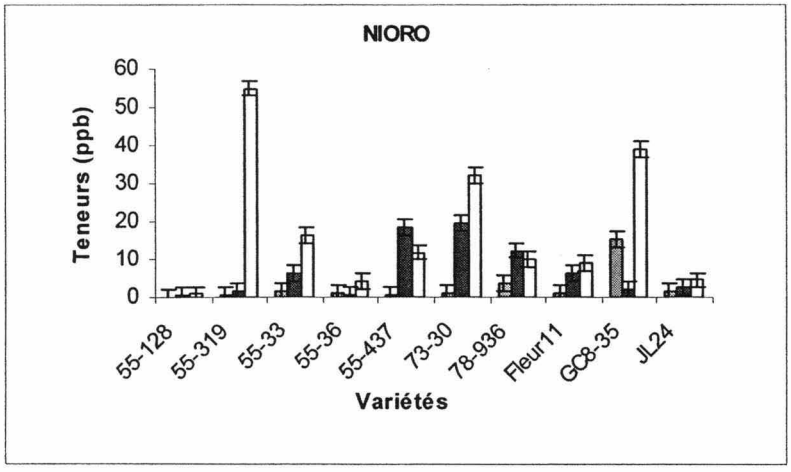
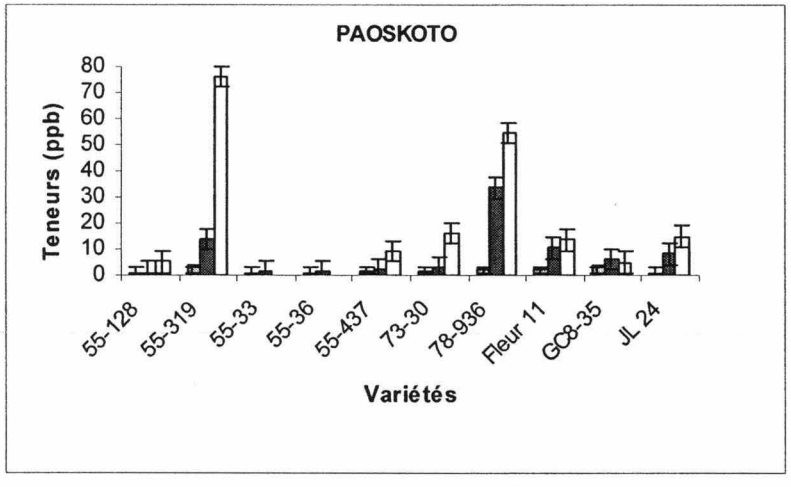
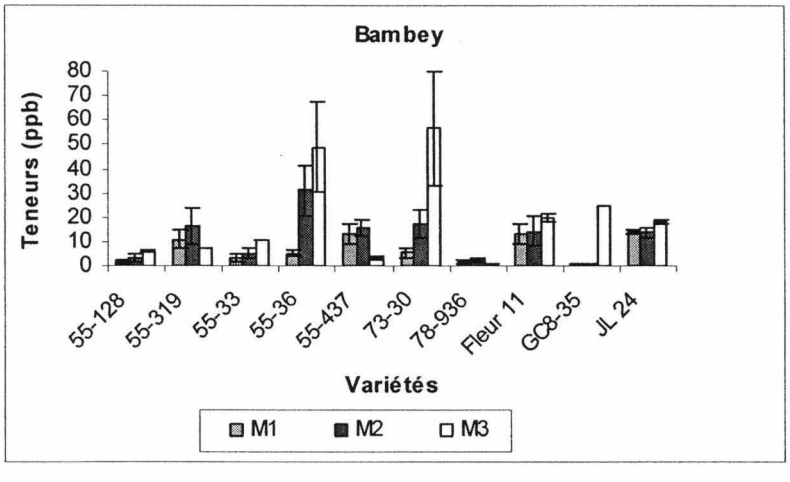


Figure 9 : Variation du taux de contamination naturelle des graines en fonction des variétés et des classes de maturité







igure 10 : Variation de la teneur en aflatoxines en fonction des variétés et des classes de maturité à Nioro, à Paoskoto et à Bambey

Tableau 2 : rendements en gousses

	Rdt Go ha^{-1} (kg ha^{-1})		
Variétés	**Nioro**	**Paoskoto**	**Bambey**
55-128	2116,9 a	836,3 abc	2339,8 a
55-319	2085,9 a	668,7 bcd	1520,3 a
55-33	1957,3 ab	926,2 ab	2378,7 a
55-36	1327,5 ab	821,6 abc	2119,5 a
55-437	1128,6 b	865,5 ab	2096,0 a
73-30	1391,7 ab	404,8 b	1586,1 a
78-936	1670,1 ab	604,4 bcd	1652,1 a
Fleur 11	1990,9 ab	1018,0 a	2034,4 a
GC8-35	1756,2 ab	534,7 cd	2235,6 a
JL 24	1520,7 ab	799,9 abc	2129,8 a
Moy gén	**1694,57**	**747,95**	**2009,22**
CV (%)	22,79	19,70	21,89
Effet var	**0,0080**	**0,0001**	0,0728

Tableau 3 : Poids de 100 graines

	Pds 100 graines		
Variétés	**Nioro**	**Paoskoto**	**Bambey**
55-128	35,50 b	33,79 bc	39,71 b
55-319	35,79 b	33,74 bc	39,93 b
55-33	29,64 c	31,92 bc	33,65 b
55-36	29,92 c	31,58 bc	34,02 b
55-437	30,76 bc	32,21 bc	35,39 b
73-30	34,94 b	32,51 bc	40,69 b
78-936	48,55 a	53,38 a	52,03 a
Fleur 11	51,92 a	40,97 abc	51,05 a
GC8-35	31,89 bc	29,00 c	32,90 b
Jl 24	48,72 a	51,50 ab	52,74 a
Moy gén	**37,76**	**37,06**	**41,21**
CV(%)	6,49	23,36	8,59
Effet var	**0,0001**	**0,0019**	**0,0001**

Tableau 4 : taux de gousses endommagées

	Taux de gousses endommagées		
Variétés	**Nioro**	**Paoskoto**	**Bambey**
55-128	10,82 a	12,15 ab	13,00 ab
55-319	10,55 a	9,39 ab	11,93 ab
55-33	6,76 a	8,28 ab	3,93 b
55-36	10,37 a	12,35 ab	11,49 ab
55-437	9,83 a	7,30 b	7,49 ab
73-30	9,78 a	10,43 ab	7,83 ab
78-936	13,60 a	14,34 ab	12,03 ab
Fleur 11	8,98 a	11,39 ab	13,90 a
GC8-35	6,71 a	7,83 b	5,73 ab
JL 24	14,94 a	17,04 a	9,00 ab
Moy gén	**10,23**	**11,08**	**9,63**
CV (%)	37,92	33,62	40,11
Effet var	0,1132	**0,0210**	**0,0121**

RAPPORT DE L'EQUIPE DE L'UNIVERSITE DE PARIS 12
CRETEIL VAL DE MARNE
(Partenaire N° 3)

NOVEMBRE 2004-OCTOBRE 2005

N. K. DRAME
C. PASSAQUET
A. REPELLIN
Y. ZUILY-FODIL

UNIVERSITÉ PARIS XII VAL de MARNE

FACULTÉ SCIENCES TECHNOLOGIE

EPM

EPM

bioso UMR 137 IRD - Univ. Paris VI-VII-XII

IRD Institut de recherche pour le développement

Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire
(ex Biochimie et Physiologie de l'Adaptation Végétale UP7)

Contrat INCO - CT - 2001-10007

New tools for ground nut aflatoxin control in the Sahel regions of Africa

2005

Analyse physiologique et moléculaire de la contamination en pré-récolte de l'arachide par *Aspergillus flavus*

I. Introduction

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.), principale légumineuse consommée à travers le monde, est régulièrement confrontée à d'importantes contraintes biotiques et abiotiques, en particulier, la contamination des graines par *Aspergillus flavus* et la sécheresse. De plus, il a été démontré que la sécheresse de fin de cycle favorise l'infestation de l'arachide par *Aspergillus* et la contamination des gousses par les aflatoxines (Blankenship *et al.*, 1984 ; Diener *et al.*, 1987 ; Guo *et al.*, 2003). Les conditions environnementales qui existent dans les pays des zones sahéliennes et sub-sahéliennes tels que le Sénégal, favorisent l'infestation des cultures d'arachide par *Aspergillus* en pré-récolte. La contamination des graines par les aflatoxines constitue un problème de santé publique et de sécurité alimentaire du fait de l'implication des aflatoxines dans des cas de cancers hépatiques. Dans ce contexte, la teneur en aflatoxines des produits importés est très réglementé. Le taux maximal d'aflatoxines autorisé par le FDA (Food and Drug Administration) est de 22 ppb aux USA tandis que dans les pays européens, des normes plus strictes de 3-5 ppb sont appliquées.

Le contrôle de la contamination des graines par les aflatoxines au moyen d'une lutte préventive est onéreux et contraignant. De plus, jusque là, les méthodes de sélection traditionnelle n'ont pas permis d'obtenir des variétés résistantes à l'infestation par *Aspergillus* et à la contamination en aflatoxines. En champ, le criblage des variétés pour la résistance des gousses est limité par l'absence de reproductibilité des conditions environnementales favorisant l'infestation (Mehan *et al.*, 1991). Cependant, des sources de résistance variétale à l'infestation en pré-récolte, à la colonisation *in vitro* des graines et à la production d'aflatoxines ont été identifiées (Waliyar et Bockelee-Morvan, 1987 ; Mehan *et al.*, 1989). Certaines variétés sont plus sensibles que d'autres à l'infestation par le champignon et/ou à la contamination des graines par les aflatoxines et ce, dans une même gamme de précocité. Par ailleurs, la tolérance à la sécheresse semble corrélée à la résistance à la contamination en pré-récolte en conditions de sécheresse. Des variétés de blé ou d'arachide tolérantes à la sécheresse présentent également des degrés de contamination faibles en pré-récolte en condition de sécheresse (Holbrook *et al.*, 2000 ; Guo *et al.*, 2003). Ceci permet d'envisager l'identification indirecte de variétés résistantes à *A. flavus*. D'autre part, l'utilisation des biotechnologies (transgenèse) pour améliorer la résistance hôte des espèces sensibles aux champignons du genre Aspergillus, producteurs d'aflatoxines constitue un recours intéressant vu la disponibilité des techniques de transformation génétique et de régénération.

Dans le but d'une sélection variétale précoce de génotypes tolérants à la sécheresse, productifs et résistants à *A. flavus* en pré-récolte, différents systèmes expérimentaux ont été mis au point afin d'identifier des paramètres agro-physiologiques et moléculaires pertinents. Les réponses de quatre

génotypes de référence (cvs. Fleur 11, 73-30, 57-422 et 55-437) ont été étudiées et les résultats ont permis de les classer en fonction de leur tolérance à la sécheresse et de leur résistance à *A. flavus*. Au cours de cette étude, des ADNc partiels et complets ont également été identifiés. L'étude de l'expression des gènes correspondants a montré une corrélation des réponses moléculaires d'une part avec les réponses agro-physiologiques précédemment établies en réponse à la sécheresse (Lauriano *et al.*, 2000 ; Clavel *et al.*, 2005) et d'autre part avec le degré de tolérance à la sécheresse du cultivar. Ces différents ADNc constituent autant de transgènes possibles dont l'implication dans la résistance des variétés d'arachide à *A. flavus* devra être évaluée.

Partie 1 : Mise au point d'un système expérimental pour l'étude de la contamination en pré-récolte de l'arachide par une souche d'*Aspergillus flavus* en conditions contrôlées

Habituellement, la détermination de la résistance variétale à l'*Aspergillus flavus* est réalisée par la méthode IVSCAF (*In Vitro* Seed Colonization by *Aspergillus Flavus*) qui consiste à pulvériser des spores sur les graines et à déterminer leur taux de contamination (TxAF) ainsi que leur teneur en aflatoxines. Cependant, l'absence de concordance entre les résultats de résistance mesurée *in vitro* et les résultats des tests en champ (Mehan *et al.*, 1991) empêche le criblage des variétés par cette méthode simple et rapide. Par ailleurs, les résultats de criblages effectués en champ ne sont connus qu'après l'analyse des graines récoltées, soit au minimum après 90 jours de culture. Dans ces conditions, la nécessité de disposer d'un test de criblage précoce basé sur des paramètres physiologiques et/ou moléculaires des tissus végétatifs associés à la résistance de la variété à *Aspergillus* nous a conduit à la mise au point d'un système expérimental en milieu contrôlé qui soit reproductible et reflétant les différences variétales.

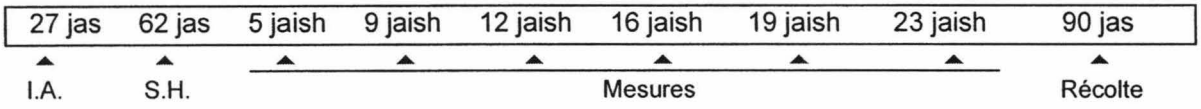
1- Système expérimental

L'essai a été mis en place au CERAAS (Thiès, Sénégal) en serre et le système expérimental est constitué de trois cultivars de type Spanish à cycle court (90 jours) présentant des niveaux variables de tolérance au déficit hydrique (Lauriano *et al.*, 2000 ; Clavel *et al.*, 2005) et de résistance au champignon *Aspergillus flavus* (Waliyar *et al.*, 1994) :

- cv. Fleur 11 : tolérant à la sécheresse et sensible à *A. flavus*,
- cv. 55-437 : moyennement résistant à la sécheresse et résistant à *A. flavus*,
- cv. 73-30 : sensible à la sécheresse et résistance à *A. flavus* variable selon le site et l'année d'expérimentation contrairement au cv. 55-437.

Ces trois cultivars ont été soumis à deux régimes hydriques (irrigué et suspension partielle d'arrosage) et à deux niveaux d'infestation (substrat de culture avec ou sans spores d'A. flavus exogènes) soit 12 traitements au total. L'infestation artificielle du substrat de culture a été effectuée d'après Dorner et al. (1998), à 27 jours après semis (jas). Elle a consisté à ensemencer le substrat de culture avec des spores d'une souche d'A. flavus cultivée in vitro en conditions aseptiques. Le déficit hydrique a été imposé par suspension partielle d'arrosage à 62 jas. Les plantes irriguées (irr) ont été maintenues à 85% ETM (évapotranspiration maximale) et les plantes stressées (str) à 66% (2/3 ETM) pendant 13 jours puis à 33% (1/3 ETM) pendant les 14 derniers jours du cycle de développement, à raison de 3 apports d'eau par semaine.

Les mesures physiologiques (potentiel hydrique, fluorescence chlorophyllienne, conductance stomatique) au cours de la culture ont été effectuées deux fois par semaine selon le schéma suivant :



I.A. : infestation artificielle ; S.H. : imposition du stress hydrique par suspension partielle d'arrosage ; jas : jours après semis ; jaish : jours après induction du stress hydrique.

Les mesures à 9, 16 et 23 jaish correspondent à des mesures effectuées le lendemain de l'arrosage (volume d'eau normal pour les plantes irriguées et volume d'eau réduit pour les plantes stressées) et les mesures à 5, 12 et 19 jaish correspondent à des mesures effectuées après 2 jours sans apport d'eau, suivant la fréquence d'arrosage.

A partir de 90 jas, les gousses ont été récoltées et analysées. Les graines ont été classées par maturité (M1 = matures, M2 = ½ matures, M3 = immatures) avant d'évaluer leur taux de contamination par *A. flavus* (TxAF).

2- Résultats

La mesure du potentiel hydrique foliaire (ψ_w) selon le schéma décrit ci-dessus a permis d'observer un maintien du ψ_w chez les plantes irriguées entre -0,2 MPa et -0,4 MPa, quelque soit le cultivar considéré. Chez les plantes stressées, l'évolution du potentiel hydrique a suivi le cycle de réhydratation. Le lendemain d'un arrosage, même avec un apport d'eau réduit, le potentiel hydrique de ces plantes est comparable à celui des plantes irriguées (entre -0,3 et -0,8 MPa). Pendant les intervalles entre deux arrosages, une baisse de ψ_w plus importante a été observée, d'abord progressive jusqu'à -1,5 MPa puis rapide, atteignant des valeurs de l'ordre de -3 à -3,5 MPa. Cette période de baisse rapide correspond au changement de régime hydrique de 2/3 ETM à 1/3 ETM. Par ailleurs, les fluorescences chlorophylliennes minimale (F0) et maximale (Fm) chez les trois cultivars n'ont semblé que très légèrement affectées par le déficit hydrique contrairement à la conductance stomatique, faible chez les plantes stressées. Le classement des graines par maturité a montré que le cv. Fleur 11 présente un taux de maturité des graines plus faible avec un pourcentage de graines M1 réduit par rapport aux cvs. 73-30 et 55-437. Ce dernier a les pourcentages de M1 les plus élevés, quelque soit le régime hydrique. Chez les deux autres cultivars, en particulier, Fleur 11, le déficit a entraîné une réduction du taux de gousses matures.

L'infestation artificielle, contrairement au déficit hydrique, n'a affecté aucune des variables agro-physiologiques, quelque soit le cultivar considéré. Concernant la contamination des graines par *Aspergillus flavus* (TxAF), évaluée par la détermination du taux de graines portant une sporulation verte, un effet plutôt bénéfique de l'infestation artificielle a été observé en condition de déficit hydrique. Dans e cas, les graines issues de plantes infestées artificiellement ont été moins contaminées que les graines issues de plantes non infestées. Par ailleurs, les graines des plantes irriguées ont présenté des taux de contamination des graines (TxAF) globalement plus élevées que les graines des plantes stressées, TxAF de 66% contre 51%. Le déficit hydrique, tel qu'appliqué au

cours de cet essai, n'a pas entraîné une stimulation de la contamination des graines. C'est plutôt l'effet inverse qui a été observé avec une réduction des TxAF par rapport aux témoins (Fig. 1).

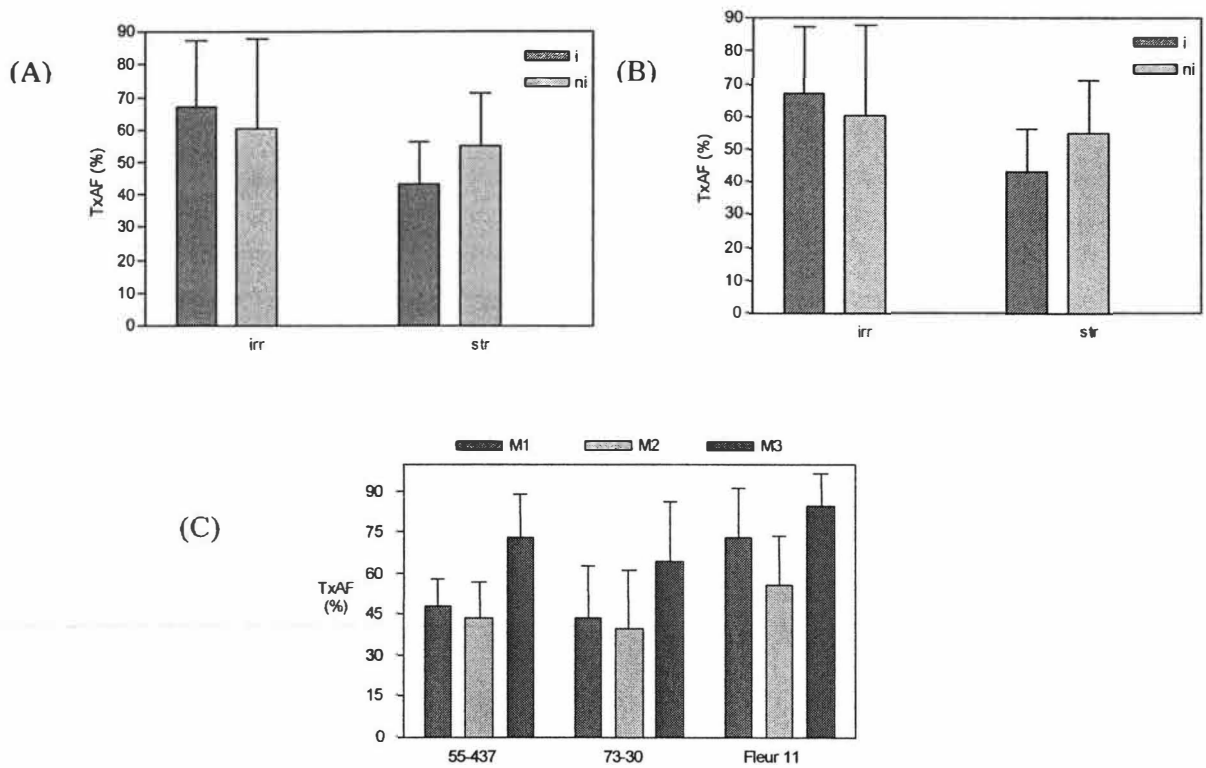


Figure 1 : Taux de contamination moyen des graines des 3 cultivars par *Aspergillus flavus* (TxAF). (A) TxAF moyen en fonction du niveau d'infestation et du régime hydrique. (B) TxAF moyen en fonction du de la maturité et du régime hydrique. (C) TxAF moyen en fonction du cultivar et de la maturité des graines. M1 : graines matures, M2 : graines ½ matures, M3 : graines immatures, irr : irrigué, str : stressé, i : infesté, ni : non infesté.

L'analyse du taux de contamination des graines en fonction de leur niveau de maturité a montré que les graines de la classe M2 sont globalement moins contaminées que celles des classes M1 et M3 (la plus sensible). Un taux de contamination de l'ordre de 55%, 46% et 74% a été observé respectivement pour les classes M1, M2 et M3, tous cultivars, régime hydrique et niveau d'infestation confondus. Par ailleurs, l'effet variétal a été significatif sur les taux de contamination des graines. Le cv. Fleur 11 est apparu plus sensible que les cvs. 55-437 et 73-30. Ce dernier s'est s'avéré plus résistant, quelque soit le traitement considéré.

En ce qui concerne le taux de contamination du sol, le déficit hydrique n'a pas eu d'impact sur le potentiel infectieux du sol en conditions naturelles (pas d'infestation artificielle), le nCFU étant en moyenne de $8{,}6.10^2$ spores par gramme de sol. En condition d'infestation artificielle, une augmentation de 25% du nombre de spores a été observée dans le sol ayant subi un stress hydrique

comparé au sol irrigué normalement. Cependant, cette augmentation du nombre de spores dans le sol n'a pas induit d'augmentation du TxAF des graines issus des plantes stressées et infestées, bien au contraire. Ainsi, le déficit hydrique aurait affecté la population fongique apportée au cours de l'infestation artificielle contrairement à la population naturelle du sol.

3- Discussion

Les résultats ont montré que l'infestation artificielle des plants d'arachide n'a pas modifié leur physiologie générale ni leur production. De plus, elle a eu un effet bénéfique, en particulier, en conditions de déficit hydrique. L'infestation artificielle a consisté à ajouter au substrat de culture, des spores d'une souche d'*Aspergillus flavus* prédominante dans les échantillons de sol provenant de la sole du CERAAS à Bambey, régulièrement emblavée en arachide. Or, le substrat de culture contient naturellement des spores comme l'atteste le nCFU avant le semis qui est de $7{,}52.10^2$ spores/g de sol. Il n'est pas impossible que la population fongique qui augmente en condition de déficit hydrique soit moins agressive que la population naturellement présente dans le substrat de culture, ce qui expliquerait la réduction du TxAF des graines observée en condition d'infestation artificielle. L'ajout de souches non aflatoxigènes dans le sol induit une réduction de l'infestation des graines par bio-compétition avec les souches aflotoxigènes initialement présents (Dorner et Cole, 2002). Dans le cas de notre étude, la présence d'une souche cultivée en condition stérile en quantité importante (nCFU moyen après la récolte du sol infesté = $11{,}1.10^4$ et celui du sol non infesté = $8{,}6.10^2$) réduit la contamination des graines probablement par compétition avec les souches initialement présentes dans le sol.

Les faibles niveaux de résistance à la sécheresse sont généralement corrélés à des degrés élevés de contamination en pré-récolte (Holbrook *et al.*, 2000 ; Guo *et al.*, 2003). Or, le cv. Fleur 11 qui présente une bonne résistance à la sécheresse (Clavel *et al.*, 2005) présente le plus de graines contaminées. Cependant, ce cultivar présente une mauvaise maturation des graines en comparaison avec le cv. 55-437 plus résistant à *A. flavus*. La classification des graines par maturité a permis d'observer que les graines étaient d'autant plus contaminées que leur taux de maturité était faible. Ces résultats sont en accord avec des expérimentations précédentes (Keenan et Savage, 1994 ; CERAAS, 2003). Les graines immatures (M3) présentent une humidité relative élevée qui constitue un facteur favorisant la prolifération du champignon (Diener *et al.*, 1987). De plus, Chen *et al.* (2002) ont montré l'implication de certaines protéines LEA dans la résistance des grains de maïs à *A. flavus*. Or, ces protéines s'accumulent pendant la phase de dessiccation, au cours de la maturation des graines (Close 1996 ; Ingram et Bartels, 1996 ; Dure, 1997). La mauvaise maturation du cv. Fleur 11 pourrait donc être à l'origine de sa sensibilité vis à vis de la contamination par *Aspergillus flavus*.

Dans le présent contexte expérimental, le déficit hydrique de fin de cycle a été simulé par suspension partielle d'arrosage car les conditions environnementales durant la période de l'essai ne permettaient pas une suspension totale d'arrosage simultanément à la production de gousses. La survie des

plantes serait sérieusement menacée surtout pendant un déficit hydrique de 28 jours. Or le ré-arrosage des plantes entraîne une acclimatation et un endurcissement surtout chez l'arachide qui reprend rapidement (Lauriano et al., 2004). Ce phénomène a pu biaiser le comportement des plantes stressées vis à vis de l'infestation par les spores d'A. flavus. De plus, les gènes de stress sont également impliqués dans l'interaction hôte/A. flavus (Guo et al., 2003 ; Cleveland et al., 2004). Par ailleurs, l'effet dépressif d'une irrigation optimale (ETM, évapotranspiration maximale) avait été constaté en champ en 2002 et 2003. Une fraction d'eau transpirable dans le sol (FTSW) inférieure à 0,4 ou supérieure à 1 favoriserait, dans les deux cas, la contamination des graines par A. flavus (CERAAS, 2003). L'implication des facteurs environnementaux dans l'interaction hôte/Aspergillus ajoute à la complexité des réponses de défense.

4- Conclusion

La mise au point d'un système expérimental pour l'étude de la contamination en pré-récolte de l'arachide par *Aspergillus flavus* a montré les variabilités liées aux conditions expérimentales. Les deux traitements : suspension partielle d'arrosage (alternance de périodes de déficit hydrique et de réhydratation) appliquée pour maintenir les plantes en vie et infestation artificielle pour une infection homogène des plantes par *Aspergillus flavus* ont eu un effet bénéfique sur la résistance des plantes au champignon. D'une part, par l'endurcissement des plantes à la contrainte hydrique et d'autre part par la modification du potentiel infectieux des souches d'*A. flavus* probablement par compétition. Ce travail a également montré l'importance d'une bonne maturation des grousses pour une meilleure résistance à la contamination par *Aspergillus*. D'autres caractères tels que l'évitement de la déshydratation ou la dormance constituent également des facteurs importants de la résistance variétale à *A. flavus* indépendamment de la tolérance à la sécheresse (cas du cv. 73-30).

Les différences variétales observées au cours d'expérimentations précédentes ont été confirmées : (1) le cultivar le plus productif (Fleur 11) présente le taux de maturité le plus faible et une plus forte sensibilité à *Aspergillus flavus* ; (2) la classe de maturité intermédiaire M2 présente des potentialités de résistance au champignon plus importantes que les classes M1 et M3 ; (3) le cv. 73-30 présente les taux de contamination les plus faibles (CERAAS, 2003). Cependant, le fait que les graines issues de plantes non infestées présentent des niveaux de contamination comparables, voire supérieurs à ceux des graines de plantes infestées et que la stérilisation du substrat dans le but d'en éliminer les spores naturelles entraîne d'importantes carences nutritionnelles pose un problème de choix entre conditions naturelles ou conditions expérimentales adaptées. Dans les études ultérieures, il paraît important, dans un premier temps, d'éviter les combinaisons de facteurs (surtout artificiels) pour une meilleure compréhension de l'interaction hôte/Aspergillus par des techniques plus fines telles que l'utilisation des outils moléculaires.

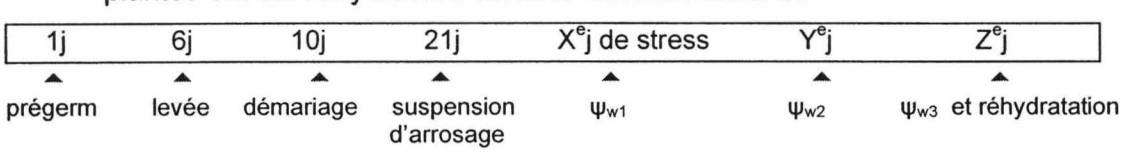
Partie 2 : Caractérisation des réponses moléculaires de l'arachide au déficit hydrique : implication des gènes codant des protéines cataboliques et protectrices.

Dans le but d'identifier les mécanismes utilisés par les plantes pour répondre au déficit hydrique, les gènes dont l'expression est modifiée par cette contrainte peuvent être clonés et analysés. La mise en évidence des gènes impliqués dans la réponse (et l'adaptation) des plantes aux contraintes environnementales est possible par l'étude comparative de cultivars résistants et sensibles. Cette option a été retenue par le laboratoire et a été concrétisée par la mise au point d'un système expérimental original constitué de Fabacées présentant un gradient de sensibilité à la sécheresse : système *Phaseolus/Vigna* (Vasquez Tello *et al.*, 1990) et dans lequel les plantes sont soumises à un gradient de déficit hydrique contrôlé. Ce schéma expérimental a été appliqué pour l'étude des gènes impliqués dans l'adaptation de l'arachide à la sécheresse. Malgré son importance économique et agronomique, très peu de travaux ont porté sur l'amélioration de la tolérance à la sécheresse de l'arachide. A ce jour, seuls deux travaux ont permis l'identification de transcrits différentiellement exprimés en réponse à la sécheresse chez l'arachide (Jain *et al.*, 2001 ; Luo *et al.*, 2005). Ces transcrits ne sont pas encore tous identifiés et leurs rôles éventuels dans la tolérance à la sécheresse ne sont pas définis. Dans ce contexte, l'identification de gènes candidats constitue une alternative intéressante à la recherche de marqueurs moléculaires rendue difficile par le faible polymorphisme génétique de l'arachide. De plus, l'implication des gènes de stress, entre autres ceux dont l'expression est régulée par la sécheresse, dans la résistance à la contamination par *Aspergillus* permet l'identification indirecte de gènes de résistance hôte potentiels.

1- Système expérimental

Le schéma expérimental utilisé pour cette étude a été le suivant :

- 3 cultivars ayant différents degrés de tolérance à la sécheresse et dont le comportement agro-physiologique est bien décrit : cvs. Fleur 11 et 73-30 de type Spanish à cycle court (90 jours) et 57-422 de type Virginia à cycle long (105 jours),
- imposition du déficit hydrique progressif par suspension totale d'arrosage au 21^e jour de développement. Trois stades de sécheresse ont été définis à partir de l'initiation du stress en fonction de la valeur du potentiel hydrique mesuré. A la fin de la période de sécheresse, les plantes ont été réhydratées selon le schéma suivant :



- prélèvements des feuilles aux potentiels hydriques définis.

La culture des plantes a été réalisée en phytotron (photopériode 12 h, température 25°, éclairement 400-500 µmol.$m^{-2}.s^{-1}$, humidité 70%). Des expériences préliminaires portant sur les modifications morphologiques des plantes au cours d'un déficit hydrique ont permis de déterminer la valeur des □$_w$ définissant un stade de déficit hydrique donné :

- ψ_w = -0,25 ± 0,05 MPa, stade témoin
- ψ_w = -1,5 ± 0,2 MPa, stade de sécheresse légère (S_1)
- ψ_w = -2,5 ± 0,2 MPa, stade de sécheresse moyenne (S_2)
- ψ_w = -3,5 ± 0,2 MPa, stade de sécheresse sévère (S_3)
- ψ_w = -0,5 ± 0,05 MPa, stade de réhydratation (R) après S_3

Les séquences partielles des gènes cibles ont été obtenues par amplification RT-PCR à partir d'ARN totaux de feuilles du cv. Fleur 11 au stade S_2. L'expression des gènes correspondants a été étudiée par RT-PCR semi-quantitative ou par PCR en temps réel. Les ADNc complets de certains de ces gènes ont été isolées par extension des extrémités 5'et 3' des ADNc grâce à la méthode de 3'/5' RACE-PCR (Rapid Amplification of CDNA Ends-PCR). La caractérisation d'un des ADNc codant un inhibiteur de sérine protéase de la famille des Bowman-Birk (*pbbi*) a été complétée par son expression dans un système hétérologue bactérien (*Escherichia coli*). Ceci, afin de produire la protéine recombinante correspondante et les anticorps qui permettraient sa détection dans un pool protéique.

Dans le but de déterminer le rôle *in vivo* de *pbbi*, l'ADNc a été introduit dans des plants d'*Arabidopsis thaliana* par transformation *in planta* via *Agrobacterium tumefaciens*. Les agrobactéries ont une capacité naturelle à transférer des gènes dans les cellules végétales lorsque la plante est blessée. Elles contiennent un plasmide (Ti, *tumour inducing* ou Ri, *root inducing*) qui porte une région spécifique, l'ADN-T qui est transféré et intégré au génome des cellules végétales. Le système de transgenèse utilisé est un système récemment mis au point et qui utilise les propriétés de recombinaison spécifique du bactériophage lambda pour le transfert de séquences d'ADN entre vecteurs : le système GATEWAY™. La recombinaison s'effectue entre des séquences particulières, attP (*phage attachment site*) avec attB (*bacterial attachment site*) et attL (*left attachment junction*) avec attR (*right attachment junction*) par le biais d'une intégrase (Int) codée par le bactériophage lambda et de facteurs d'intégration bactériens (IHF, *integration host factor*). La réaction reverse est assurée par l'action combinée d'une intégrase (Int) et d'une excisionase (Xis) ainsi que d'autres protéines d'origine bactérienne (Fig. 2).

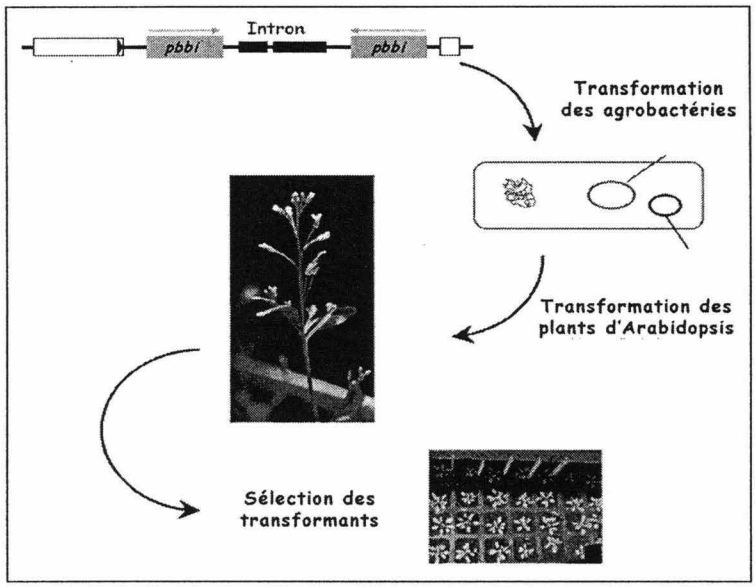


Figure 2 : Clonage dans le système GATEWAY™. Recombinaison du phage λ dans Escherichia coli, attP x attB → attL x attR. attP : phage attachment site, attB : bacterial attachment site, attL : left attachment junction, attR : right attachment junction, Int : intégrase, IHF : integration host factor, Xis : excisionase. Les vecteurs

GATEWAY™ comportent une séquence ccdB qui code une protéine létale pour les bactéries sauvages. Cette région létale est remplacée par l'ADNc lors de la réaction de recombinaison. Toutes les colonies qui se développent auront donc intégré un vecteur potentiellement recombinant. Les transformants d'Arabidopsis sont ensuite sur la base de leur résistance à l'herbicide BASTA®, conférée par le gène bar des vecteurs. Le protocole suivi est représenté dans la figure 3.

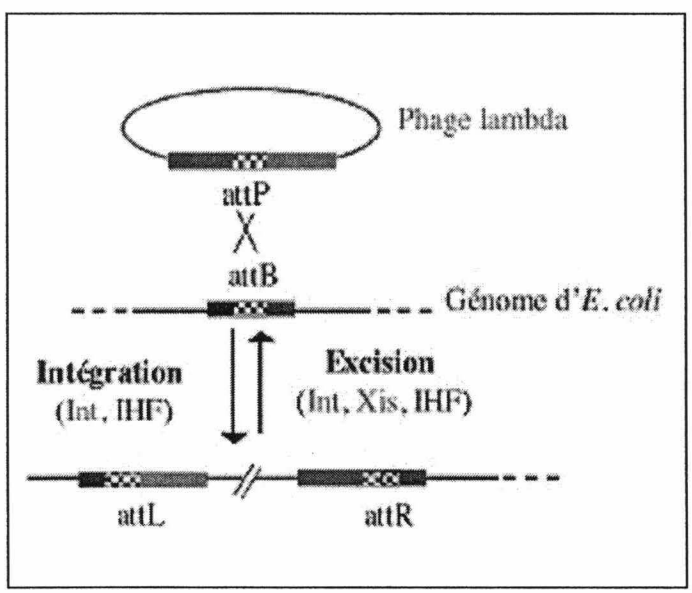


Figure 3 : Protocole de la transformation génétique d'*Arabidopsis thaliana*. L'ADNc est d'abord inséré dans un vecteur puis le vecteur recombinant est introduit dans des cellules d'agrobactéries. Les agrobactéries transformées sont enfin introduits dans des plants d'arabidopsis par transformation *in planta*.

2- Résultats

2-1 Identification des ADNc

L'étude moléculaire réalisée au cours de ce travail a permis l'identification de 3 ADNc partiels de gènes codant une phospholipase Dα (*ah-pld*, 870 pb), une cystéine protéinase de la famille des papaïnes (*ah-cp*, 232 pb), une sérine protéinase de la famille des subtilisines (*ah-sp*, 1821 pb) et 2 ADNc complets de gènes codant une protéine LEA de groupe 1 (*ah-lea*, 582 pb) et un inhibiteur de sérine protéase de la famille des Bowman-Birk (*pbbi*, 561 pb). Toutes ces séquences sont décrites pour la première fois chez l'arachide et ont été déposées dans GenBank. Les numéros d'accession sont DQ011881, DQ011882, DQ011883, DQ011884 et DQ011885 pour peanut Bowman-Birk inhibitor (*pbbi*), *Arachis hypogaea* phospholipase Dα (*ah-pld*), *Arachis hypogaea* sérine protéase (*ah-sp*), *Arachis hypogaea* cystéine protéase (*ah-cp*) et *Arachis hypogaea* LEA protéine (*ah-lea*) respectivement.

L'identification des ADNc a été effectuée par homologie de séquences avec d'autres espèces et par analyse bioinformatique. La figure 4 représente les segments de protéines déduites des ADNc isolées chez l'arachide par rapport à la protéine entière cible.

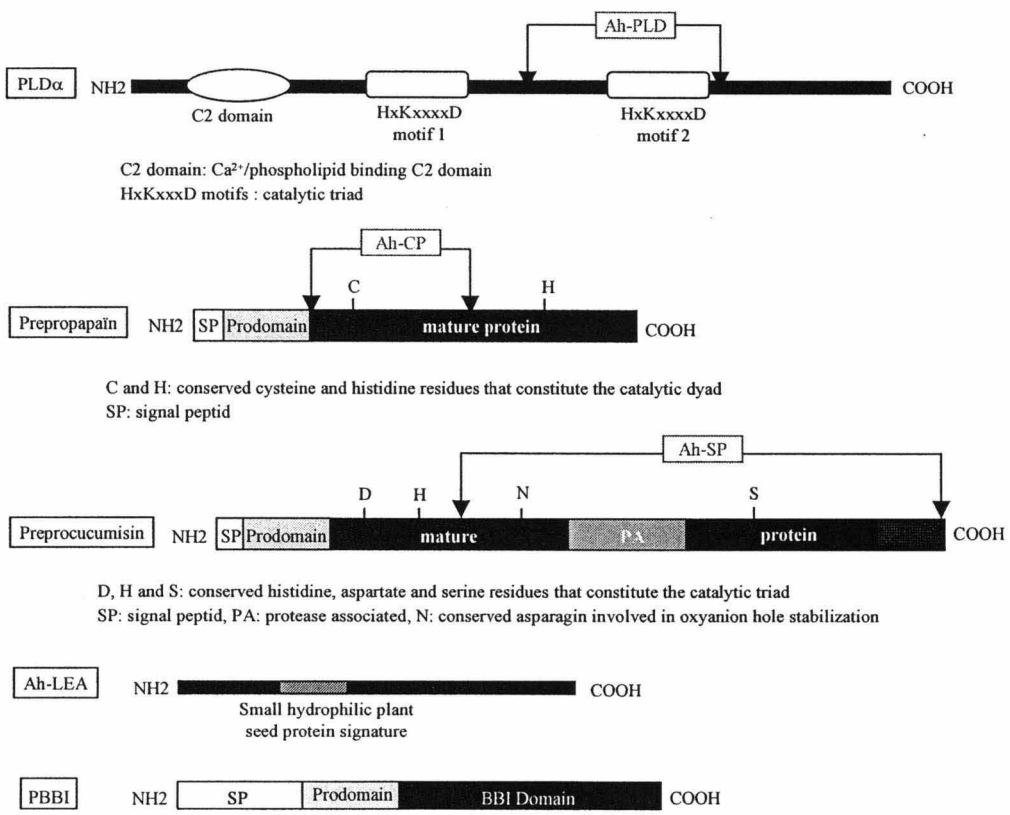


Figure 4 : Représentation schématique des protéines entières correspondants aux gènes cibles et des fragments isolés dans les feuilles d'arachide. Ah-PLD, Ah-CP, Ah-SP, Ah-LEA et PBBI correspondent respectivement à *Arachis hypogaea* phospholipase Dα (289 aa), cystéine protéinase (77 aa), sérine protéinase (539 aa), late embryogenesis abundant protein (96 aa) et inhibiteur Bowman-Birk (107 aa).

2-2 Expression des gènes en réponse au déficit hydrique

Dans les feuilles d'arachide, les gènes *ah-pld*, *ah-cp* et *pbbi* sont surexprimés, le gène *ah-sp* est régulé négativement et le gène *ah-lea* est induit en réponse au déficit hydrique. La comparaison du

cultivar le plus sensible (73-30) avec le cultivar le plus tolérant à la sécheresse (Fleur 11) parmi les 4 étudiés a permis d'observer une réponse différentielle des gènes en fonction de l'intensité du déficit hydrique et du degré de tolérance à la sécheresse du cultivar (figures 5 et 6).

Le cv. Fleur 11 présente une accumulation maximale des transcrits *ah-pld* au stade S_2 tandis que chez le cv. 73-30, cette accumulation se produit précocement, au stade S_1. L'accumulation des transcrits *ah-cp* chez le cv. Fleur 11 est maintenue aux stades S_2 et S_3 avec une augmentation respective de 17,4% et 22,1% comparé aux plantes témoins. Chez le cv. 73-30, le niveau de ces transcrits reste faible sauf au stade S_2 avec 10,7% de plus que le niveau des transcrits des plantes témoins. L'accumulation maximale des transcrits *pbbi* est plus précoce (stade S_1) chez le cv. Fleur 11 que chez le cv. 73-30 (stade S_2). De plus, chez ce cultivar, le niveau général des transcrits est beaucoup plus important que chez le cv. 73-30, quelque soit le stade de sécheresse considéré. Par exemple, au stade S_1, il y a 97,9% de transcrits *pbbi* en moins chez le cv. 73-30 par rapport au cv. Fleur 11. Chez les deux cultivars, l'expression du gène *ah-sp* diminue avec l'intensité du déficit hydrique et ce d'autant plus que le cultivar est tolérant à la sécheresse : au stade S_1, baisse de 32% chez le cv. Fleur 11 contre 8,6% chez le cv. 73-30 comparée aux plantes témoins est observée. Chez le cv. Fleur 11, les transcrits *ah-lea* s'accumulent fortement en S_2 tandis que chez le cv. 73-30, l'accumulation est constante durant le déficit hydrique.

24h après la réhydratation, l'expression des gènes est rétablie après la dépression souvent observée au stade S_3 et parfois même à des niveaux supérieurs à ceux des plantes témoins, suggérant un endurcissement. L'expression du gène *ah-pld* est restaurée aussi bien chez le cv. 73-30 que le cv. Fleur 11 avec 31% et 10,4% de plus que les plantes témoins respectivement contrairement à l'expression du gène *ah-cp* qui est restaurée au niveau de celle du stade S_1 plutôt que du témoin. L'expression du gène *ah-sp* est fortement stimulée chez le cultivar tolérant (26,5% d'augmentation) tandis que chez le cultivar sensible 73-30, elle est diminuée de 25,8%. De même, seul le cv. Fleur 11 accumule les transcrits *pbbi* à un niveau supérieur à celui des plantes témoins. Contrairement à tous les autres gènes, aucun transcrit visible du gène *ah-lea* n'est observé chez le cultivar tolérant alors qu'ils s'accumulent encore chez le cultivar sensible.

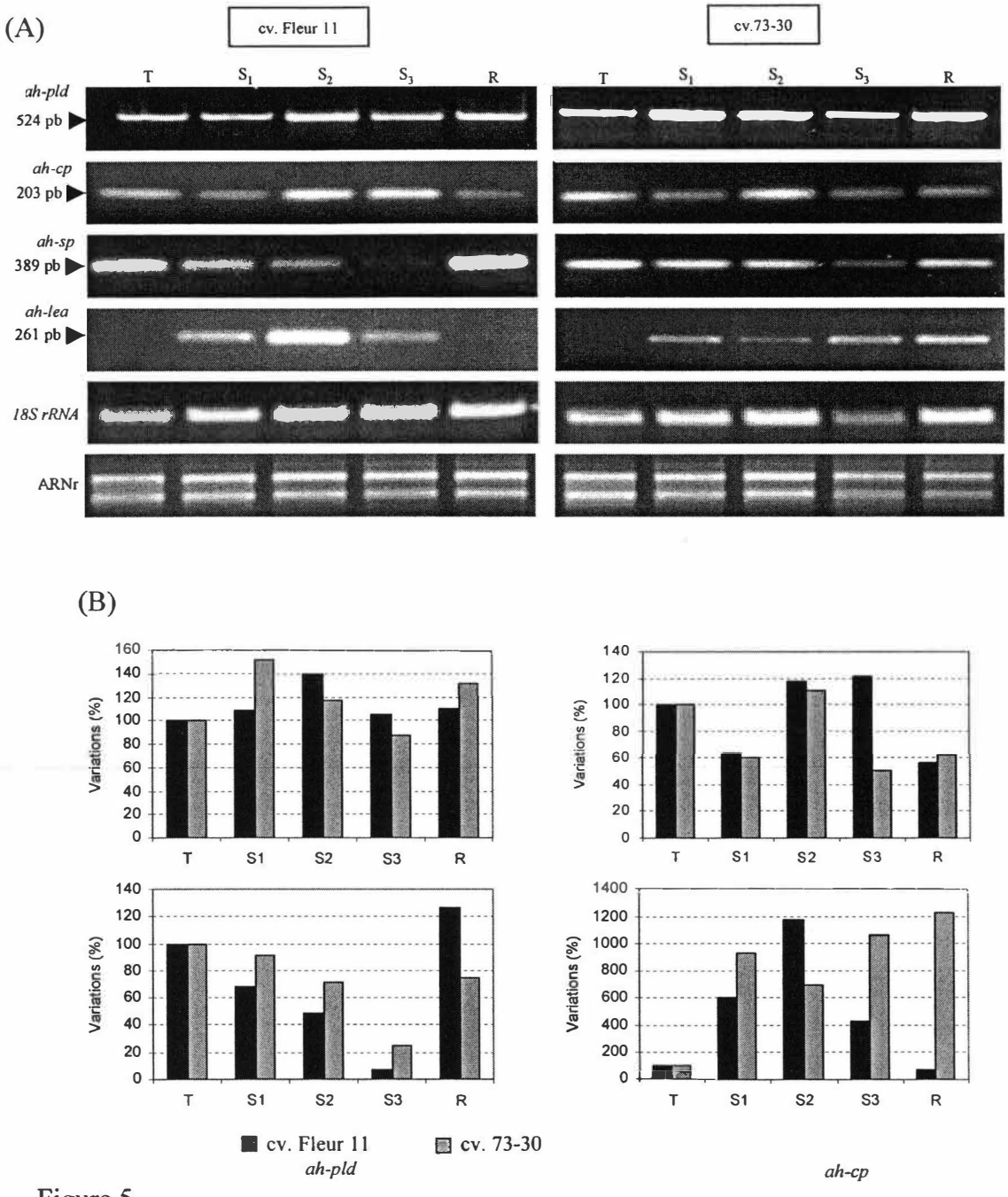


Figure 5

Expression des gènes *ah-pld*, *ah-cp*, *ah-sp*, *ah-lea* et *18S rRNA* en réponse à différents stades de déficit hydrique. (A) Profils obtenues par RT-PCR. (B) Semi-quantification du niveau d'accumulation des transcrits des différents gènes. T (témoin) : $ø_w$ = -0,25 MPa ; S_1 (sécheresse légère) : $ø_w$ = -1,5 MPa ; S_2 (sécheresse moyenne) : $ø_w$ = -2,5 MPa ; S_3 (sécheresse sévère) : $ø_w$ = -3,5 MPa ; R (réhydratation) : $ø_w$= -0,5 MPa. Ces profils sont représentatifs d'expériences indépendantes. L'homogénéité des échantillons est contrôlée par le dépôt des ARN ribosomaux (300 ng).

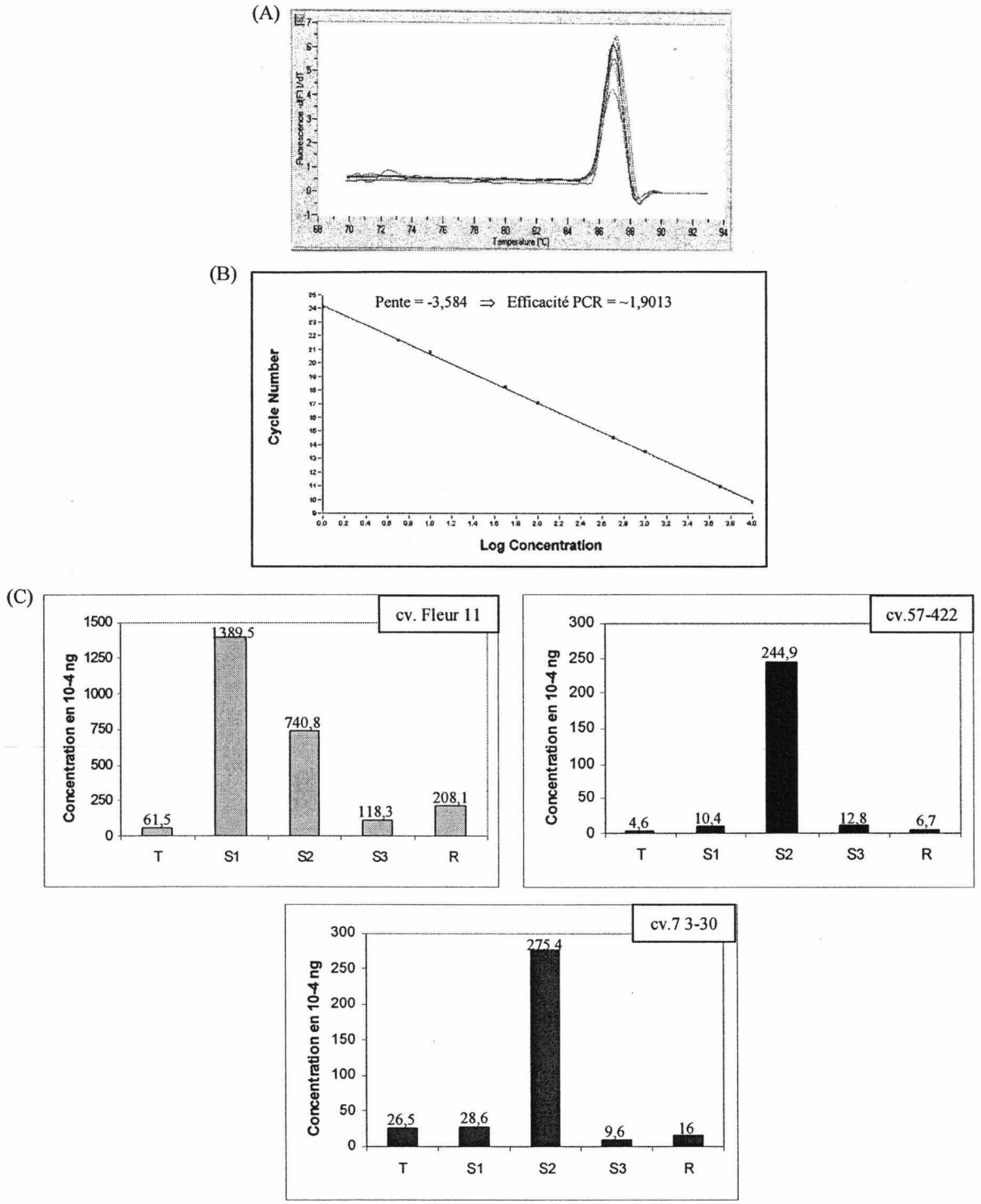


Figure 6 Etude par PCR en temps réel de l'expression du gène *pbbi* en réponse à différents stades de déficit hydrique. (A) Courbe de fusion identifiant les amplicons. (B) Courbe standard représentant la dérivée de la concentration des dilutions successives par rapport au nombre de cycles au Ct. (C) Représentation graphique de la concentration de transcrits *pbbi* corrigée par rapport au gène standard (actine) à chaque stade de sécheresse. T (témoin) : ψ_w = -0,25 MPa ; S_1 (sécheresse légère) : ψ_w = -1,5 MPa ; S_2(s écheresse moyenne) : ψ_w = -2,5 MPa ; S_3 (sécheresse sévère) : ψ_w = -3,5 MPa ; R (réhydratation) : ψ_w = -0,5 MPa. Ces profils sont représentatifs d'expériences indépendantes.

2-3 Production de la protéine PBBI et immunodétection

L'analyse plus poussée de l'ADNc *pbbi* a permis la production de la protéine correspondante dans *Escherichia coli* sous forme de protéine de fusion avec la glutathione S-transférase (GST). Les premiers essais avec des vecteurs « His-tag » n'avaient pas permis l'obtention de la protéine d'intérêt. La bactérie n'a pas pu produire la protéine probablement du fait de sa conformation complexe : nombreux ponts disulfures et structure en boucles (Fig. 7) à moins qu'elle n'ait été produite puis détruite. Cette hydrolyse peut résulter d'une mauvaise conformation ou d'une éventuelle toxicité de la protéine pour l'hôte bactérien.

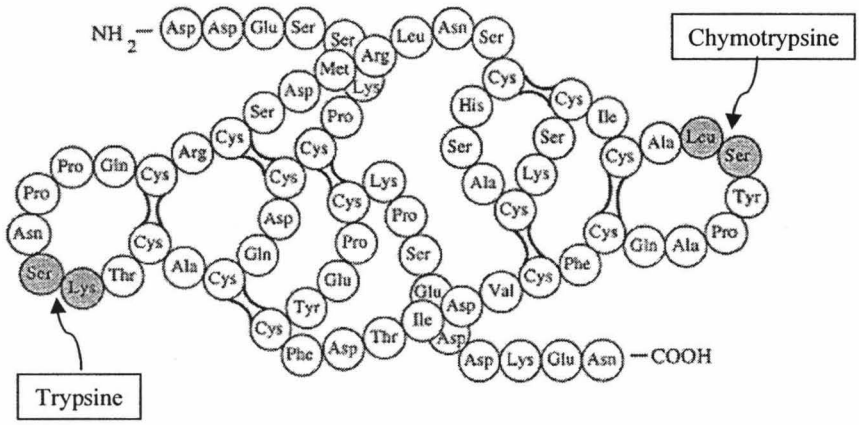


Figure 7: Structure primaire de la BBI de soja. Les ponts disulfures sont matérialisés par les traits entre les résidus cystéine. Les sites inhibiteurs (P1-P1') sont représentés par les acides aminés grisés. Dans le site inhibiteur trypsine, P1 = lysine et P1' = sérine. Dans le site inhibiteur chymotrypsine, P1 = leucine et P1' = sérine.

La protéine d'intérêt (PBBI) fusionnée à la glutathione S-transférase (GST) est protégée d'une éventuelle protéolyse. Avec ce système, une protéine surexprimée de ~39 kDa a été obtenue, correspondant à la masse calculée de PBBI (11,5 kDa) plus celle de la GST (27-29 kDa) comme le montre l'électrophorèse des protéines bactériennes totales (Fig. 8.

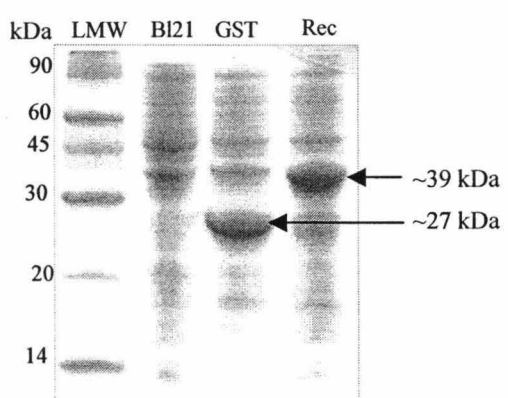


Figure 8: Production de la protéine de fusion PBBI/GST. Electrophorèse des protéines bactériennes totales (15µg). LMW : marqueur de taille (kDa), *low molecular weight* (Amersham) ; Bl21 : protéines issues de bactéries non transformées, sauvages ; GST : protéines issues de bactéries transformées avec le plasmide non recombinant ; Rec : protéines issues de bactéries transformées avec le plasmide recombinant (pGEX-6-P1/*pbbi*).

La protéine de fusion PBBI/GST qui est insoluble a été solubilisée dans un tampon dénaturant contenant de l'urée 8M.

Des anticorps dirigés contre la protéine fusionnée (PBBI/GST) ont été produits dans des lapins. Les protéines de la fraction solubilisée dans l'urée 8M ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE et la bande protéique correspondant à la protéine PBBI/GST (~39 kDa) a été découpée et utilisée comme antigène. Des analyses dot blot effectuées avec de la GST recombinante purifiée et de la BBI de soja commerciale ont montré la présence d'anticorps dirigés contre la BBI et la GST dans le sérum obtenu. Ces anticorps polyclonaux, bien que peu spécifiques, ont permis la détection d'une protéine de taille apparente ~28 kDa dans les extraits bruts de feuilles. Cette protéine a une masse correspondant quasiment au double de la masse calculée de la protéine PBBI (11,5 kDa). Il pourrait s'agir d'un dimère de BBI vu que ces inhibiteurs ont tendance à se dimériser en solution (Kumar *et al.*, 2004)

2-4 Transformation in planta des plants d'Arabidopsis thaliana

Dans le but d'étudier *in vivo* le rôle physiologique de *pbbi*, des plants d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformés par transgenèse *in planta* avec une construction génique portant l'ADNc *pbbi.* Deux constructions ont été réalisées, l'une avec *pbbi* en orientation sens qui devrait permettre aux plantes transformées de surexprimer le transgène et l'autre avec *pbbi* en orientation sens et antisens qui devrait entraîner l'extinction du gène par formation d'un duplex ARN (ARNdb, *hairpin*).

La construction sens a été introduite dans *Arabidopsis thaliana*. Le développement des plantes a été mené jusqu'à maturité des siliques. Les graines de chaque plante ont été récoltées séparément et une partie a été criblée pour la sélection de transformants résistants au BASTA® (glufosinate d'ammonium). Les plantules apparemment résistantes ont été repiquées et sont en cours d'analyse. Les graines des générations successives seront sélectionnées à nouveau jusqu'à l'obtention d'une population homozygote. L'étude du rôle *in vivo* du gène correspondant à l'ADNc *pbbi* en réponse au déficit hydrique pourra être entreprise

3- Discussion

Au cours du déficit hydrique expérimental, même sévère, aucune chute de feuilles ni jaunissement n'ont été observés chez les plantes, quelque soit le cultivar considéré. Ce maintien de la chlorophylle rappelle le caractère « stay-green » qui, chez le sorgho, est considéré comme une forme d'adaptation à la sécheresse et confère la résistance à une sénescence précoce induite par le déficit hydrique (Sanchez *et al.*, 2002). Dans nos conditions expérimentales, les cultivars d'arachide peuvent supporter des niveaux de déshydratation correspondant à des ψ_w de -3,5 MPa. De plus, quelques heures après la réhydratation, les plantes « reprennent » (reverdissent) et leur ψ_w augmente progressivement jusqu'à atteindre des valeurs similaires à celles des plantes témoins. Le métabolisme se réajuste et les plantes poursuivent leur cycle de développement ce qui suggère

qu'elles n'ont pas encore atteint leur potentiel hydrique létal *i.e.* le potentiel hydrique le plus bas enduré par la dernière feuille viable (Turner *et al.,* 2001).

Sur la base des homologies de séquences, des fonctions putatives ont été attribuées aux ADNc identifiés chez l'arachide. Il est probable que pour surmonter le déficit hydrique, l'arachide accumule les transcrits de PLDα afin de réduire les pertes d'eau puisque la PLDα joue un rôle dans la fermeture des stomates et la régulation du statut hydrique de la plante chez *Arabidopsis thaliana* (Sang *et al.*, 2001). L'accumulation précoce des transcrits PLDα chez le cv. 73-30 pourrait donc contribuer au maintien d'un statut hydrique élevé d'autant plus que ce cultivar présente un contenu relatif en eau (CRE) élevé lié à la fermeture rapide des stomates en condition de déficit hydrique (Clavel *et al.*, 2005). Elle pourrait également expliquer la dégradation importante des lipides membranaires observée chez ce cultivar (Lauriano *et al.*, 2000). Chez le niébé, l'activité des PLD a été démontrée comme étant directement impliquée dans la dégradation des lipides membranaires induite par le déficit hydrique (Monteiro de Paula *et al.*, 1993 ; El Maarouf *et al.*, 1999).

L'ADNc *ah-cp* code un fragment de protéine de 77 acide aminés identique à 90% à la MCP (*membrane-associated cysteine protease*), une cystéine protéase isolée chez *Vigna mungo* (Okamoto *et al.*, 2001). La MCP serait impliquée dans la dégradation des protéines de réserve et la maturation post-traductionnelle de pro-SH-EP, une autre cystéine protéase responsable de la dégradation des protéines de réserve des cotylédons (Okamoto *et al.*, 2001). Par analogie, chez l'arachide, Ah-CP pourrait être impliqué dans la mobilisation des acides aminés des protéines de réserve directement ou indirectement par la maturation d'autres enzymes afin de surmonter le déficit en nutriments induite l'inhibition de la photosynthèse due au manque d'eau.

A notre connaissance, aucune des subtilisines caractérisées jusque là n'a été associée à la réponse au déficit hydrique. C'est donc la première fois que l'expression d'une sérine protéase est étudiée en condition de sécheresse au niveau moléculaire. Chez l'arachide, l'expression du gène de la subtilisine (*ah-sp*) diminue d'autant plus que le déficit hydrique s'intensifie, et ceci contrairement à *ah-cp* qui est surexprimée. La subtilisine Ah-SP ne semble donc pas impliquée dans la mobilisation des acides aminés. Chez le haricot, l'activité enzymatique d'une sérine protéinase qui diminue chez le cultivar le plus tolérant à la sécheresse est est impliquée dans la protection contre une sénescence prématurée induite par la sécheresse (Hieng *et al.*, 2004). Or, chez l'arachide, les résultats ont montré également que la baisse d'expression de *ah-sp* est plus importante chez le cultivar tolérant (Fleur 11) que chez le cultivar sensible 73-30. Ce résultat est en accord avec les précédents d'où une implication de Ah-SP dans la protection contre la sénescence induite par la sécheresse.

Chez certaines plantes le stress hydrique induit l'accumulation de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) qui protégent les cellules contre les effets délétères du déficit hydrique. La dessiccation totale est létale et les protéines LEA pourraient permettre le maintien du minimum d'eau cellulaire requis pour la survie (Dure, 1997 ; Ingram et Bartels, 1996). Dans les feuilles d'arachide, l'expression de *ah-lea* est fortement induite par le déficit hydrique et de façon plus importante chez le

cultivar tolérant que chez le cultivar sensible. Cette accumulation des transcrits *ah-lea* pourrait protéger les molécules et les membranes des dommages causés par les faibles potentiels hydriques et être associée au mécanisme d'acquisition de la tolérance. Etant donné que les plants de riz transgéniques exprimant une protéine LEA d'orge (HVA1) ont une meilleure tolérance au déficit hydrique et à la salinité (Xu *et al.*, 1996 ; Chandra Babu *et al.*, 2004).

L'activation des inhibiteurs de protéases contribue à la régulation des protéases endogènes pour éviter une protéolyse accrue pouvant menacer la survie de la plante (Diop *et al.*, 2004). La stimulation de l'expression de *pbbi* dans les feuilles d'arachide soumis à un déficit hydrique pourrait contribuer à la réduction des activités protéolytiques stimulées par le stress hydrique (Roy-Macauley *et al.*, 1992) et parallèlement retarder la sénescence foliaire induite par la contrainte hydrique (Ilami *et al.*, 1997). Il est également possible qu'ils servent de protéines de réserve, comme c'est le cas au cours de la germination (Wilson, 1988) pour pallier le manque de nutriments lié à l'inhibition de la photosynthèse en réponse au déficit hydrique.

4- Conclusion

La stratégie adoptée au cours de ce travail est de caractériser et d'étudier des gènes de fonctions connues et de relier les réponses moléculaires aux réponses agro-physiologiques, Les données nouvelles obtenues ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes adaptatifs de l'arachide en terme de tolérance à la sécheresse ; Cette démarche constitue une étape clé pour une sélection variétale efficace. La disponibilité des techniques de transgenèse chez l'arachide rend possible l'intégration de gènes d'intérêt identifiés dans les variétés à améliorer. Par ailleurs, la comparaison de cultivars présentant différents degrés de tolérance à la sécheresse a permis d'observer une réponse différentielle des gènes en fonction de l'intensité du déficit hydrique et du degré de tolérance à la sécheresse du cultivar. Comparé au cultivar sensible (cv. 73-30), le cv. Fleur 11 semble mieux équilibrer l'expression des gènes codant des protéines hydrolytiques (PLD et CP) et accumule abondamment les transcrits de gènes protecteurs (protéine LEA et inhibiteur BBI). Cette stratégie pourrait correspondre à des caractères de tolérance moléculaire au déficit hydrique. Ceux ci pourraient expliquer la forte tolérance à la sécheresse de ce cultivar, définie sur la base de caractères agronomiques et physiologiques.

Les différentes réponses physiologiques, agronomiques, morphologiques et moléculaires ont permis d'établir un profil général des cultivars permettant ainsi d'avoir une vue globale des différents mécanismes d'adaptation mis en place par l'arachide pour surmonter la contrainte hydrique (tableau 1) . Les résultats montrent que la variété Fleur 11 présente les meilleurs scores pour la plupart des 17 paramètres testés. La pertinence d'un paramètre permet donc de le proposer comme marqueur pour le criblage de géniteurs dans les programmes d'amélioration classique et le gène impliqué et cloné comme transgène pour l'amélioration biotechnologique de l'arachide par stratégie sens , antisens ou utilisation des RNAi.

Ainsi, l'utilisation d'outils moléculaires a permis de confirmer les caractéristiques physiologiques et agronomiques des cultivars étudiés. Ceci permet d'envisager l'évaluation des capacités de tolérance à la sécheresse de nouvelles variétés d'arachide par des tests moléculaires qui ont l'avantage d'être rapides et précoces. La confirmation du rôle adaptatif des protéines codées par les différents ADNc identifiés dans la réponse de l'arachide à la sécheresse devra être entreprise par des tests enzymatiques immunologiques et par transgenèse. Leurs propriétés antifongiques pourront être testées sur *Aspergillus flavus* dans le but de l'amélioration de la résistance hôte chez l'arachide.

Tableau 1 : Profil des cultivars sensible (cv. 73-30) et tolérant (cv. Fleur 11) à la sécheresse. Bilan des caractères agronomiques, physiologiques et moléculaires en considérant leurs valeurs absolues en condition de déficit hydrique. + : niveau de tolérance pour le caractère étudié, nd : non déterminé. PLm : phospholipides membranaires

	cv. Fleur 11	cv. 57-422	cv. 73-30
Paramètres agronomiques			
Production (rendement en gousses)	+++	++	+
Biomasse aérienne (fanes)	+++	+++	++
Maturité des graines	+	nd	++
Paramètres morphologiques			
Densité du feuillage	++	++	+
Enroulement des feuilles	++	++	++
Paramètres physiologiques			
Baisse du potentiel hydrique (rapidité)	++	+++	+
CRE (contenu relatif en eau) [1]	+	+	++
Photosynthèse[2]	nd	++	+
Transpiration[2]	nd	++	+
Conductance stomatique[2]	nd	+++	+
Résistance protoplasmique[1]	++	++	+
Paramètres moléculaires			
Activation phospholipase D (dégradation PLm et signalisation)	++	++	++ (précoce)
Activation cystéine protéinase (mobilisation des assimilas)	++	+++	++ (moins durable)
Répression sérine protéinase (régulation de la sénescence)	+++	+	++
Activation protéines LEA (protection, maintien molécules H_2O)	++ (transitoire)	++ (précoce, transitoire)	+ (continue)
Activation inhibiteurs BBI (régulation de la protéolyse)	+++	+	++

[1] Source, Clavel *et al.*, 2005.

[2] Source, Lauriano *et al.*, 2004

II- Formation et publications

1 - Thèse de Doctorat

Nani Khady DRAME Université Paris XII, Ecole Doctorale SIMME

« Réponses adaptatives de l'arachide aux contraintes environnementales : Caractérisation d'un nouvel inhibiteur de sérine protéase »Soutenue le 16 décembre 2005.

2 - Articles

1 - Analysis of early responses to drought associated with field drought adaptation in four sahelian groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. Clavel D., Dramé K.N., Roy-Macauley H., Braconnier S., Laffray D. *Environmental and Experimental Botany* 54 (3) : 219-230. Novembre 2005.

2 - Adaptation à la sécheresse et création variétale : le cas de l'arachide en zone sahélienne. Clavel D., Dramé K.N., Diop N.N., Zuily-Fodil Y. OCL 12 (3) : 248-260. Mars-Avril 2005.

3 - Water deficit induces variation in expression of stress responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars differing in their tolerance to drought. Dramé K.N, Clavel D., Cruz de Carvalho M.H., Passaquet C., Zuily-Fodil Y. Accepté à *Plant Science* sous réserve de modifications.

3 – Congrès Internationaux

** Communications affichées*

1 - Water deficit regulates stress-responsive genes in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. Dramé K.N., Clavel D.C., Passaquet C., Zuily-Fodil Y. XVII^{e} Congrès International de Botanique, Vienne (Autriche) 17-23 Juillet 2005.

2 - Isolation and characterization of a novel protease inhibitor overexpressed by water deficit in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. Dramé K.N., Passaquet C., Repellin A., Zuily-Fodil Y. Conférence Internationale Interdrought-II 'Integrated approaches to sustain and improve plant production under drought-stress', Rome (Italie) 24-28 Septembre 2005.

** Communication orale*

Outils moléculaires pour l'étude de l'adaptation à la sécheresse chez l'arachide. Clavel D., Dramé K.N., Diop N.N., Zuily-Fodil Y. VIII^{e} Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies, Amélioration des plantes et Sécurité alimentaire « Biotechnologies Végétales : Valorisation pour une agriculture durable ». Marrakech (Maroc) 7-9 Octobre 2002.

Bibliographie

Bhatnagar, D., Cotty, P.J. and Cleveland, T.E. (1993) Preharvest aflatoxin contamination: Molecular strategies for its control. In: Food Flavour and Safety: Molecular Analysis and Design. A. M. Spanier, N. Okai, and M. Tamura, eds. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 272-292.

Bhatnagar D., Cleveland T.E., Brown R.L., Cary J.W., Yu J., Chang P.K. (1998) Preharvest aflatoxin contamination: elimination through biotechnology. In: Ecological agriculture and sustainable development, Dhaliwal G.S. eds. Vol 1, New Delhi, India, pp. 100-129.

Blankenship P. D., Cole R. J., Sanders T. H., Hill R. A. (1984) Effect of geocarposphere temperature on pre-harvest colonization of drought stressed peanuts by *A. flavus* and subsequent aflatoxin contamination. *Mycopathologia* 85: 69-74.

CERAAS (2003) Rapport d'activités, pp. 15-24.

Chandra Babu R., Zhang J., Blum A., David Ho T.-H., Wu R., Nguyen H.T. 2004. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* 166 (4): 855-862.

Chen Z.Y., Brown R.L., Damann K.E., Cleveland T.E. (2002) Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology* 92 (10): 1084-1094.

Clavel D., Dramé K.N., Roy-Macauley H., Braconnier S., Laffray D. (2005) Analysis of early responses to drought associated with field drought adaptation in four Sahelian groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 54: 219-230.

Cleveland T.E., Yu J., Bhatnagar D., Chen Z.Y., Brown R.L., Chang P.K., Cary J.W. (2004) Progress in elucidating the molecular basis of the host plant-*Aspergillus flavus* interaction, a basis for devising strategies to reduce aflatoxin contamination in crops. *Toxin Reviews* 23 (2-3): 345-380.

Close T.J. (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* 97: 795-803.

Diener U.L., Cole R.J., Sanders T.H., Payne G.A., Lee L.S, Klich M.A. (1987) Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 25: 249-270.

Diop N.N., Kidric M., Repellin A., Gareil M., d'Arcy Lameta A., Pham-Thi A.T., Zuily-Fodil Y. (2004) A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Letters* 577: 545-550.

Dorner J.W., Cole R.J., Blankenship P.D. (1998) Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts. *Biological control* 12: 171-176.

Dorner J.W., Cole R.J. (2002) Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of stored products Research* 38 (4): 329-339.

Downing W.L., Mauxion F., Fauvarque M.O., Reviron M.P., de Vienne D., Vartanian N., Giraudat J. (1992) A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *Plant Journal* 2(5): 685-693.

Dure L. (1997) Lea proteins and the desiccation tolerance of seeds. In: Cellular and molecular biology of plant seed development. B.A Larkins and I.K Vasil eds. Kluwer Academic publishers. pp 525-543.

El Maarouf H., Zuily-Fodil Y., Gareil M., d'Arcy-Lameta A., Pham Thi A.T. (1999) Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L.Walp differing in their drought tolerance. *Plant Molecular Biology* 39: 1257-1265.

Guo B.Z., Yu J., Holbrook C.C., Lee R.D., Lynch R.E. (2003) Application of differential display RT-PCR and EST/microarray technologies to the analysis of gene expression in response to drought stress and elimination of aflatoxin contamination in corn and peanut. *Toxin Reviews* 22 (2-3): 287-312.

Holbrook C.C, Kvien C.K., Rucker K.S., Wilson D.M., Hook J.E., Matheron M.E. (2000) Preharvest aflatoxin contamination in drought-tolerant and drought intolerant peanut genotypes. *Peanut Science* 27 (2): 45-48.

Ilami G., Nespoulous C., Huet J.C., Vartanian N., Pernollet J.C. (1997) Characterization of BnD22, a drought-induced protein expressed in *Brassica napus* leaves. *Phytochemistry* 45 (1): 1-8.

Ingram J., Bartels D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.

Jain A.K., Basha S.M., Holbrook C.C. (2001) Identification of drought-responsive transcripts in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 4 (2).
[http://www.ejb.org/content/vol4/issue2/full/2]

Kang S.G., Choi J.H., Suh S.G. (2002) A leaf-specific 27 kDa protein of potato Kunitz-type proteinase inhibitor is induced in response to abscisic acid, ethylene, methyl jasmonate, and water deficit. *Molecules and Cells* 13 (1): 144-147.

Keenan J.I., Savage G.P. (1994) Mycotoxins in groundnuts, with special reference to aflatoxin. In: The groundnut crop, a scientific basis for improvement. Edited by J. Smart, Chapman & Hall, London pp. 509-551.

Kumar P., Appu Rao A.G., Hariharaputran S., Chandra N., Gowda L.R. (2004) Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (29): 30425-30432.

Lauriano J.A, Lidon F.C., Carvalho C.A., Campos P.S., Do Ceu Matos M. (2000) Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 38: 7-12.

Lauriano J.A., Ramalho J.C., Lidon F.C., do Céu Matos M. (2004) Peanut photosynthesis under drought and re-watering. *Photosynthetica* 42 (1): 37-41.

Luo M., Liang X. Q., Dang P., Holbrook C.C., Bausher M.G., Lee R.D., Guo B.Z. (2005) Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Science* 169: 695-703.

Mehan V.K., Ba A., Reanard J.L. (1989) Evaluation of groundnut genotypes for field resistance to seed infection by *Aspergillus flavus* and to aflatoxin contamination. Reports from IRHO, May 1988-April 1989.

Mehan V.K., Ba A., Mc Donald D., Renard J.L., Rao R.C.N., Jauyanthi S. (1991) Field screening of groundnut for resistance to seed infection by *Aspergillus flavus*. *Oléagineux* 46 (3): 109-115.

Monteiro de Paula F., Pham Thi A.T., Zuily-Fodil Y., Ferrari-Iliou R., Vieira da Silva J., Mazliak P. (1993) Effects of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 707-715.

Okamoto T., Toyooka K., Minamikawa T. (2001) Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 742-751.

Roy-Macauley H., Zuily-Fodil Y., Kidric M., Pham Thi A.T., Vieira Da Silva J.B. (1992) Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiologia Plantarum* 85: 90-96.

Sanchez A.C., Subudhi P.K., Rosenow D.T., Nguyen H.T (2002) Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Molecular Biology* 48 (5-6): 713-726.

Sang Y., Zheng S., Li W., Huang B., Wang X. (2001) Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dα. *The Plant Journal* 28: 135-144.

Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.M. (2001) Adaptation of grain legumes (Pulses) to water-limited environments. *Advances in Agronomy* 71: 193-232.

Waliyar F., Ba A., Hassan H., Boukongou S., Bosc J.P. (1994) Sources of resistance to *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in groundnut genotypes in west Africa. *Plant Disease* 78 (7): 704-708.

Wilson K.A. (1988) The proteolysis of trypsin inhibitors in legume seeds. *Critical Reviews in Biotechnology* 8 (3): 197-216.

Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.D., Wu R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* 110: 249-257.

RAPPORT DE L'EQUIPE IER/ICRISAT
(Partenaire N° 4)

NOVEMBRE 2004-OCTOBRE 2005

B. DIARRA
O. KODJO
A. TRAORE
F. WALIYAR

1. Work package 1 : " Physiological processes of pre-harvest contamination "

1.1 Etablissement des relations entre caractères variétaux, conditions environnementales et résistance à l'infestation

Introduction

La contamination de l'arachide par l'aflatoxine est l'une des principales contraintes de la production arachidière. Elle constitue également un risque important pour la santé des consommateurs. Dans le but de lutter contre ce fléau, le Programme Pathologie Arachide de l'ICRISAT en collaboration avec l'IER, dans le cadre du projet INCO, a conduit des essais sur la gestion intégrée des aflatoxines et la résistance génétique des variétés d'arachide a l'infestation par *Aspergillus flavus.*

1.1.1 Essai Régional de Criblage des variétés d'arachide pour la résistance à l'aflatoxine:

Un essai régional de 4 variétés (55-437, Fleur11, ICG 6101 et ICG 7) a été conduit en station au Niger (Sadoré) et au Sénégal. Le dispositif expérimental était le bloc complètement randomisé (RCBD) en 3 répétitions. Les parcelles élémentaires étaient de 4 lignes de 4 en 3 répétitions. Les espacements étaient de 10 cm sur la ligne et 50 cm entre les lignes.

1.1.1.1 Résultats et commentaires:

- **Niger (Sadoré)**:

- **Résultats** (voir tableau 1)**:**

Tableau 1 : Essai régional de criblage des variétés d'arachide pour la résistance à l'aflatoxine, Sadoré, Niger, 2004.

Variété	Aflatoxine(ppb)	% Graines contaminées par *A. flavus*	Rendements des gousses (t/ha)	Rendements des fanes (t/ha)
55-437	0.67	1.67	1.160	1.83
Fleur 11	52.57	47.00	1.118	1.67
ICG 6101	0.37	1.67	1.013	2.33
ICG 7	0.03	1.00	1.048	2.25
SEm(±)	0.909	0.903	0.1723	0.319
CV(%)	11.7	12.2	27.5	27.4
1. RCBD avec 3 répétitions; parcelles élémentaires de 8 m^2.				

- Pourcentage de graines contaminées par l'*Aspergillus flavus*:

Les variétés ICG 7, ICG 6101 et 55-437 sont résistantes à la contamination des graines par l'*Aspergillus flavus* avec respectivement 1%, 2% et 2% contrairement à Fleur11 qui a enregistré 47% de graines contaminées.

- Aflatoxine:

De même, les teneurs en aflatoxine enregistrées chez les variétés ICG 7 (0.03 ppb), ICG 6101 (0.37 ppb) et 55-437(0.67) sont très faibles. Par contre une teneur plus élevée est observée chez JL 24 (52.57 ppb).

Rendement des gousses:

Aucune différence significative n'est obtenue entre les variétés en ce qui concerne les rendements des gousses (voir tableau 1).

Rendement des fanes:

Les variétés ICG 6101(2.33 t/ha) et ICG 7(2.25 t/ha) ont donné les meilleurs rendements en fanes contre 1.83 t/ha et 1.67 t/ha respectivement pour les variétés 55-437 et Fleur11.

- **Sénégal :**

- **Résultats** (voir tableau 2)

Tableau 2.: Essai régional de criblage des variétés d'arachide pour la résistance à l'aflatoxine, Sénégal, 2004.

Variété	Aflatoxine(ppb)
55-437	0.15
Fleur 11	11.27
ICG 6101	0.03
ICG 7	0.01
JL 24	7.92
SEm	0.855
CV(%)	38.2

- **Aflatoxine:**

Les variétés ICG 7, ICG 6101 et 55-437 ont donné des teneurs faibles en aflatoxine avec respectivement 0.01 ppb, 0.03 ppb et 0.15 ppb. Par contre les variétés JL 24 (7.92 ppb) et Fleur 11 (11.27 ppb) ont enregistré des teneurs plus élevées.

Les rendement des gousses et en fanes ont été donnés dans le rapport année 3 du CERAAS la meilleure variété sur ces critères a été Fleur **11.**

1.1.2 Multiplication des semences des germplasmes d'arachide:

1.1.2.1 En station à Samanko :

Certaines variétés d'arachide (ICG 6101, ICG 6222, 55-437, Fleur11et la 47-10) ont été multipliées en station à Samanko.

Tableau 3 : Multiplication à Samanko, Campagne 2004

Variétés	Poids des gousses (kg)
Fleur 11	116.1
55- 437	105.1
47-10	106.1
ICG 6222	11.1
ICG 6101	1.3

1.1.2.2 Milieu paysan :

8 variétés: ICG 6101, ICG 7, ICG 6222, ICGV 88274, ICGV 92093, 55-437, Fleur11 et la Locale du paysan ont été testées à Kolokani pour la résistance à la contamination des graines par l'*Aspergillus flavus* et à la production de l'aflatoxine dans les conditions naturelles. Dans chaque zone 10 paysans ont été choisis. Chez chaque paysan, 1/2 kg par variété constituait les parcelles élémentaires. Les semis ont été faits selon les pratiques paysannes. En général les semis ont été faits à la 3eme semaine de juillet 2004.

- **Résultats** (voir tableau 4)

- Pourcentage de graines contaminées par l'Aspergillus flavus:

Les variétés ICG 7, ICG 6101 et 55-437 ont été les plus résistantes avec 2% de contamination des graines. Ensuite viennent les variétés ICG 6222, ICGV 88274 et ICGV 92093 avec respectivement 4%, 8% et 9% de contamination. Par contre 47-10 et Fleur11 ont été sensibles avec 25% et 52% de contamination des graines.

- Aflatoxine:

Les faibles teneurs ont été enregistré chez ICG 7, ICG 6101, ICG 622, 55-437, ICGV 88274 et ICGV 92093 avec respectivement 0.36ppb, 0.86 ppb, 1.86 ppb, 1.02 ppb, 5.87 ppb et 6.71 ppb contrairement à 47-10 (16.95 ppb) et Fleur11 (92.49 ppb).

- Rendement des gousses:

Aucune différence significative n'est observée entre les rendements moyens des gousses.

- Rendement des fanes:

Une petite différence est obtenue entre les variétés. Les variétés ICG 6101 (1.146 t/ha), ICG 6222(1.127 t/ha), 55-437(1.071 t/ha), ICGV 88274(1.067 t/ha), ICGV 92093(1.065 t/ha) ont enregistré des rendements légèrement supérieurs à ceux de Fleur11 (0.978 t/ha), 47-10 (0.925 t/ha), et ICG 7 (0.891 t/ha).

- Choix des variétés:

- La variété ICG 7 a été choisi par 40% des paysans à cause sa grande productivité, la grosseur de ses graines, sa précocité, sa résistance à la sécheresse, sa teneur en huile et son bon goût. Ses graines sont bien appréciées par les acheteurs et elle fait gagner des sous. De même ses fanes sont appréciées par les animaux.
- La variété Fleur 11 est également appréciée par 40% des paysans pour sa précocité, sa productivité, son poids, sa tolérance à la sécheresse, son goût.
- La variété ICG 6101 est apprécié par 20% pour ses gousses qui sont tr-tétra graines, sa précocité, son goût et résiste un peu à la sécheresse. Elle produit beaucoup de fanes pour les animaux.
- La variété ICG 6222 est choisi par 10% des paysans pour la grandeur de
- ses gousses qui sont tri-tétra graines, son bon rendement, sa
- précocité, sa résistance à la sécheresse. Les fanes sont appréciées par
- les animaux.

Tableau 4 : Test de 8 variétés d'arachide en milieu paysan pour la résistance à 'aflatoxine, olokani, 2004[1]

Germplasme	% Graines contaminées par *A. flavus*	Aflatoxine (ppb)	Poids des gousses (t/ha^{-1})	Poids des fanes (t/ha^{-1})
ICG 6101	1.90	0.86	0.820	1.146
ICG 7	1.60	0.36	0.924	0.891
ICG 6222	4.10	1.86	0.815	1.127
ICGV 88274	8.41	5.87	0.722	1.067
ICGV 92093	8.97	6.71	0.859	1.065
55-437	1.80	1.02	0.926	1.071
Fleur 11	52.10	92.49	0.943	0.978
Locale (47-10)	25.00	16.95	0.865	0.925
SEm (±)	1.175	1.920	0.0635	0.0663
CV(%)	28.6	38.5	23.4	20.3
1. RCBD chez 10 répétitions (10 paysans), 0.5 kg par variété et par paysan				

Work package 4 : " Integrated crop management "

4.1. Activité 1. Recherche et caractérisation de souches d'actinomycètes inhibiteurs d'*Aspergillus flavus*

4.1.1 Matériel et méthodes

L'objectif de cette activité est de proposer des souches d'actinomycète pour lutter contre l'*Aspergillus flavus*.

Le matériel pour la campagne écoulée était composé de 978 échantillons de terre prélevés dans des champs de culture de l'arachide se trouvant dans la zone périurbaine de Bamako, et dans les principales zones de production de l'arachide du Mali. Les échantillons ont été récoltés en raison de 325 avant les semis, 326 pendant la floraison et 327 au moment des récoltes. Le matériel comprenait également des souches toxinogènes pures *d'Aspergillus flavus* isolés au laboratoire.

La détermination de la microflore contenue dans les échantillons à l'instar de la campagne précédente se fait par l'utilisation d'un milieu général de type Czapeck. Les incubations se font pendant 7 jours à la température de 36°C. L'isolement et la purification des souches d'actinomycètes observées sont faites par repiquages successifs sur des milieux de cultures spécifiques. Les souches pures d'actinomycète ainsi obtenues sont utilisées pour tester leur antagonisme vis à vis de l'*Aspergillus flavus*. Ce test se fait par la mesure de la zone d'inhibition de la croissance de *l'Aspergillus flavus* autour des carottes de l'actinomycète utilisé. Les critères utilisés pour l'identification partielle des souches d'actinomycète inhibitrices sont : la couleur du mycélium, la forme microscopique du mycélium, la taille de la zone d'inhibition, le comportement des molécules sécrétées sous UV, les solvants permettant leur extraction ainsi que les solvants de migration par chromatographies sur couche et sur colonne.

4.1.2 Résultats et commentaires.

4.1.2.1 Résultats :

18 nouvelles souches d'actinomycète inhibiteur de la croissance de l'*Aspergillus flavus* ont été isolées. Certaines caractéristiques de ces souches sont indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5: Caractéristiques des actinomycètes

Nom des Actinomycètes	CARACTERISTIQUES			
	Couleur	Comportement sous UV	Taille zone d'inhibition en cm	Solvant ayant permis l'extraction des composés actifs
Com1.12 07/0.5/03	grisâtre	-	2,4	Acide Acétique : Méthanol :Eau (90 :6 :4)
Com2 6 02/06/03	blanche	+	3	Acétone :Eau (95 :5)
Com53 14/0.8/03	blanchâtre	-	2	Chloroforme : Ethanol (90 :10)
Com,225 07/07/03	blanche	+	2,6	Chloroforme :Méthanol :Eau (85 :10 :5)
Son45 09/10/03	grisâtre	-	2,8	Hexane :Ethanol :Eau (90 :7 :3)
Sot 28. C6.02/03	grisâtre	+	1,9	Acide Acétique :Eau (90 :10)
LoF 24 12/05/03	Jaunâtre	+	2,3	Acétone :Eau (95 :5)
Lof 33 14 /05/03	Crème	+	3	Chloroforme :Méthanol :Eau (85 :10 :5)
Lou 54 15/05/03	Blanche	-	3,4	Acétone :Eau (90 :10)
Zan05 15/05/03	Grisâtre	-	2,7	Hexane:Méthanol :Eau (90 :8 :2)
Souk109 17/10/03	Rose	-	2,8	Chloroforme : Ethanol (90 :10)
Kim 208 14/06/03	Noire	+	3	Acétone : Acide Acétique Eau (90 :5 :5)
San184 23/09/04	Blanchâtre	+	3,5	Chloroforme :Acide Acétique :Eau(90 :4 :3)
Kit 143 11/08/04	Grise	+	3	Chloroforme : Méthanol : Eau (90 : 8 :2)
Kolo 178 30/09/04	Grisâtre	-	2,1	Hexane : Ethanol :Acide Mouravique (95 :3 :2)
Son 97 16/04/04	Chocolat	+	2	Hexane : Ethanol : Eau(95 : 4 :1)
Kat 60 18/06/04	Jaunâtre	-	1,9	Acétone :Eau :Acide Acétique(95 :5 :5)
Sot 210 27/08/04	Blanche	-	3,2	Hexane : Ethanol :Acide Mouravique (95 :3 :2)

4.1.2.2 Commentaires

A l'instar de la campagne précédente et malgré l'importance du nombre de souches d'actinomycète isolées, les tests d'inhibition effectués par la méthode des carottes décrites par plusieurs auteurs dont Berchtein et coll (1985) et Semenov et coll (1990) ont montré que seulement 32 maintenaient leur capacité d'inhiber la croissance de l'*Aspergillus flavus*. L'appartenance de ces souches au groupe des actinomycètes a été établie par la comparaison de leurs caractéristiques morphologiques avec celles des actinomycètes élaborées par plusieurs auteurs dont Fennel (1950), Egorova (1976) et Egorov (1979).

L'observation au microscope de ces souches et l'analyse du tableau 5 montrent que les mycéliums offrent une plus grande diversité dans les couleurs contrairement aux couleurs blanche et blanchâtre observées au cours des campagnes écoulées. Ces différentes colorations indiquent la diversité des métabolites sécrétés par les 18 souches caractérisées. En effet, ce sont les regroupements

moléculaires opérés en leur sein et provoqués par le changement de leur environnement électronique qui font que les métabolites en se diffusant dans le milieu de culture confèrent à celui ci des couleurs spécifiques. Cette constatation n'est cependant pas suffisante pour l'identification des souches, elle donne toutefois, des indications non exhaustives mais précieuses sur la nature des molécules constitutives des produits secrétés et leur diversité.

La taille des zones d'inhibition indiquées dans le tableau 5 combinée avec les couleurs observées permet également de penser qu'il s'agit de souches différentes. Cette hypothèse est renforcée, comme indiqué dans le même tableau, par la diversité des solvants d'extraction des métabolites sécrétés. La capacité des métabolites à absorber les rayons UV donne des indications sur la nature des solvants dont l'utilisation seul ou en combinaison peut permettre leur extraction.

La diversité des métabolites sécrétés est enfin renforcée par le fait que seulement la moitié des souches absorbent dans l'UV (tableau 5). L'analyse combinée des paramètres ci dessus indiqués montrent que les souches observées sont différentes

Les informations ci-dessus indiquées sont certes indispensables pour caractériser les souches d'actinomycète et leurs produits de sécrétion. Cependant, elles ne sont pas suffisantes, car, elles doivent comme l'ont indiqués plusieurs auteurs dont Hassan et coll (1987) et Mehan et coll (1988), être complétées par :

- l'utilisation des méthodes de taxonomie microbienne permettant d'identifier exactement l'actinomycète en question ;
- l'extraction, la détermination des propriétés chimiques, physiques et antimicrobiennes, toxiques... des molécules responsables de l'inhibition ;

L'exécution entière de ces 2 études nécessite l'utilisation de moyens non disponibles au Mali. Des contacts sont cependant en cours avec plusieurs partenaires pour les réaliser.

4.2. Activité 2. Suivi/évaluation sanitaire des stocks en milieu paysan

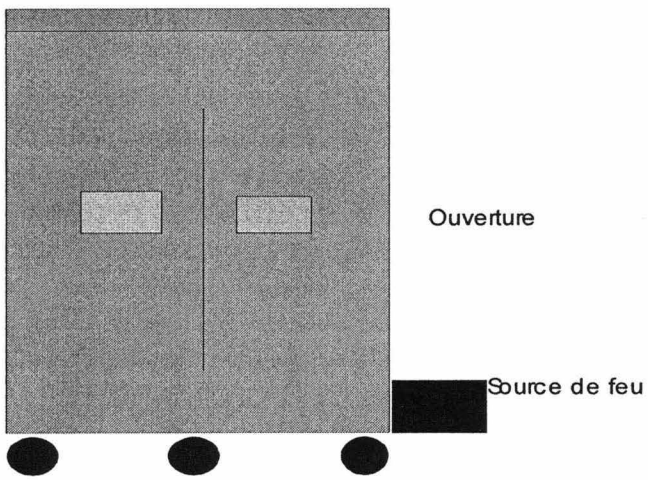
L'objectif de cette activité est de proposer des greniers pour la conservation des stocks villageois à la portée des paysans

4.2.1 Matériel et méthodes

Le matériel de cette opération est constitué de 4 greniers traditionnels améliorés (2 greniers 00 et 2 greniers 01) construits à Sotuba, de 24 échantillons d'arachide et 24 échantillons de maïs prélevés sur les stocks qu'ils contenaient. Ces greniers sont faits de briques de terre battue. Leurs coupes sont ci dessous indiquées. Ces 2 greniers sont testés depuis plusieurs années, La confirmation des leurs performances a nécessité l'exécution de cette activité pendant, la Campagne 2004. Celle-ci a consisté, a comparer leurs paramètres de stockage avec celles des greniers témoins construits sur la même aire.

- Le Grenier 00.

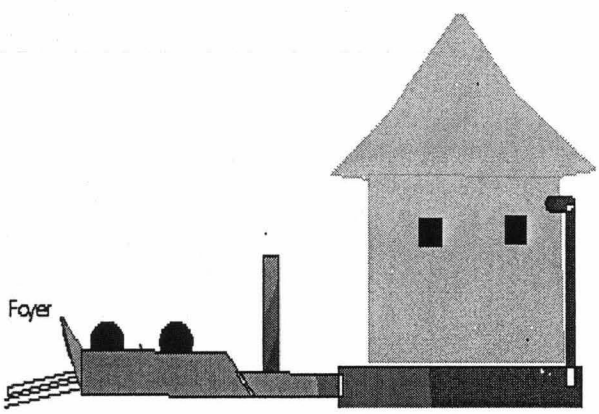
Schéma 1 : Coupe du Grenier 00



Le grenier traditionnel amélioré 00 dont la coupe est indiquée dans le Schema1 fonctionne suivant le principe d'élimination de l'oxygène par la fumée au cours de la combustion de plantes insecticides brûlées sur la braise placée dans la partie source de feu du grenier. De cette manière, à la difficulté des parasites de survivre dans un milieu pauvre en oxygène, s'ajouteraient des conditions très agressives créées par l'utilisation des plantes insecticides. En effet, la combustion de l'oxygène contenu dans le grenier a pour conséquence d'augmenter la quantité de gaz carbonique, d'oxyde de carbone. Elle réduit ainsi les possibilités de survie de parasites aérobies présents dans le stock. La combustion des plantes toxiques produit à son tour une fumée toxique pour les parasites. Le bon fonctionnement de ce grenier réduirait considérablement les risques de destruction et d'infestation des stocks respectivement par les parasites et l'*Aspergillus flavus*.

- Le Grenier 01

Schema 2 : Coupe du Grenier 01



La coupe du Grenier 01 est matérialisée par le Schéma 2. Il utilise pour son fonctionnement, la fumée et la chaleur dégagées du foyer (cuisine) à la suite de la combustion du bois de chauffe utilisé pour les préparations culinaires. Cette situation devrait créer une atmosphère agressive pour les parasites tout en améliorant les paramètres de séchage (humidité relative inférieure à 80%, températures comprises entre 37°c et 45°c) des stocks.

A l'installation des stocks dans les greniers et chaque 2 mois, l'état des greniers est caractérisé et des échantillons sont prélevés pour les besoins d'analyse au laboratoire afin d'évaluer l'état des stocks durant la conservation. Pour cela les paramètres suivants sont déterminés.

- analyse microbiologique

Chaque échantillon récolté est utilisé pour la détermination du taux d'infestation par l'*Aspergillus flavus*. Pour cela, la méthode de contamination naturelle suivante est utilisée : 20 gousses d'arachide et 40 graines de maïs sont agitées énergiquement dans de l'eau stérilisée. A la fin de cette période, les solutions obtenues sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide à base de bouillon de viande en raison de 3 boîtes par échantillon. Elles subissent ensuite, une incubation de 6 jours à la température de 36°C. A la fin de cette période, l'observation permet d'estimer le nombre de colonies d'*Aspergillus flavus* infestant l'échantillon.

- dosage de l'Aflatoxine B1

L'AFLATOXINE B1 EST DOSEE PAR LES METHODES ELISA ET CCM.

- conditions de conservation

Les conditions de conservation des produits sont également étudiées. Pour cela, les paramètres suivants sont déterminés :

- la température du stock ;
- la température à l'intérieur du grenier ;
- la température à l'extérieur du grenier ;
- l'humidité du stock ;
- l'humidité relative à l'intérieur du grenier ;
- l'état du grenier ;
- les parasites peuplant le stock ;
- l'état du stock ;

4.2.2 Résultats et commentaires

4.2.2.1 Résultats

Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux 6 et 7:

Tableau 6 : Evolution des caractéristiques des stocks d'arachide des greniers améliorés 00 traité, non traité

Type de grenier	Période des ob-tions	Paramètres déterminés				
		H-té en %	Taux *Asp. flavus* 10^3 sp / g	Taux d'Afla B1en ppb	Parasites dans 100 g de stock	Etat du stock
Grenier amélioré 00 traité	avril	7,70	1,3	5,10	0	1
	juin	7,80	3,40	6,10	0	1
	août	11,40	10,70	6,35	2	1
	octobre	11,25	10,60	6,45	3	1
	décembre	10,84	10,27	6,45	4	2
	février	10	9,50	6,45	6	3
Grenier amélioré 00 non traité	avril	7,70	1,3	4,10	0	1
	juin	12,90	28,70	6,70	16	4
	août	20,20	84,20	24,50	30	5
	octobre	25,40	125	413,40	44	5
	décembre	21,50	140,10	853,20	78	5
	février	19,20	205,13	1300	69	5

* Ce sont les gousses d'arachide qui sont testées.

- ob-tions (observations)
- H-té (humidité)
- *Asp. Flavus* (*Aspergillus flavus*)
- Afla B1 (Aflatoxine B1)
- ppb (partie par billion en Anglais ou partie par milliard en Français)
- Nbre (nombre)

L'état du stock est caractérisé selon de 1 à 5 selon les critères suivants :

- 1 très bon : moins de 5 % de graines ou de gousses attaquées, pas plus d'un parasite présent dans 100gr d'échantillon du stock;
- 2 état bon : moins de 10% de graines ou de gousses attaquées et pas plus de 2 parasites présents dans 100gr d'échantillon du stock;
- 3 état moyen : moins de 20% de graines ou de gousses attaquées, pas plus de 3 parasites présents dans 100gr d'échantillon prélevé sur le stock logé dans le grenier;
- 4 mauvais état : moins de 50% de graines ou de gousses attaquées, pas plus de 4

parasites présents dans 100gr du stock ;
- 5 très mauvais état : plus de 50% de graines ou de gousses attaquées, au moins 5 parasites présents dans 100gr d'échantillon ;

Tableau 7 : Evolution des caractéristiques des stocks d'arachide du greniers amélioré 01 traité et non traité

Type de grenier	Période des ob-tions	Paramètres déterminés				
		H-té en %	Taux *Asp. flavus* 10^3 sp / g	Taux d'Afla B1en ppb	Parasites dans 100 g de stock	Etat du stock
Grenier amélioré 01 traité	avril	7,70	1,3	5,10	0	1
	juin	7,80	3,40	6,10	0	1
	août	10,80	10,59	6,30	2	1
	octobre	10,90	10,54	6,38	3	1
	décembre	10,75	10,21	6,40	4	2
	février	10	9,43	6,40	6	3
Grenier amélioré 01 non traité	avril	7,70	1,3	4,10	0	1
	juin	11,40	27,23	6,70	14	4
	août	24,40	82,30	22,40	23	5
	octobre	23,60	122,14	410,60	42	5
	décembre	20,40	140	845,42	75	5
	février	17,74	205	1289,88	67	5

4.2.2.2 Commentaires

Durant cette campagne, 24 échantillons d'arachide prélevés sur les stocks logés dans les 4 greniers construits à Sotuba ont été analysés.
A l'instar des campagnes précédentes, l'analyse des résultats indiqués dans les tableaux 6 et 7 montre une diminution progressive d'août à janvier des taux d'humidité des stocks de gousses d'arachide logés dans tous les greniers. Ces résultats sont conformes à la réalité. En effet, selon plusieurs auteurs dont Pollet A. et coll 1992, Brudzynski A en 1987; pendant les années normales, dans les pays tropicaux situés au nord de l'Equateur, l'humidité est beaucoup plus forte en juillet qu'en septembre. Cette situation confirme également la corrélation établie par plusieurs auteurs dont Moreau. C en 1974 et Hao D. Y. Y en 1990 entre le taux d'humidité contenu dans un substrat stocké dans un milieu et l'humidité relative de celui ci. Enfin, le fait que le mode de fonctionnement du grenier 01 entraîne une diminution plus importante du taux d'humidité est confirmé

Les résultats obtenus confirment à l'instar de la campagne écoulée, l'augmentation de la quantité de spores d'*Aspergillus flavus* jusqu'en octobre suivie de sa diminution jusqu'en février dans tous les greniers. Ce phénomène s'explique par l'évolution du taux d'humidité dans les stocks en fonction des saisons. En outre, pour les stocks logés dans le grenier 00 non traité, la très forte augmentation du taux d'*Aspergillus flavus* est confirmée. Celle ci s'explique par l'existence de conditions optimales pour la prolifération des spores. Les résultats obtenus confirment également la faiblesse des taux d'*Aspergillus flavus* sont plus faibles dans le grenier 01,

Les quantités de parasites détectés dans les stocks sont plus faibles pour les stocks logés dans les greniers améliorés traités. Cette situation est liée à des faibles taux d'humidité constatés. Cette baisse est beaucoup plus prononcée pour le grenier 01

L'analyse des tableaux 6 et 7 permet de constater la faiblesse des quantités d'Aflatoxine B1 secrétées pendant le stockage dans les greniers améliorés traités. Cette baisse est liée à l'amélioration générale des conditions de conservation ainsi créée. En effet, le faible niveau de l'humidité et le bon état des stocks ainsi constatées sont défavorables à la prolifération de l'*Aspergillus flavus* et des parasites dont les actions sont à la base de la sécrétion de l'Aflatoxine B1. Ces résultats indiquent également des taux d'Aflatoxine B1 plus faibles dans le grenier 01.

4.3. Contrôle intégré de l'infestation par l'*Aspergillus flavus*

En station à Samé Kayes Mali.

A **Samé (Kayes Mali)**, un essai de gestion intégrée a été installé durant la campagne 2004. L'objectif de cet essai était de développer une gestion intégrée pour réduire la contamination de l'aflatoxine dans l'arachide dans les conditions naturelles. Le dispositif expérimental était le Bloc Randomisé à 4 facteurs avec 3 répétitions. Le 1er facteur était les variétés prises à 2 niveaux: 55-437 (variété résistante) et JL 24 (variété sensible). La chaux constituait le 2eme facteur avec 2 niveaux: sans chaux et avec chaux à la dose de 400 kg / ha appliquée au semis. Le Fumier composait le 3eme facteur à 2 niveaux: sans fumier et avec fumier. Le 4eme facteur était les résidus de cultures à 2 niveaux: sans résidus et avec résidus de cultures à la dose de 2.5 t/ha appliqués 50 jours après semis. Les parcelles élémentaires étaient de 16 m^2 (8 lignes de 4 m de longueur). Les graines étaient espacées de 10 cm et les lignes de 50 cm.

4.3.1 Pourcentage de graines contaminées par l'*Aspergillus flavus*

4.3.1.1 Résultats (voir tableau 8):

Tableau 8. L'effet de source de calcium et les résidus de culture sur la contamination de l'arachide par l'aflatoxine sous infestation naturelle, Station de Samé, Kayes, Mali, saison pluvieuse 2004.

		% Graines contaminées par *A. flavus*				
		55-437		JL 24		
Résidus de culture[2]	Lime[1]	No FYM[3]	FYM at sowing	No FYM	FYM at sowing	Mean
no crop residus	no lime	1.67	1.67	47.67	17.33	17.08
	lime at sowing	1.33	1.00	26.67	14.67	10.92
Mean (no residus)		1.500	1.33	37.17	16.00	14.00
crop residus after sowing	no lime	1.73	1.33	33.00	16.33	13.10
	lime at sowing	1.33	1.00	24.00	13.67	10.00
Mean (residus after sowing)		1.53	1.17	28.50	15.00	11.55
SEm (±)		2.928				
CV(%)		39.7				

1. 400 kg/ha^{-1} of lime
2. 2.5 t ha^{-1} of crop residus
3. 2.5 t ha^{-1} of Farm Yard Manure

4.3.1.2 Commentaires

- Variété:

Une différence très significative a été observée entre les variétés. La 55-37 a été résistante avec 2% de contamination contre 24% de contamination chez JL24.

- Chaux:

La chaux 400 kg/ha appliquée 50 jours après semis a permis une réduction de la contamination de 31%

- Fumier:

Le fumier à 2.5 t/ha appliqué au semis a permis de réduire la contamination de 51%.

- Résidus de céréales:

Aucun effet significatif n'a été obtenu avec les résidus de céréales à 2.5 t/ha appliqués 50 jours après semis.

- Variété*Chaux:

L'effet de la chaux dépend de la variété. La JL 24 a plus répondu à l'effet de chaux avec 31% de réduction de la contamination contre 27% chez la 55-437.

- Variété*fumier:

L'effet du fumier est lié à la variété. La réponse à l'application de 2.5 t/ha de fumier au semis est plus grande avec JL24 (52.8% de réduction de contamination) qu'avec 55-437 (18% de réduction de contamination).

- Chaux*fumier:

L'application de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis et 2.5 t/ha de fumier au semis a réduit la contamination des graines de 37%.

- Variété*chaux*fumier:

l'effet de l'application combinée de 400 kg de chaux/ha à 50 jours après semis et 2.5 t/ha de fumier au semis dépend de la variété. La JL 24 a plus réagit à l'application combinée de chaux et de fumier avec 65% de réduction contre 41% chez 55-437.

4.3.2 Pourcentage de graines contaminées par l'Aflatoxine

4.3.2.1 Résultats (voir tableau 9):

Tableau 9. L'effet de source de calcium et les résidus de culture sur la contamination de l'arachide par l'aflatoxine sous infestation naturelle, Station de Samé, Kayes, Mali, saison pluvieuse 2004.

		Aflatoxine (ppb)				
		55-437		JL 24		
Résidus de culture[2]	Lime[1]	No FYM[3]	FYM at sowing	No FYM	FYM at sowing	Mean
no crop residus	no lime	0.48	0.32	58.60	13.38	18.20
	lime at sowing	0.28	0.18	15.91	16.98	8.34
Mean (no residus)		0.38	0.25	37.26	15.18	13.27
crop residus after sowing	no lime	0.59	0.34	37.44	18.83	14.30
	lime at sowing	0.36	0.22	27.10	16.45	11.03
Mean (residus after sowing)		0.48	0.28	32.27	17.64	12.67
SEm (±)		2.714				
CV(%)		36.3				

1. 400 kg /ha^{-1} of lime
2. 2.5 t ha^{-1} of crop residus
3. 2.5 t ha^{-1} of Farm Yard Manure

4.3.2.2 Commentaires

- Variété:

La 55-437 a enregistré une teneur en aflatoxine très faible avec 0.35 ppb contre 25.59 ppb chez la JL24.

- Chaux:

La chaux à 400 kg/ha à 50 jours après semis a réduit l'aflatoxine de 40%.

- Fumier:

2.5 t/ha de fumier appliqué au semis a permis une réduction de 53%.

- Résidus de céréales:

Aucun effet significatif n'est observé avec l'application de 2.5 t/ha de résidus à 50 jours après semis.

- Variété*chaux:

L'effet de l'application de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis n'est pas lié à la variété. 40% de réduction de la contamination est enregistré chez les 2 variétés (55-437 et JL 24).

- Variété*fumier:

L'effet de 2.5 t/ha au semis est lié à la variété. 53% de réduction de la teneur en aflatoxine est observé chez la JL 24 contre 37% chez 55-437.

- Chaux*fumier:

L'effet combiné de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis et 2.5 t/ha de fumier au semis a réduit la teneur en aflatoxine de 65%.

- Chaux*résidus:

L'application de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis et 2.5 t/ha de résidus de céréales à 50 jours après semis a réduit l'aflatoxine de 39%.

- Variété*chaux*fumier:

L'effet de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis et 2.5 t/ha de fumier au semis est un peu lié à la variété. La 55-437 a réduit la teneur en aflatoxine de 63% contre 65% chez la JL24.

- Variété*chaux*résidus:

L'effet de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis et 2.5 t/ha de résidus de céréales à 50 jours après semis dépend de la variété. La 55-437 répond moins à cette combinaison appliquée en réduisant l'aflatoxine de 28 % contre 39% chez JL 24.

- Chaux*fumier*résidus:

L'application de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis, 2.5 t/ha de fumier au semis et 2.5 t/ha de résidus de céréales à 50 jours après semis a permis 72% de réduction de la teneur en aflatoxine.

- Variété*chaux*fumier*résidus:

L'effet combiné de 400 kg/ha de chaux à 50 jours après semis, 2.5 t/ha de fumier au semis et 2.5 t/ha de résidus de céréales à 50 jours après semis est lié à la variété. La JL 24 a enregistré la plus grande réduction en aflatoxine avec 72% contre 54% chez la 55-437.

4.3.3 Rendements des gousses et des fanes

4.3.3.1 Résultats (voir tableaux 10 et 11):

Tableau 10 : L'effet de source de calcium et les résidus de culture sur la ontamination de l'arachide par l'aflatoxine sous infestation naturelle, Station de Samé, Kayes, Mali, saison pluvieuse 2004

		Pod yield (t/ha^{-1})				
		55-437		JL 24		
Residus de culture[2]	Lime[1]	No FYM[3]	FYM at sowing	No FYM	FYM at sowing	Mean
no crop residus	no lime	1.990	1.250	0.823	1.083	1.286
	lime at sowing	0.990	1.802	1.479	1.812	1.521
Mean (no residus)		1.490	1.526	1.151	1.448	1.404
crop residus after sowing	no lime	1.781	0.771	1.083	0.875	1.128
	lime at sowing	1.552	1.510	1.615	1.271	1.487
Mean (residus after sowing)		1.667	1.141	1.349	1.073	1.307
SEm (±)		0.3728				
CV(%)		15.2				

1. 400 kg/ha^{-1} of lime
2. 2.5 t ha^{-1} of crop residus
3. 2.5 t ha^{-1} of Farm Yard Manure

Tableau 11. L'effet de source de calcium et les résidus de culture sur la contamination de l'arachide par l'aflatoxine sous infestation naturelle, Station de Samé, Kayes, Mali, saison pluvieuse 2004.

		Haulm yield (t/ha^{-1})				
		55-437		JL 24		
Résidus de culture[2]	Lime[1]	No FYM[3]	FYM at sowing	No FYM	FYM at sowing	Mean
no crop residus	no lime	3.85	2.60	2.60	3.44	3.12
	lime at sowing	2.60	3.65	3.23	3.65	3.28
Mean (no residus)		3.23	3.13	2.92	3.54	3.20
crop residus after sowing	no lime	3.85	2.19	3.23	3.13	3.10
	lime at sowing	2.92	3.75	2.71	4.06	3.36
Mean (residus after sowing)		3.39	2.97	2.97	3.59	3.23
SEm (±)		0.881				
CV(%)		26.9				

1. 400 kg/ha^{-1} of lime
2. 2.5 t ha^{-1} of crop residus
3. 2.5 t ha^{-1} of Farm Yard Manure

4.3.3.2 Commentaires

En ce qui concerne les rendements des gousses et des fanes, aucune différence significative n'est observée entre les différents traitements (variété, chaux, fumier, résidus de céréales). De même aucune interaction significative n'est enregistrée entre ces traitements.

5. Bibliographie

1. Berchtein E M Vacilièvna H G, Poliak M C, 1985 : Milieu de culture général pour la détermination de l'activité biologique des antibiotiques aminoglycosides Antibiotiki u biotknologia, 7, p 543-547.

2. Brudzynski.A, 1987 : L'Incidence de l'*Aspergillus flavus* et d'autres espèces de moisissures dangereuses dans la mycoflore du maïs, d'arachide et de cossettes de manioc vendues sur le marché de Kisangani. Rapport collogue international sur la contamination des arachides par les aflatoxines p. 32

3. Cemenov Y A, Antibiotiques, 1990, édition Mir p 203-236.

4. Egorova H C, 1976 : Pratiques de microbiologie édition Université de Moscou , p 69-160.

5. Egorov H C, 1979 : Bases de l'étude des antibiotiques, édition Grande école Moscou, p 40 –140.

6. Fennel D I, Raper K B, j Micologia 1950, 42, t 1 p 48-54.

7. Hao D.Y.Y, 1990: Elimination de l'Aflatoxine du maïs et des arachides à différentes températures et différentes activités de l'eau effets du *Bacillus subtilis* et du chitosan. Compte rendu de la 5è Conférence Internationale sur la protection des denrées entreposées vol 1 p. 279 - 290.

8. Moreau C, 1974 : Moisissures toxiques dans l'alimentation, 2ème édition Paris, Masson et Cie, p 78 108.

9. Pollet A. et coll 1992: Trois années d'études sur la contamination par les aflatoxines des stocks d'arachide constitués dans les villages de la Côte d'Ivoire. Résultats principaux. Oléagineux, v 47, p.71-85

RAPPORT DE L'EQUIPE DPP/EAN
(Partenaire N° 5)

DEPARTMENT OF PLANT PHYSIOLOGY
ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL
(PORTUGAL)

NOVEMBRE 2004-OCTOBRE 2005

Maria do Céu MATOS
(Scientific responsable)
Paula SCOTTI CAMPOS
Cláudia LIMA NEVES
José SEMEDO
Álvaro de MATOS

WP 2 Biochemical and physiological studies

Activity 1 - Effect of drought in membrane integrity and *Aspergillus flavus L.* resistance

Introduction

Drought severely limits productivity affecting physiologic and metabolic processes in groundnut (*Arachis hypogaea L.*). Not only the yield of groundnut but also the qualities of product decrease under drought stress (Vorasoot et al., 2003).
Lipids are major plant components and cell membranes, in particular, are made up of fatty acids and proteins. Groundnut seeds are a rich source of fatty acids (43-55%) and protein (25-28%) (Holbrook and Stalke, 2003). Generally the oleic and linoleic acid proportions together make up 80% of fatty acid in groundnut (Hashim et al, 1993). Linoleic acid (L) is less saturated and less stable than oleic acid (O) and the oxidative stability and shelf life of peanut and groundnut products can be enhanced by increasing the O/L ratio (Xue et al, 2003; Holbrook and Stalke, 2003). The quantity of the individual fatty acids in groundnut oil also depends on seed maturity (Hashim et al., 1993).
For the characterization of the different varieties of groundnut changes in water relations, gas exchanges, assimilates partitions, and biomass partition, which affect sink organs, are also important.

Objectives

The aim of this work was:
- to compare the effect of late season water stress on water, protein, total fatty acids content and fatty acid composition, in two varieties of *Arachis hypogaea* (Fleur 11 and 55-437) differing in their sensitivity to drought stress. The evolution of these parameters was followed in seeds and shells presenting different maturity stages;
- to characterize these two varieties of groundnut according to physiological parameters in relation to the effect of late season water stress and *Aspergillus flavus* infection.

Materials and methods

Two varieties of *Arachis hypogaea* (Fleur 11 and 55-437) were considered under two infestation treatments with *A. flavus* (infected, infected and not infected, n. infected) and two water availability regimes (watered, w; water stress, ws).
In both periods of harvesting, plants were grown in a glasshouse under natural irradiance and temperature conditions. Grains were sown in pots filled with a mixture of vermiculite : Triohum tray substrate (4:5). Artificial infection with *A. flavus* was applied in half of both cultivars at full bloom, according to Dorner et al. (1998). Since sowing, irrigation was supplied three times a week until thirty days before harvest. At this time plants were split in two groups: in the first group plants were irrigated as before to maintain 90% CC; in the second group, plants were subjected to water shortage cycles by withholding irrigation until 30% CC. A modified (two-fold micronutrients) Hoagland and Snyder (1933) solution was applied 1 month before harvest, in all plants when pot capacity of water stressed plants decreased to 30% CC.
Plants were analyzed for physiological parameters 25 and 18 days before harvest.

At harvest, pods were hand picked and damaged pods were separated from sound pods. According to the color and structural differences in the mesocarp, sound pods were separated in three maturity stages, which vary in order of increasing maturity from yellow (M1), to brown (M2) and black (M3). Grain and pod samples were kept at –80°C for further analysis.
The number and dry weight of pods and grains of different maturity stages were determined.
The second pair of leaflets of the third leaf from the top of the main shoot was used to measure relative water content (RWC) according to Catsky (1960);
Seeds and shells of different maturity stages of both varieties, under water stress and watered conditions, were analysed for chemical parameters:
. Moisture content was measured in plants submitted or not to *A. flavus* infestation.
The following analysis were performed only in non infected plants:

- Protein content, according to ISO 937:1979;
- Total fatty acids content, according to ISO 1443:1973;
- Fatty acid composition by gas chromatography;
- Moisture content of seeds and shells of infected and non infected plants was determined according to ISO 1442:1979.

Results and discussion

Table 1 - Glasshouse mean temperature and relative humidity (RH %), during growth cycle (May – September).

Mean Temperature (°C)		***Mean Relative Humidity (%)***	
Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
37	19	56	25

Effects of water stress and *A. flavus* infection

Table 2 - Sound pods percentage in not infected, infected, watered and water stress treatments of two varieties of groundnut.

Variety	*A. flavus* infection	Water viability	Sound pods (%)
55 437	n infected	w	85,94± 5,25
		ws	68,04± 5,32
Fleur 11		w	75,24± 5,52
		ws	56,68± 4,76
55 437	infected	w	76,29± 2,72
		ws	66,70± 3,37
Fleur 11		w	74,22± 2,57
		ws	69,22± 3,19

In table 2 we can see that in both varieties, sound pods percentage decreased with water stress (21% and 24% respectively in 55 437 and Fleur 11 under non infection and 11.8 and 6. 8% under infection conditions). Under non infection conditions the cv. 55 437 produced a higher percentage of sound pods than Fleur 11, in both water treatments. Under infection conditions this percentage was similar in both cultivars, for similar water treatment (*ca.* 75% in irrigated plants and *ca.* 68% in droughted plants). Infection decreased the percentage of sound pods only in 55 437 irrigated plants (11.6%).

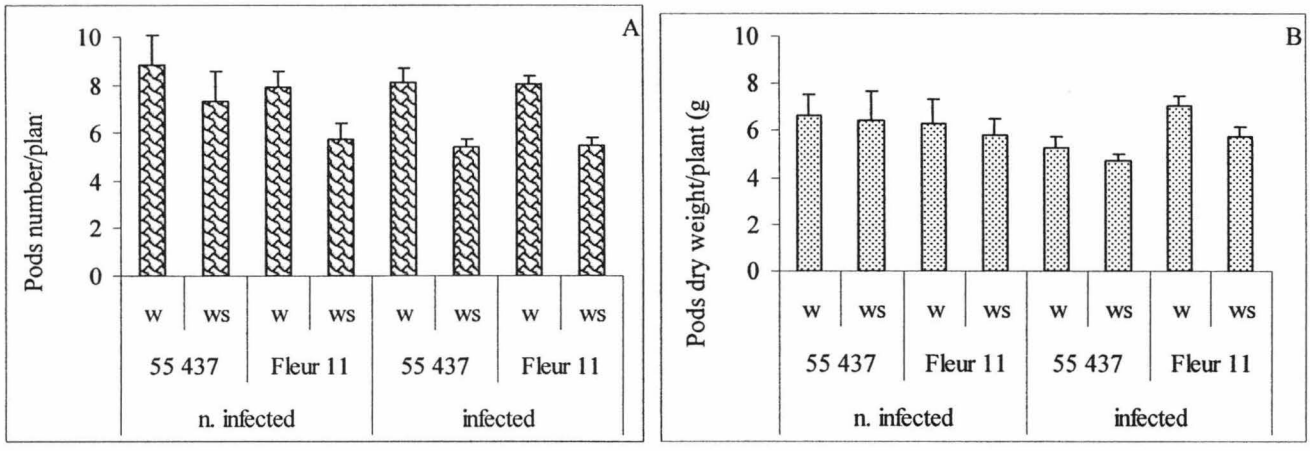


Figure 1 - Effect of water stress and *A. flavus* infection in the number of pods per plant (A) and pods dry weight per plant (B) of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

Under water stress both cultivars produced a small number of pods, compared to watered plants, under infected or non infected conditions. The number and the dry weight of pods was similar in both cultivars, depending on the water treatment. In Fig. 1 A it can be seen that infection had no significant effect on this parameter.
In Fig. 1 B infection did not affect pods dry weight of both cultivars.

Water stress and *A. flavus* infection effects on seeds maturity stages

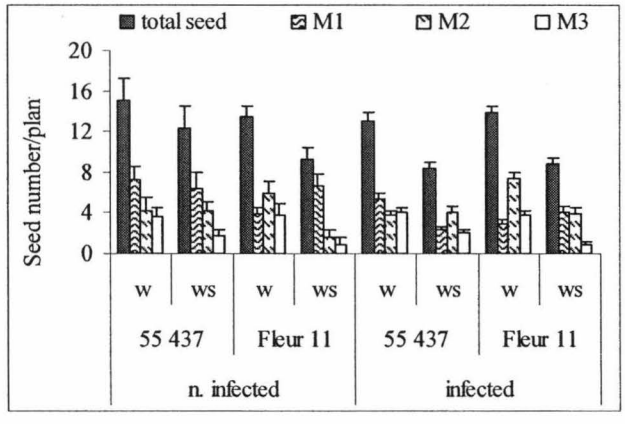


Figure 2 - Effect of water stress and *A. flavus* infection in number of seeds in different maturity stage of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

Concerning Figure 2, cvs. 55 437 and Fleur 11 irrigated plants had similar seed number per plant.
Water stress reduced the total number of seeds of Fleur 11 mainly due to reductions in M2 and M3. The cv 55 437 showed a reduction in the number of mature seeds (M3). Infection only decreased the seed number /plant in 55 437 when associated to water stress and did not further reduce the number of seeds/plant in Fleur 11 submitted to drought.

Water stress and *A. flavus* infection effects on relative water content (RWC)

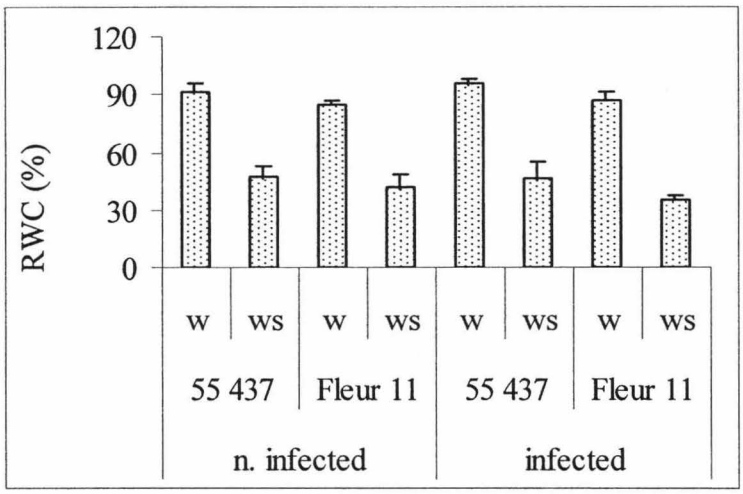


Figure 3- Effect of water stress and *A. flavus* infection on relative water content (RWC) of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

RWC decreased in both cvs. with water stress in infected or not infected plants (Fig. 3).

Moisture content

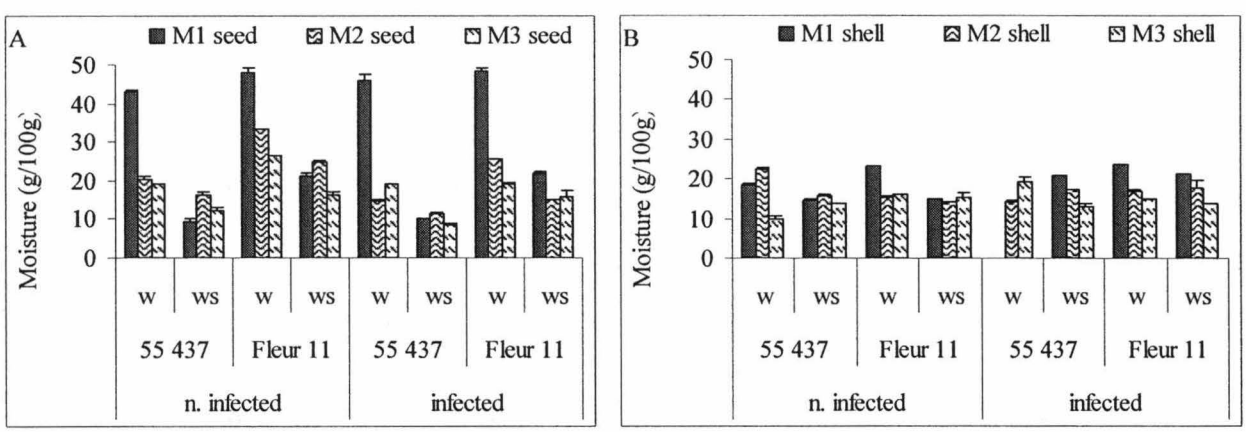


Figure 4 - Effect of water stress, *A. flavus* infection and maturity stages on moisture content of seeds (A) and shells (B) of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

As expected seeds presented a higher moisture percentage than shells (Fig. 4). Considering all studied treatments, Fleur 11 seeds and shells had a higher moisture percentage than 55 437. Water stress decreased significantly the moisture of seeds in different maturity stages of both cultivars infected and non infected. In watered plants the seeds in the immature stage, M1, had the highest moisture % in both cultivars ($P<0.05$). The infection treatment only significantly affected the seeds in M2, of both cultivars in water and water stress conditions. Water stress conditions significantly reduced the moisture percentage of M1 and M2 in 55 437 non infected shells and the immature stage, M1, of Fleur 11 non infected shells.

Protein content

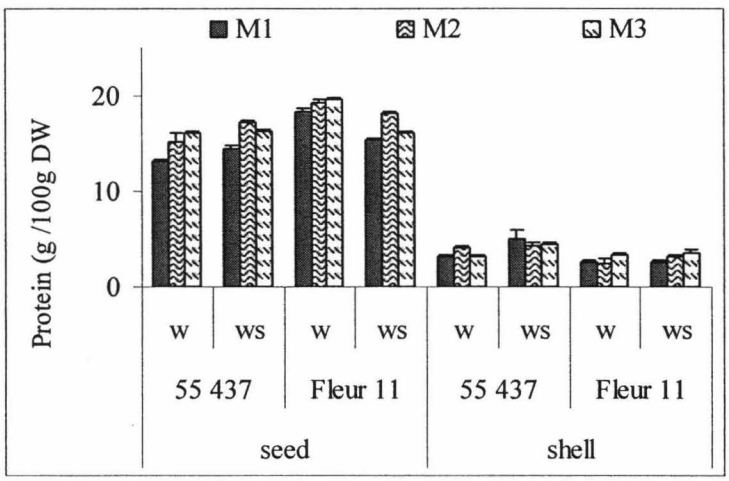


Figure 5 - Effect of water stress and maturity stages on protein content of seeds and shells of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

Under good water availability conditions Fleur 11 seeds had significantly more protein percentage than 55 437 (Fig. 5). The water stress induced a reduction of this parameter in Fleur 11 what does not happen in 55 437. Seeds had more protein than shells. In seeds protein content significantly increased from M1 to M2 in 55 437, and water stressed Fleur 11. Water stress conditions affected negatively the seeds of Fleur 11 in immature stage, M1.

Total fatty acids content

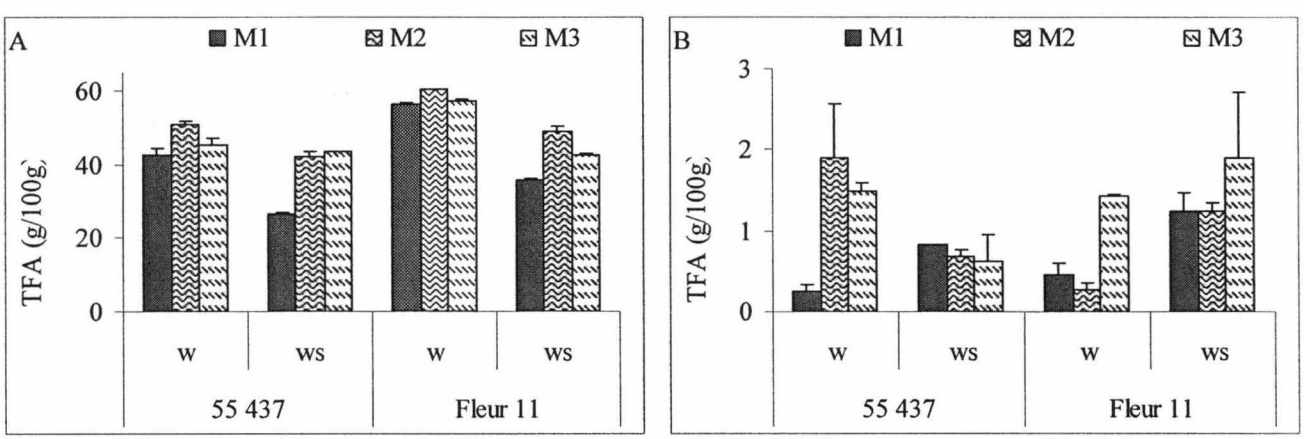


Figure 6 - Effect of water stress and maturity stages on total fatty acids content of seeds (A) and shells (B) of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

The seeds of the two cvs had more fatty acids than shells (Fig. 6). In watered plants Fleur 11 had a significantly more content of fatty acids than 55 437. The total fatty acids content of seeds significantly increased from M1 to M2 stages in 55 437 when watered or subjected to water stress, and in Fleur 11 under this last conditions. Water stress reduced TFA in seeds in the stages M1 and M2 of 55 437 and in all the stages of Fleur 11. In shells, water stress decreased the total fatty acids content of M2 and M3 of 55 437, but increase the fatty acids amount of M1 of 55 437 and all maturity stages of Fleur 11.

Fatty acid composition

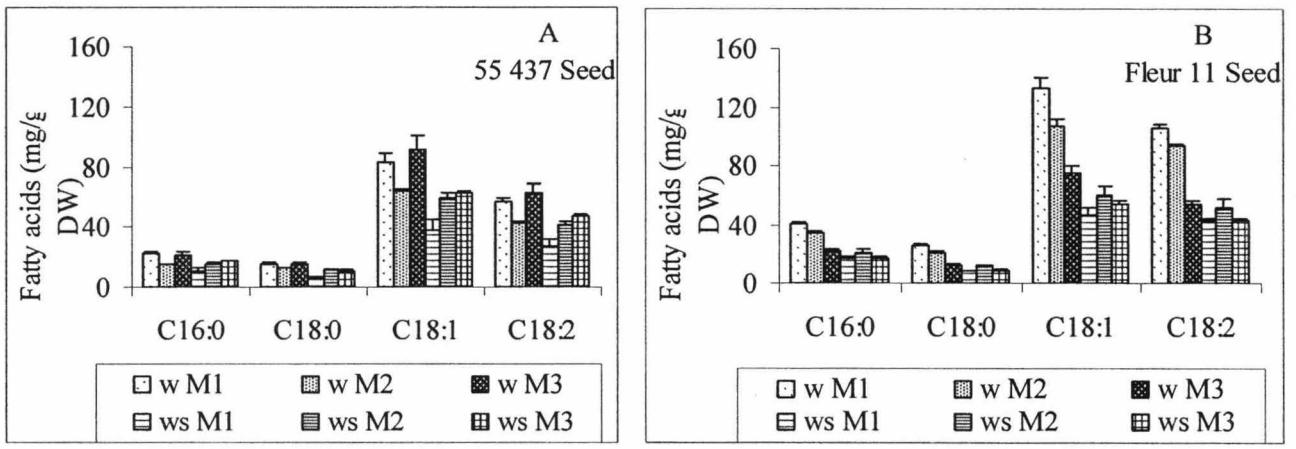


Figure 7 - Effect of water stress on C16:0, palmitic acid, C18:0; stearic acid, C18:1, oleic acid, C18:2, linoleic acid, and C18:3, linolenic acid, content of seeds in three maturity stages of 55 437 (A) and Fleur 11 (B) cultivars.

In a general way (Fig. 7) the seeds of Fleur 11 had more C16:0, C18:0; C18:1 and C18:2 content than 55 437. Water stress conditions decreased significantly all fatty acids of 55 437 seeds in M1 and in M1 and M2 of Fleur 11. In irrigated plants C18:1 and C18:2 suffered a significant decrease in Fleur 11from M1 to M3 seeds.

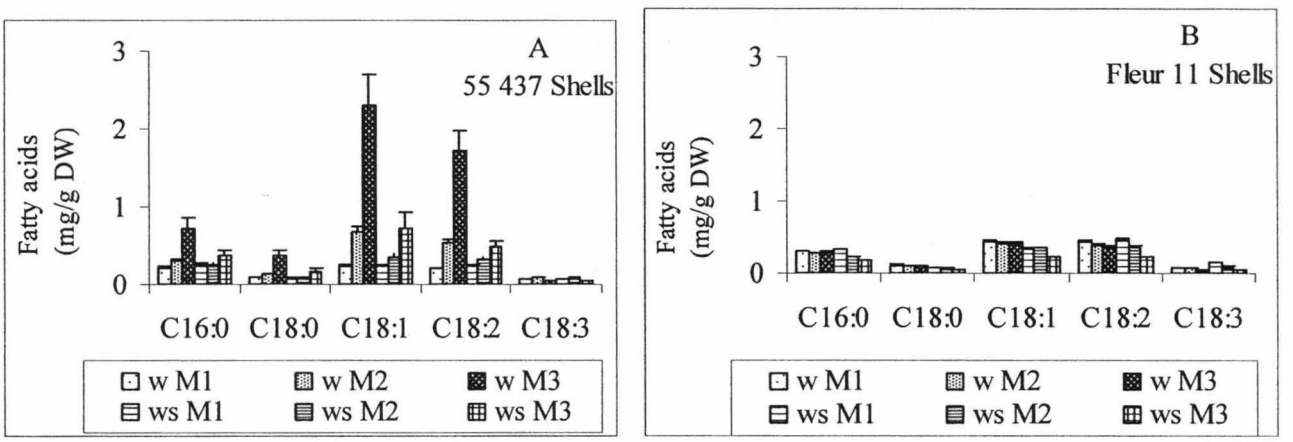


Figure 8 - Effect of water stress on C16:0, palmitic acid, C18:0; stearic acid, C18:1, oleic acid, C18:2, linoleic acid, and C18:3, linolenic acid, content of shells in three maturity stages of 55 437 (A) and Fleur 11 (B) cultivars.

Contrarily to seeds, in Figure 13 we can see that in shells 55 437 had more C16:0, C18:0; C18:1 and C18:2 content than Fleur 11.
In 55 437 shells (Fig. 8 A) a significant increase of C16:0, C18:0; C18:1 and C18:2 content occurred throughout seed development. Drought significantly reduced the amount of such fatty acids in M3 in this cultivar, what did not occur in Fleur 11 (Fig. 8 B).

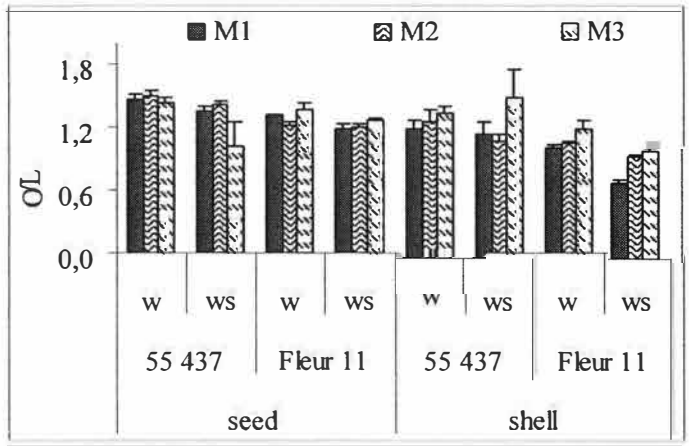


Figure 9 - Effect of water stress and maturity stages on oleic acid and linoleic acid ratio (O/L) of seeds and shells of 55 437 and Fleur 11 cultivars.

As regards Figure 9 seeds of watered plants of 55 437 showed a higher O/L (M1 and M2) than Fleur 11.
Under water stress that shells in M1 and M3 of Fleur 11 presented lower values of O/L than in the same stages of 55 437.

Conclusions

Infection decreased the percentage of sound pods only in 55 437 irrigated plants (11.6%).
Water stress reduced significantly the number of pods in both cvs.
Infection did not affect this parameter
Infection only decreased the seed number /plant in 55 437 when associated to water stress and did not further reduce the number of seeds/plant in Fleur 11 submitted to drought.
Fleur 11 seeds and shells had a higher moisture percentage than 55 437.
Water stress decreased significantly the moisture of seeds in different maturity stages of both cultivars infected and non infected
Under good water availability conditions Fleur 11 seeds had significantly more protein percentage than 55 437
Water stress reduced TFA in seeds in the stages M1 and M2 of 55 437 and in all the stages of Fleur 11.
In a general way (Fig. 12) the seeds of Fleur 11 had more C16:0, C18:0; C18:1 and C18:2 content than 55 437. Water stress conditions decreased significantly all fatty acids of 55 437 seeds in M1 and in M1 and M2 of Fleur 11.
Contrarily to seeds, in Figure 13 we can see that in shells 55 437 had more C16:0, C18:0; C18:1 and C18:2 content than Fleur 11.
Drought significantly reduced the amount of C18:0, C18:1 and C18:2 in M3 in 55 437, what did not occur in Fleur 11.
Seeds of watered plants of 55 437 showed a higher O/L (M1 and M2) than Fleur 11.
Under water stress that shells in M1 and M3 of Fleur 11 presented lower values of O/L than in the same stages of 55 437.

References

- Allen, C. F., Good, P., Davis, H. S., Chisum, P., Fowler, S. D. 1966. Methodology for the separation of plant lipids and application to spinach leaf and chloroplast lamellae. J. Amer. Oil Chem. Soc., 43: 223-230.
- Catský, J. 1960. Determination of water deficit in discs cut out from leaf blades. Biol. Plant, 2: 76-78.
- Dorner, J. W., Cole, R. J., Blankenship, P. D. & Hill. 1998. Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts. Biological Control, 12: 171-176.
- Hashim, I.B, Koeler, P.E., Eitenmeller, R.R. & Kvien, C.K. 1993. Fatty acid composition and tocopherol content of drought stressed florunner peanuts. Peanut Science, 20: 24-26.
- Hoagland, D.R., Snyder, W.C. 1933. Nutrition of strawberry plant under controlleds conditions. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci, 30: 288.
- Holbrook, C.C. & Stalker, H.T. 2003. Peanut Breeding and Genetic. In: Jules Janick (eds), Plant Breeding Reviews, Vol. 22, John Wiley & Sons, Inc, 207-356.
- Meat and meat products – Determination of free fat content. ISO 1444: 1996.
- Vorasoot, N., Songsri, P., Akkasaeng, C., Jogloy, S. and Patanothai, A. 2003. Effect of water stress on yield and agronomic characters of peanut. Songklanakarin J. Sci. Technol., 25(3): 283-288.
- Xue, H. Q., Isleib, T. G., Payne, G. A., Wilson, R. F., Novitzky, W. P., Greg O`Brian 2003. Comparison of aflatoxin production in normal and high oleic backcross derived peanut lines. Plant disease, 87(11): 1360-1365.

Other Activities

Maria do Céu Matos e Paula Scotti Campos integrated the organizing Comission of the IXth Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal / XVIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiologia Vegetal, that was held in Évora (18 - 21 September , 2005).

The 3rd Workshop of INCO Project Groundnut/Aflatoxin – ICA4-2001-10007) was held in Estação Agronómica Nacional, Oeiras, Portugal from 13-15 June, 2005.

Participation in Scientific meetings

Neves CL, Campos PS, Almeida C, Semedo J, Domingos C, AC Matos A, Figueira ME, Vales C, Matos MC (2004). Grain lipid composition as a tool for understanding drought stress tolerance XIV Congresso Nacional de Bioquímica, December 2004, Vilamoura, Portugal. Livro de Actas pg 60.

Neves, C.L., Campos, P.S., Almeida, C., Semedo, J., Domingos, A.C., Vales, L., Matos, A., Peito, A., Figueira, M.E. e Matos, M.C. 2005. Estudo do efeito da seca no desenvolvimento das vagens de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e sua implicação na infecção por *Aspergillus flavus*. V Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas/ VI Congresso Iberoamericano de Ciências Hortícolas. Vol. 1: Olericultura; Plantas Ornamentais, Plantas Aromáticas e Medicinais. Actas Portuguesas de Horticultura, nº 5, Pp. 278-282. Ed. Associação Portuguesa de Horticultura, ISBN: 972-95881-8-X.

Neves, C.L., Campos, P.S., Almeida, C., Semedo, J., Domingos, A.C., Matos, A., Figueira, M.E. e Matos, M.C. Does water stress affect seeds and shells groundnut lipid composition? Livro de resumos do IX Congresso Luso Espanhol de Fisiologia Vegetal, p. 201, Évora, 18-21 de Setembro de 2005.