

CHAPITRE I

RESISTANCE DES PLANTES AUX INSECTES

CHOIX DU CEPAGE DE VIGNE PAR LA FEMELLE D'UN INSECTE DEPREDATEUR DE GRAPPES, L'EUDEMIS (*Lobesia botrana*).

Denis Thiery¹ et Nevile Maher

Parmi les insectes qui causent des dégâts importants à la vigne, deux papillons, les vers de la grappe, eudémis (*Lobesia botrana*) (LB) et cochyliis (*Eupoecilia ambiguella*) (EA), sont particulièrement redoutables car ils s'attaquent directement aux grappes. Ces deux espèces causent des dégâts aussi bien aux raisins de cuve que de table, sur cépages blancs et rouges. Cochyliis effectue 2 générations par an et eudémis de 2 à 4 selon la latitude, et les chenilles des deux espèces s'attaquent à tous les stades de développement de la baie, de la floraison à la maturité. Les morsures des chenilles favorisent en outre fortement l'action du pathogène *Botrytis cinerea* dont le dégât majeur est la pourriture grise (Fermaud and Le Men, 1989). Les deux espèces sont fortement influencées par des contraintes climatiques, eudémis acceptant mieux les climats chauds et secs et cochyliis les frais et humides, mais on connaît encore relativement mal les préférences respectives de ces deux espèces pour les différentes variétés de raisin. Chez ces deux espèces, les chenilles changent difficilement de grappe et à plus forte raison de cep. La localisation des dégâts causés par la chenille est donc principalement le résultat du comportement de choix du cépage qui est effectué par la femelle lorsqu'elle pond ses oeufs. L'évaluation des préférences de ponte de la femelle est donc un élément très important à prendre en considération pour déterminer la susceptibilité ou à la résistance des variétés de raisin à ces insectes. Aucune véritable résistance contre ces deux insectes liée à la toxicité n'est connue dans le cas de la vigne. On parle seulement de résistance comportementale qui se caractérise par des préférences graduelles de l'adulte ou de la chenille pour différents cépages.

Pour mesurer les préférences de ponte de la femelle nous avons développé 2 bio-essais dont le principe de base est de proposer des situations de choix à des femelles, afin d'observer leurs réponses comportementales. Ils permettent aussi de caractériser l'information chimique utilisée par la femelle lors du choix du site de ponte (la grappe). Le premier test permet de classer les grappes des différentes variétés testées en fonction de leur réceptivité à la ponte, et le deuxième permet de caractériser les médiateurs chimiques responsables de ces choix. Ces deux tests impliquent le comportement des insectes. Il est donc indispensable de réduire au maximum le bruit généré par les facteurs de variation expérimentale. LB et EA sont deux insectes actifs au crépuscule et ainsi sensibles aux différences d'exposition de la grappe ainsi qu'aux différences de température. Le comportement des femelles varie en fonction de leur âge et nous les pensons capables de modifier leur comportement suite à un apprentissage. C'est la raison pour laquelle ces bio-essais se déroulent en environnement contrôlé (température et humidité régulée et en conditions d'éclairage maîtrisées), et qu'ils sont conduits sur des animaux issus de nos élevages dont nous connaissons l'origine, l'âge et l'état physiologique.

¹ UMR en Santé Végétale INRA-ENITAB 1065, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex.
thiery@bordeaux.inra.fr.

1. BIO-ESSAI N° 1 : COMPARER LE COMPORTEMENT DE PONTE ENTRE GRAPPES DE DIFFERENTES VARIETES.

1.1. Principe

Ce bio-essai est une première étape permettant de tester le choix de la femelle face à la globalité des informations fournies par chaque grappe. La femelle utilise des informations à distance (forme, couleur, odeur) mais aussi au contact (goût, rugosité, température) de la grappe. Une femelle d'eudémis ou de cochylis qui a effectué un mauvais choix à distance peut corriger son erreur lors de l'évaluation qu'elle effectue par contact à l'aide des récepteurs gustatifs de ses pattes et de son ovipositeur (Maher and Thiéry, 2004a). Sauf en situation environnementale perturbée, le dépôt de l'œuf est le résultat de la bonne perception de ces informations.

1.2. Fonctionnement

Ce test comportemental fonctionne avec deux grappes fraîchement récoltées suspendues et distantes d'une dizaine de cm (figure 1a). Il s'agit d'un cylindre de dimension (20 cm diam. x 40 cm) aéré afin d'éviter le confinement (figure 1a). Une femelle est introduite dans cette cage deux heures avant le crépuscule afin qu'elle puisse s'acclimater à ce nouvel environnement. Le résultat de son comportement est quantifié le lendemain matin, de manière très simple en comptant les œufs pondus sur chacune des grappes.

1.3. Contraintes

Comme tout test comportemental, il faut réaliser des répétitions statistiques. D'une manière générale chaque choix binaire est répété au moins 20 fois. Il est indispensable de tester le choix entre grappes de stades de maturation identiques. Il est préférable d'éviter le matériel congelé, le processus de congélation - décongélation modifiant la couleur et les arômes.

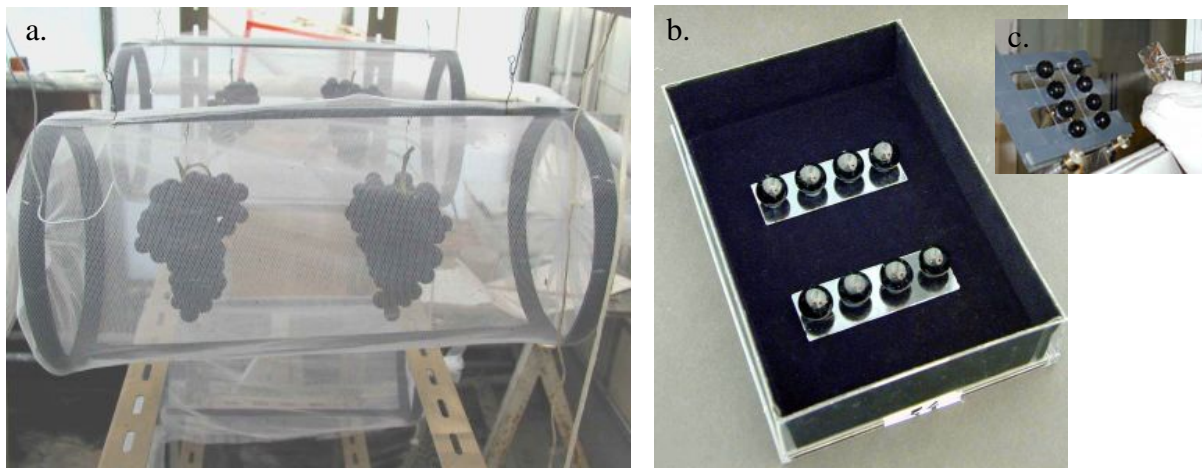


Figure 1 : (a.) Premier bio-essai présentant un choix entre deux grappes de raisin ; et (b.) deuxième bio-essai présentant un choix entre un supports de ponte constitué de (c.) billes de verre vaporisés avec des extraits de raisin.

2. BIO-ESSAI N°2 : EVALUER LA REPONSE DES FEMELLES AUX MEDIATEURS CHIMIQUES PRODUITS PAR LA BAIE DE RAISIN.

2.1. Principe

Il consiste à comparer les choix de ponte entre des substrats de verre traités avec des extraits de grappes ou de fleurs de différentes variétés de raisin. Comme le test précédant, il

fonctionne en situation de choix et montre l'existence de préférences de ponte. L'objectif de ce bio-essai est de caractériser les stimulants de ponte sur les différents cépages. Il nous sert aussi de guide durant le processus de purification chimique de ces stimulants.

2.2. Fonctionnement

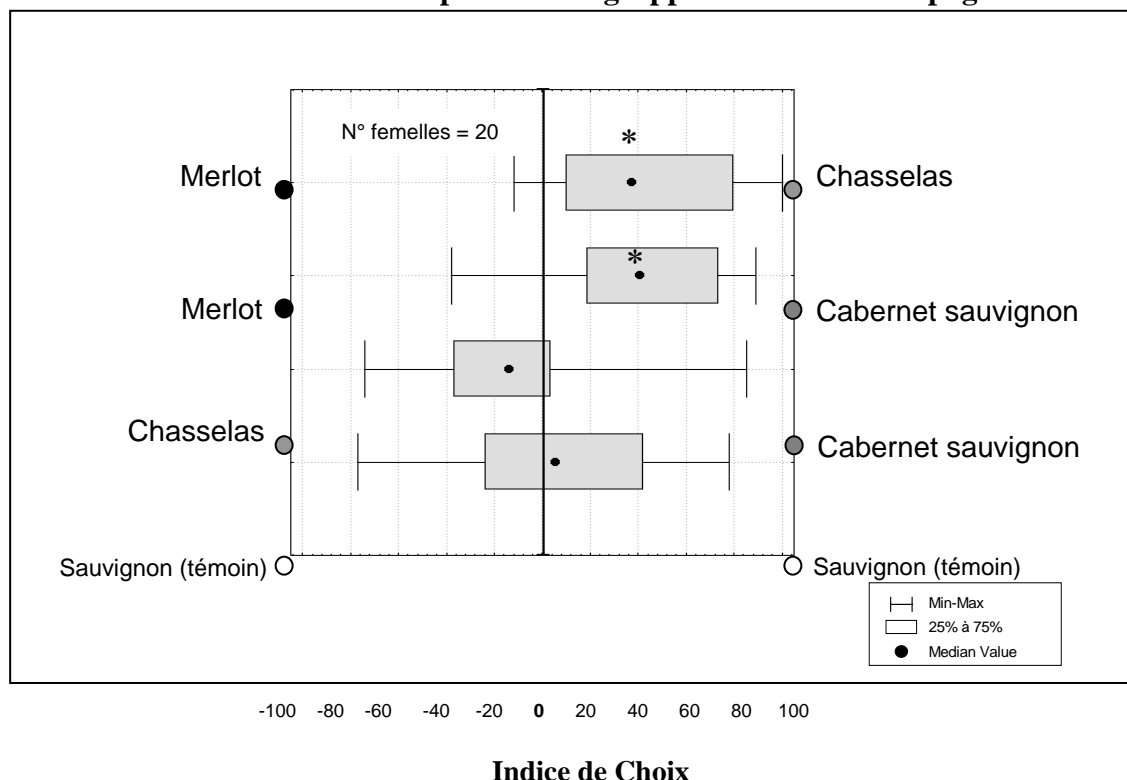
Deux rangées de 4 billes de verre noir reproduisent des baies de raisin. Le choix du verre garantit une inertie chimique. Ces billes sont vaporisées (fig. 1c) avec des extraits de baies en maîtrisant parfaitement la quantité de produit déposé. Les baies artificielles recouvertes d'extraits de raisin sont alors déposées dans une enceinte tapissée de feutrine (fig. 1b), cette matière empêchant les femelles de pondre dessus. Le choix est alors offert à une femelle ou 3 femelles selon l'expérimentation.

2.3. Contraintes

Les mêmes contraintes que le bio-essai précédant existent : à savoir le contrôle des conditions climatiques, des individus testés, et les répétitions statistiques. La seule contrainte supplémentaire réside dans la réalisation d'extraits de qualité. La méthodologie d'extraction est décrite dans Maher et Thiéry, 2004b.

3. QUELQUES RESULTATS OBTENUS AVEC CES DEUX BIO-ESSAIS

3.1. Bio-essai n°1 : Préférence de ponte entre grappes de différents cépages



Choix de ponte de femelles isolées entre deux grappes de cépage différent. L'indice de choix représenté varie entre 0 et 100, 0 indiquant que les femelles pondent identiquement entre les items du choix proposé. * = différence significative entre les nombres d'oeufs pondus sur les deux grappes (Wilcoxon test, $p < 0.005$). Données source (Maher et al. 2001)

3.2. Bio-essai N°2 : Bio-activité d'extraits de baies de différents cépages

	Nombre d'œufs pondus en une nuit par femelle (moy. ± sd)		Indice de Choix
	Solvant	Extrait	
Chasselas	12 ± 9	27 ± 19	30 ± 45
Merlot	15 ± 11	29 ± 17	31 ± 37
Sauvignon	17 ± 11	28 ± 12	25 ± 40
Blanc (témoin)	12 ± 12	12 ± 12	-1 ± 56

Tableau I : Influence sur la ponte d'extraits de baies mûres de trois cépages différents. Chaque extrait a été obtenu en trempant les baies dans du méthanol pendant 20 min. Les extraits ont été testés à la dose de 4 grammes-équivalents de baie par support de ponte, et chaque extrait est présenté en choix contre des billes ayant reçu le solvant d'extraction. Répétitions avec 1 femelle par cage = $25 < N < 38$. L'indice de choix varie de -100 à +100 selon le sens de la réponse. La valeur 0 indique une absence de préférence.

4. CONCLUSION

Les deux outils que nous présentons ici permettent d'évaluer de manière fiable les préférences de ponte de l'eudémis entre variétés de raisin. Ils ont été mis au point sur eudémis mais sont transférables assez facilement à cochylis. Actuellement, ils fonctionnent à deux choix ce qui limite néanmoins la comparaison directe entre variétés. C'est pourquoi nous travaillons au développement d'un troisième bio-essai qui permettra de mesurer les réponses comportementales des femelles lors de choix multiples entre plusieurs variétés simultanément. L'autre clé importante qui conditionne la sensibilité d'un cépage aux vers de la grappe est la capacité d'installation des chenilles, leur bon développement, et le succès reproducteur des adultes qui naissent. Une méthode est aussi proposée dans ce même numéro concernant l'évaluation de l'influence du cépage sur le développement larvaire.

REMERCIEMENTS : La mise au point de ces tests a été rendue possible grâce au soutien du Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux qui a financé la thèse de N. Maher.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fermaud M. and le Menn R. (1989) - Association of *Botrytis cinerea* with grapes berry moth larvae. *Phytopathology*, 79, 651-656.
- Maher N., Jolivet M. and Thiéry D. (2001) - Oviposition preference of the European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) for different vine cultivars. Influence of chemical stimuli from the fruit surface. *IOBC/wprs Bulletin*, 24 (7), 103-108.
- Maher, N. (2002). Sélection du site de ponte chez *Lobesia botrana* (Lepidoptera : Tortricidae): influence de l'information chimique non-volatile présente sur les fruits de plantes hôtes. *Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Médicales*, Université de Bordeaux 2, 125pp.
- Maher N. and Thiéry D. (2004a) - Distribution of chemo- and mechanoreceptors on the tarsi and ovipositor of female European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 110, 135-143.
- Maher N. and Thiéry D. (2004b) - A bioassay to evaluate the activity of chemical stimuli from grape berries on the oviposition of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 94, 27-33.

COMPARAISON DE LA QUALITE ALIMENTAIRE DES BAIES DE DIFFERENTS CEPAGES SUR LES CHENILLES D'UN PAPILLON DEPREDATEUR DE RAISIN.

Denis Thiery¹, Anne Xuereb¹, Marc Etienne Toulouse¹ et Jérôme Moreau²

Eudémis (*Lobesia botrana*) et Cochylis (*Eupoecilia ambiguella*) sont deux papillons qui causent de gros dégâts dans les vignobles européens. Ces deux insectes sont capables de se développer sur différentes plantes, y compris sur la large gamme de variétés de vignes en production. La démographie de ces insectes est liée aux facteurs climatiques mais aussi à la qualité et la quantité des ressources alimentaires disponibles durant le stade larvaire. Le nombre de chenilles par grappes, et donc l'intensité des dégâts causés par ces insectes dépend de nombreux facteurs tels que le nombre d'adultes présents dans les vignobles, le nombre d'œufs pondus par les femelles, le stade de maturation de la grappe mais également le cépage. De récentes études ont montré que les femelles eudémis choisissent le site de développement de leurs progénitures durant la ponte, et qu'elles ne pondent pas avec la même intensité sur les différents cépages ainsi que sur les différents stades de développement de la grappe (Thiery and Gabel, 2001 ; Maher et al, 2001 ; Maher and Thiéry, 2003 ; Thiéry & Maher, *ibid*). On sait aussi que des cépages à grappes compactes favorisent le développement des chenilles (Fermaud, 1998). Par ailleurs, il a aussi été montré que les chenilles fraîchement écloses s'installaient plus ou moins facilement en fonction des cépages (Gabel & Roehrich, 1995), ce qui a conduit ces auteurs à conclure à des résistances partielles de certains cépages contre l'installation des chenilles de Tordeuse.

A travers cette étude, nous cherchons à évaluer de quelle manière la qualité de la ressource alimentaire des chenilles peut conditionner leur bon développement, mais aussi les performances des adultes issus de ces chenilles. Pour cela nous mesurons un certain nombre de variables (traits d'histoires de vie) comme la durée de développement de chenilles, la masse des chrysalides, la fécondité de femelles, la fertilité des œufs, la taille des œufs, la durée de vie des adultes et la dynamique de la ponte (Moreau et al., 2004).

Nous présentons dans cet article, trois de ces variables et un indice de fitness obtenus sur des grappes de 7 cépages récoltés dans la collection de variétés de l'INRA de Bordeaux (chasselas, chardonnay, gewurztraminer, grenache, merlot, pinot et riesling) qui sont comparés à ce qui est considéré comme la vigne ancestrale sauvage, le lambrusque (*Vitis vinifera sylvestris*) (Heywood & Zohari, 1995)

1. PRINCIPE

Différents facteurs influencent la durée et la qualité du développement des chenilles, comme le stade de développement de la baie, la dureté de la baie, la compacité de la grappe qui incite la chenille à se déplacer plus ou moins, mais aussi la compétition alimentaire entre chenilles. Pour tester l'influence de la qualité alimentaire, nous avons mis au point un test qui propose les différents cépages à des chenilles qui vont effectuer leur développement sans compétition inter-individuelle. Les baies de raisins sont lyophilisées immédiatement après récolte puis

¹ UMR en Santé Végétale INRA-ENITAB 1065, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex.

² UMR Biogéosciences CNRS 5561, Ecologie Evolution, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon.

Correspondance thiery@bordeaux.inra.fr

broyées en poudre fine et incorporées à un substrat alimentaire classique pour les papillons fabriqué à base d'agar. Cette alimentation est ensuite coulée dans des tubes eppendorf (figure 1) de 1,5ml à raison d'1 ml par tubes et des chenilles fraîchement écloses sont déposées individuellement à l'aide du fin pinceau dans chaque tube. Nous incorporons 8 % de baies de raisin (matière sèche) à ce substrat, ce qui correspond environ à 5-10g de baies fraîches par chenille. Les résultats présentés sont obtenus avec des chenilles de notre élevage et des baies au stade fermeture de la grappe.



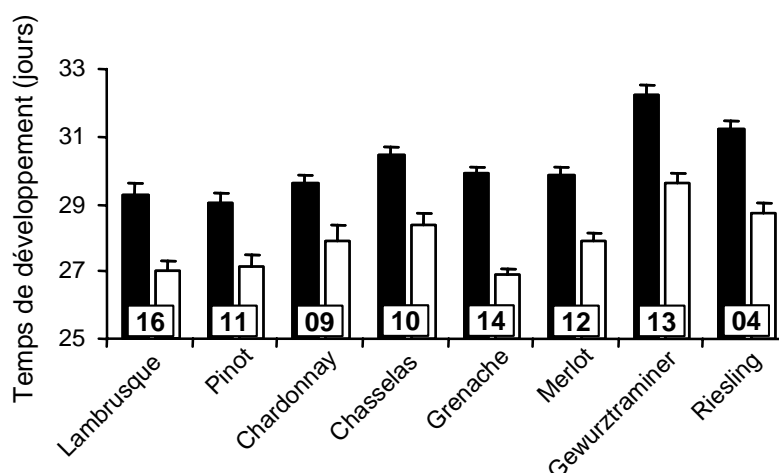
Figure 1 : Tube permettant l'élevage individuel des chenilles de vers de la grappe. Il est rempli de substrat alimentaire enrichi du cépage à tester. Il permet un complet développement de la chenille jusqu'à l'émergence d'un adulte. Une centaine de tube est observée pour chaque cépage.

2. CONTRAINTES

Il est indispensable de travailler avec des chenilles fraîchement écloses (de 6 à 12h maximum d'âge) et d'apporter beaucoup de soin à leur manipulation : le stade néonate étant un stade fragile et critique pour la suite du bon développement. Les variations de facteurs climatiques (température, hygrométrie et photopériode) jouant également un grand rôle, il est donc indispensable de réaliser ces tests en chambres régulées.

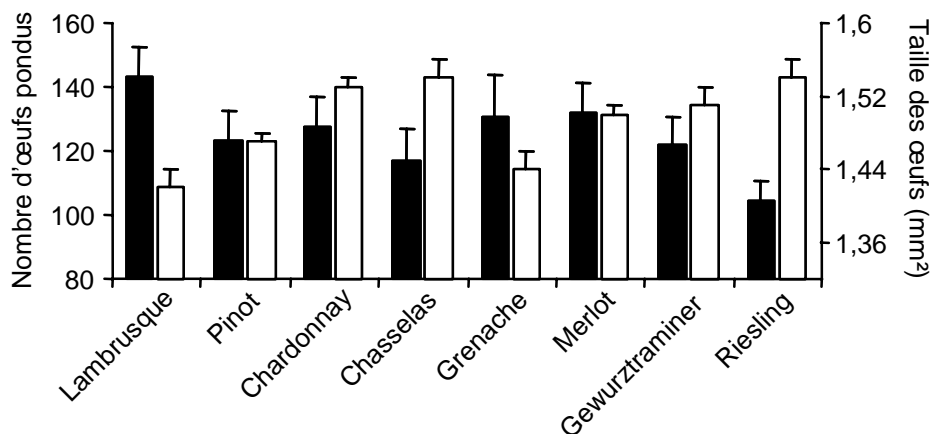
3. RESULTATS

3.1. Temps de développement des mâles (moyenne \pm écart-type, en blanc) et des femelles (moyenne \pm écart-type, en noir) de *Lobesia botrana* (de l'éclosion de l'œuf jusqu'à l'émergence de l'adulte) en fonction des cépages où les larves ont effectué leurs développements.



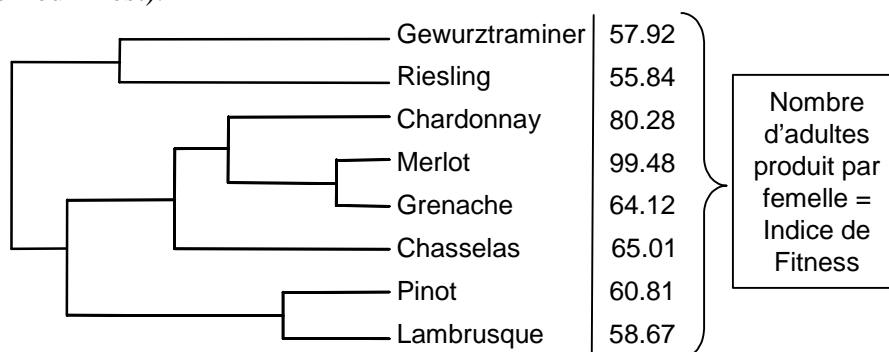
Quel que soit le cépage, les mâles se développent plus vite que les femelles. De plus, la durée de développement de chacun des sexes est différente selon le cépage considéré. Le nombre encadré correspond au taux de mortalité larvaire (% de larves mortes) recensé durant l'expérience. Ce taux de mortalité reste relativement faible quel que soit le cépage considéré.

3.2. Nombre total d'œufs pondus (moyenne \pm écart-type, en noir) avec la taille des œufs (moyenne \pm écart-type, en blanc) correspondante durant la totalité de la vie des femelles en fonction du cépage où les larves ont effectué leurs développements.



Il ressort de ces résultats que les femelles de *Lobesia botrana* peuvent avoir deux stratégies de reproduction distinctes. Soit les femelles pondent des œufs en grande quantité mais de petite taille (Lambrusque, Pinot) ou soit elles pondent des œufs de plus grosses tailles mais en plus petite quantité (Riesling, Gewurztraminer), les autres cépages résultant d'un compromis entre les deux.

3.3. Classification hiérarchique des différents cépages basée sur le temps de développement moyen des femelles avec l'indice de fitness correspondant. Cet indice de fitness correspond au nombre d'adultes produit par 100 femelles de *Lobesia botrana* (plus il est élevé, meilleur il est).



Il est calculé sur la base des traits d'histoires de vie évalués durant cette expérience (succès de reproduction, fécondité, probabilité d'éclosion des œufs et survie larvaire jusqu'au stade adulte). L'analyse hiérarchique révèle 3 groupes de cépages : un groupe composé du Pinot et du Lambrusque où le temps de développement larvaire est le plus court, un deuxième groupe composé du Gewurztraminer et du Riesling où le temps de développement est le plus long et un troisième groupe correspondant au cépage où le temps de développement est intermédiaire. L'indice de fitness est le plus élevé pour les cépages où les chenilles effectuent un temps de développement intermédiaire.

4. CONCLUSION

Les 7 cépages testés, ainsi que le lambrusque, ne représentent pas les mêmes qualités alimentaires pour les chenilles d'eudémis et cela se traduit par des différences relativement importantes dans les traits d'histoires de vie mesurés. Ce type de comparaison montre clairement que le cépage consommé par la chenille modifie, parfois de manière importante, les variables liées au succès reproducteur de la génération suivante. Elle montre aussi clairement que l'eudémis de la vigne ne présente pas la même adaptation aux différents cépages. Comme cet insecte est polyphage, donc capable de se développer sur d'autres plantes, nous retrouvons le même type de résultat en comparant avec le même protocole différentes plantes hôtes de cet insecte (Thiéry et al. 2004). Nous pensons que ce type de résultat contribue à expliquer les différences de niveaux de populations et de dégâts observés dans les vignobles où les femelles des papillons peuvent facilement se déplacer et choisir entre différents cépages.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons tous nos remerciements à Louis Bordenave et à ses collègues de l'URIV (Bordeaux) pour la disponibilité et l'excellente qualité des grappes de différents cépages dont nous avons pu disposer. Travail réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'INRA de Bordeaux et l'Université de Neuchâtel (Suisse).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fermaud, M. (1998) - Cultivar susceptibility of grape berry clusters to larvae of *Lobesia botrana* (Lepidoptera Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 91, 974-980.
- Gabel, B. and Roehrich, R. (1995) - Sensitivity of grapevine phenological stages to larvae of European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. & Schiff. (Lep. Tortricidae). *Journal of Applied Entomology*, 119, 127-130.
- Heywood, V. and Zohari, D. (1995) - A catalogue of the wild relatives of cultivated plants native to Europe. *Flora mediterranea*, 5, 375-415.
- Maher, N., Jolivet, M. and Thiéry, D. (2001) - Oviposition preference of the European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) for different vine cultivars. Influence of chemical stimuli from the fruit surface. *IOBC/wprs Bulletin*, 24 (7), 103-108.
- Maher, N. and Thiéry, D. (2003) - Bunch extracts of *Vitis vinifera* at different development stages stimulates oviposition in *Lobesia botrana* females. *IOBC/wprs Bulletin*, 26 (8), 135-139.
- Moreau, J., Benrey, B. and Thiéry, D. (2004) - Grape varieties differentially affect larval performance and female reproductive output of European grapevine moth. *Soumis à Oikos, mars 2004*.
- Thiéry D. and Gabel B. (2001)- Comportement de ponte des femelles d'eudémis de la vigne en présence d'extraits de fleurs de Muller Thurgau. *IOBC/wprs Bulletin*, 23 (4), 135-137
- Thiéry, D. and Maher N. (2004) - Evaluer les préférences de la femelle d'eudémis entre cépages de vigne (*This issue*).

UN TEST D'ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DE LA LUZERNE AU PUCERON DU POIS, RÉALISÉ AU STADE PLANTULE

*Isabelle Badenhauer¹, René Bournoville¹, Serge Carré¹, Christine Girousse,¹
avec la participation technique de Marilyn Vandier¹*

Le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum*, est l'un des principaux ravageurs de la luzerne cultivée, *Medicago sativa* L.. La méthode proposée est un test pour évaluer la tolérance des plantules de luzerne soumises à une infestation aphidienne standardisée en conditions contrôlées. Ce test peut être appliqué à la luzerne cultivée *Medicago sativa* (Bournoville et al., 1999a) et aux luzernes annuelles. Son intérêt réside dans le grand nombre de plantes qu'il permet de tester par rapport aux méthodologies qui étaient disponibles.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Les plantes et l'unité expérimentale

Les graines de luzerne sont mises à germer à température ambiante 2 à 3 h sur du papier filtre humide dans une boîte de Pétri, placées ensuite à 8-10°C pendant 48 h, puis à 20°C. Après 3 ou 4 jours, quand les cotylédons s'ouvrent et que les jeunes racines font 1 cm de long, les plantules sont repiquées dans une plaque multipots de 50 alvéoles (dimensions de l'alvéole : L, l, h= 23, 23, 30 mm) contenant un mélange de sable, de terre végétale et de terreau stérilisé à la chaleur pour détruire les pathogènes et autres graines. Chaque plaque constitue une unité expérimentale (Photo 1). Elle est déposée dans une boîte en polystyrène cristal dont le fond est perforé, et dont le couvercle est évidé et pourvu d'un fin grillage. Des aérations sont aménagées sur les côtés (Photo 1). La boîte est posée sur un tapis mouillé à saturation. Le tout est placé dans une chambre de culture à 20°C ± 2°C, avec une photopériode 16L/8D, et à une humidité relative de 70% à 90%. L'intensité lumineuse est de 95 µmol/m²/s à 75 cm au dessus des plantules. L'arrosage doit être régulier et surveillé.

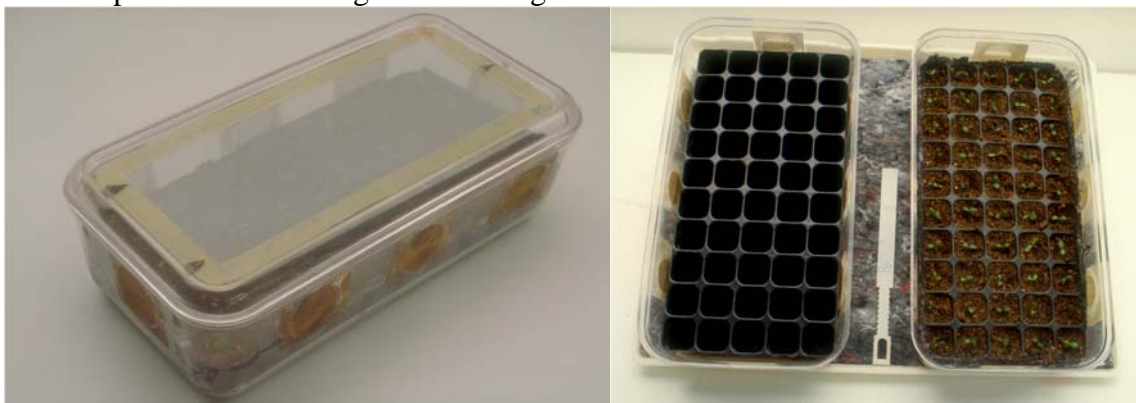


Photo 1 : plaque multipots (Photo : S.Carré, INRA)

1.2. Les pucerons

Les résultats de nos travaux montrent l'existence de races d'hôtes chez le puceron du pois (Bournoville et al., 2003). Par exemple, des populations de pucerons prélevées sur le pois sont

¹ I.N.R.A., Laboratoire de Zoologie, 86600 Lusignan

génétiquement différentes de populations d'*A. pisum* se multipliant sur la luzerne, et ne sont pas capables de s'alimenter sur cet hôte. Ainsi, pour tester la résistance de la luzerne, il est important de prélever des pucerons sur la luzerne et de les maintenir en élevage sur cette même plante hôte pour supprimer un effet indésirable lié à l'existence de ces races différentes. Les pucerons prélevés dans les luzernières sont mis en élevage dans des cages contenant des plantes d'un cultivar sensible de luzerne. Les plantes peuvent être fournies en pots, ou sous forme de brins (50) coupés et mis dans une fiole de Erlenmeyer avec de l'eau. Les cages sont maintenues en chambre de culture à 21°C, avec une photopériode 16L/8D, et une humidité relative de 75%. Durant la phase de transfert en cage, la qualité sanitaire des pucerons doit être surveillée afin d'éviter d'introduire des parasites dans les élevages. Il est nécessaire d'éliminer rapidement les pucerons « momifiés ». Un indice de bonne santé des pucerons est le poids individuel des adultes. Un poids moyen <1.5 mg traduit une souche en mauvais état qu'il faut améliorer avant de l'utiliser.

1.3. Modalités d'infestation

Les plantules sont infestées une journée après leur repiquage, à D_0 , quand les cotylédons sont ouverts, avec une biomasse de pucerons qu'on a déterminée expérimentalement. La plus petite biomasse suffisante pour détecter des différences entre des cultivars sensibles et des cultivars résistants est de 150 mg de pucerons par unité expérimentale. Cette infestation est renouvelée une fois à $D_0 + 6$. Il faut prendre soin à manipuler les pucerons avec précaution (au pinceau) pendant leur pesée en particulier, et à bien répartir la biomasse aphidienne au dessus de l'ensemble des plantules. Dans cette biomasse, se trouvent tous les stades de développement des pucerons depuis la petite larve de premier stade jusqu'à l'adulte. L'infestation est stoppée par une pulvérisation de deltaméthrine à D_0+13 . Les boîtes plastiques sont alors laissées ouvertes dans la chambre de culture pour permettre la croissance des plantules jusqu'à D_0+27 , date à laquelle on peut procéder à la lecture du test.

1.4. Notations, lecture du test et cultivars de références

Ce test permet de mesurer la tolérance des plantules aux pucerons, et non la mortalité ou la fécondité des pucerons. De ce fait, les notations portent sur l'état des plantules. A D_0+27 , chaque plantule est classée dans l'une des 3 catégories suivantes : morte, flétrie, ou saine. Quand une plantule est déclarée saine, on note son stade de développement exprimé en nombre de feuilles : C= cotylédons, L_0 = première feuille unifoliée, L_i = i feuilles trifoliées. Cette notation permet de prendre en compte des retards de croissance. Le poids sec des plantules survivantes est également déterminé. La principale variable utilisée pour comparer les résultats est le pourcentage de plantules mortes et flétries. Un cultivar résistant présente moins du tiers de mortalité des plantules, un cultivar sensible excède les deux tiers, entre les deux se situe une classe intermédiaire. Les références de résistance et de sensibilité utilisés sont respectivement le cultivar nord américain Cuf101, et le cultivar français Milfeuil.

1.5. Le dispositif de test

Dans un essai préliminaire on a comparé le dispositif en situation de choix et de non choix (Girousse et al., 1999). Les résultats obtenus sont identiques pour chacun des cultivars qu'il soit en situation de choix ou de non choix. En conséquence, on préconise plutôt des tests en situation de non choix pour plus de facilité de mise en œuvre.

Le dispositif de test comporte toujours un témoin de sensibilité infesté et si possible un témoin non infesté.

1.6. Le nombre de répétitions

Sur la base de la variabilité des taux de mortalité du cultivar Milfeuil entre plusieurs unités expérimentales et entre différents tests, nous avons montré que 6 unités expérimentales par modalité sont nécessaires pour mettre en évidence des différences de 20% de mortalité entre 2 modalités expérimentales ($\alpha=0.05$, $\beta=0.1$). Les résultats sont proches pour les médics.

2. RESULTATS

2.1. Evaluation du progrès génétique d'un cultivar sensible de *M. sativa*, après plusieurs cycles de sélection

Un lot initial (P0) du cultivar sensible Milfeuil a été soumis à 4 cycles de sélection successifs (P1 à P4). Le test plantule réalisé sur P0, P2, P4 et le témoin de résistance Cuf101 donne les résultats suivants : à D_0+27 , le pourcentage (p) de plantules mortes+flétrées est pour le lot initial P0 $p=66.6\%$, pour P2, il est statistiquement identique à P0 avec $p=74.9\%$. Pour P4 on note $p=31.8\%$, tandis que la référence résistante Cuf101 présente $p=14.9\%$ de plantules mortes et flétrées. Ces résultats montrent qu'il faut attendre le 4^{ème} cycle de sélection pour que le niveau de résistance soit amélioré (Bournoville et al., 1999b).

2.2. Recherche de sources de résistance chez les médics

Peu d'éléments étaient publiés sur la résistance des médics au puceron du pois. Nous avons réalisé avec la méthodologie décrite un screening préliminaire sur 45 accessions de médics d'origines géographiques variées (Australie, France, Crête, Algérie, Espagne, Grèce, Israël) (Bournoville et al., 2004). A l'issue de ce test, une dizaine d'accessions ont été retenues pour présenter des taux de résistance extrêmement élevés (plus de 90% de plantules survivantes). Il s'agit d'accessions de *M. truncatula* et de 2 écotypes de *M. littoralis*. Une illustration de résultats observés est donnée dans le tableau 1 pour 4 cv de médics d'origine australienne de *M. truncatula* (cv Jemalong et Cyprus), *M. tornata* (Murrayland) et *M. littoralis* (Harbinger).

	Jemalong	Cyprus	Murrayland	Harbinger
% de mortalité des plantules	91.0	96	0	9.3
Poids secs des plantules /unité (mg)	35.7	29.5	808.3	581.6

Tableau 1 : Comparaison de 4 cultivars de médics sur la base du test plantule

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthodologie présentée est transférée auprès des sélectionneurs de luzerne. Son extension aux médics, en particulier à des cultivars de *M. truncatula*, a permis de mettre en évidence l'existence de sources de résistance de niveau élevé, ce qui n'est pas le cas chez *M. sativa*. Elle a servi également dans le cadre des études fondamentales menées sur la variabilité géographique des populations du puceron du pois et sur ses races d'hôtes, et dans l'analyse du déterminisme génétique de la résistance de la luzerne au puceron du pois.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bournoville, R., Landre, B., Aupinel, P., Girousse, C., Badenhausser, I., 1999a. Description et mise en œuvre d'une méthodologie d'estimation de la résistance variétale de la luzerne au puceron du pois. *Fourrages*, 158 :157-168.
- Bournoville, R., Girousse, C., Badenhausser, I., Blondeau, P., Imwinkelried, J., Ecalle, C., 1999b. Gain de résistance variétale de la luzerne au puceron du pois, estimé par deux critères lors de générations de sélection. In : 5^{ème} Conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier, 7-9 décembre 1999. ed. ANPP (Paris), 2, 461-468.
- Bournoville, R., Carré, S., Jacquard, M., Meunier, N., 2003. Puceron du pois : des populations spécialisées sur la luzerne et le pois. *Phytoma, La Défense des Végétaux*, 559, 25-27.
- Bournoville, R., Carré, S., Badenhausser, I., Fortini, D., Raboteau, D., 2004 Etude des interactions entre *Medicago truncatula* et le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* – Prolongement de l'étude à d'autres médics apparentées. In *Bilan de l'ATS «Génétique et génomique de la légumineuse modèle Medicago truncatula*.
- Girousse, C., Bournoville, R., Badenhausser, I., 1999. Evaluation of alfalfa resistance to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* Harris. Methodological aspects to improve a standardized seedling test. *Phytoprotection*, **79**, 139-148.

RESISTANCE AU PUCERON *Aphis gossypii* CONFÉRÉE PAR LE GÈNE *VAT* DU MELON : TEST DIAGNOSTIC UNIQUE DE L'ANTIXÉNOSE ET DE L'ANTIBIOSE

Eric Lombaert, Christine Piotte, Michèle Salles, Xavier Fauvergue¹

Chez le melon, il existe une résistance, conférée par le gène *Vat*², à la colonisation par le puceron *Aphis gossypii*. Cette résistance s'exprime d'une part par une antixénose³ et d'autre part par une antibiose⁴. Des variétés possédant ce gène sont commercialisées depuis plus de 10 ans, et on peut donc craindre le développement de pucerons capables de surmonter la résistance conférée par *Vat*. Afin de déterminer l'ampleur éventuelle d'un tel contournement par le ravageur, il est nécessaire d'être capable d'évaluer de manière fiable la virulence des différentes souches d'*Aphis gossypii* prélevées sur le terrain. Nous proposons ici une méthode simple permettant de diagnostiquer rapidement à la fois le niveau d'antixénose et d'antibiose.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 Préparation du matériel végétal

L'expérience porte sur des plants de melon au stade « 5 feuilles ». Deux variétés quasi-isogéniques sont utilisées : Margot (qui possède le gène *Vat*) et Vedrantaïs (qui ne possède pas le gène *Vat*). Cinq plants de chacune des deux variétés sont utilisés pour le test d'une souche d'*Aphis gossypii*. Les melons sont plantés en pots de 0,4 litres, et leur croissance s'effectue en phytotron à environnement contrôlé (25°C, 65% HR, L16 : D8). Un tuteur est placé le long de la tige afin de maintenir chaque plant vertical, et de manière à éviter d'avoir un recouvrement des différentes feuilles.

1.2 Préparation des pucerons

Le nombre de souches d'*Aphis gossypii* testées peut être très variable, mais il est nécessaire de posséder une ou deux souches témoins dont on connaît le comportement vis-à-vis de *Vat*. Pour chacune des souches, un élevage synchrone sur concombre (pour que l'effet « changement de plante hôte » soit le même pour tous les individus) est nécessaire en environnement contrôlé (20°C, L16 : D8) de manière à posséder pour le début de l'expérience 40 femelles devenues adultes depuis deux ou trois jours. Afin de limiter les problèmes liés aux effets maternels (notamment la production d'ailés), il est nécessaire de prévoir pour chaque souche un développement d'au moins deux générations dans des conditions optimales de densité, de nourriture, de température et de photopériode.

1.3 Infestation des plants

Il s'agit d'une expérience factorielle avec deux niveaux de traitement : la variété du melon et la souche d'*Aphis gossypii*. Le nombre de modalités est donc égal au nombre de variétés de plantes utilisées (deux) multiplié par le nombre de souches de pucerons à tester. L'unité

¹ UMR 1112 ROSE Réponse des Organismes aux Stress Environnementaux, INRA de Sophia Antipolis, 400 route des Chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex.

² *VAT* = Virus Aphid Transmission (Pitrat et Lecoq 1980, 1982).

³ Impact sur le comportement de l'insecte (non-acceptation de la plante hôte).

⁴ Impact sur la physiologie de l'insecte (diminution de la croissance, de la fertilité, de la survie, etc.).

expérimentale est la feuille de melon. Pour chaque modalité, vingt répétitions sont effectuées : une répétition est constituée par une feuille infestée par un puceron. Pour chacun des plants, un anneau de glue est placé à la base de quatre feuilles, ainsi qu'à la base du plant. Chacune des quatre feuilles est infestée à J_0 avec une femelle de la même souche (figure 1).

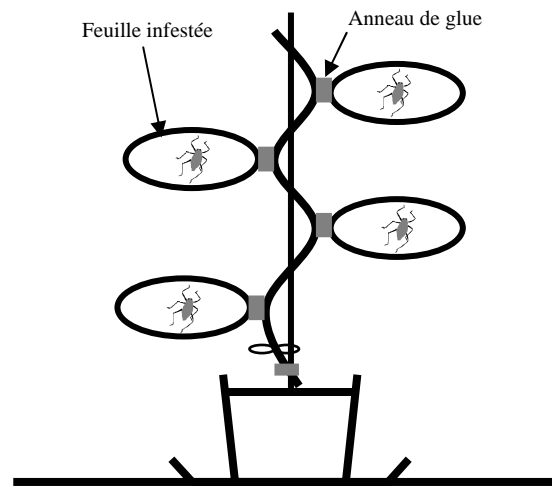


Figure 1 : description de l'infestation

1.4. Mesures

A 24H (J_1), 48H (J_2) et 72H (J_3), la présence ou l'absence de la femelle fondatrice sur chacune des feuilles est vérifiée et notée (elle est considérée comme absente si elle a quitté la feuille, si elle est dans la glue ou si elle est morte sur la feuille). A J_3 , l'ensemble des larves est également compté.

1.5. Analyse et interprétation

L'analyse statistique porte sur le nombre de larves présentes à J_3 . Un des moyens les plus adaptés à la comparaison de moyennes issues de données de comptages est d'effectuer une régression de Poisson. Pour cela, un modèle linéaire généralisé avec une fonction de lien logarithmique est ajusté aux données. Nous testons ainsi l'effet des différents niveaux de traitement. S'il y a un effet variété, on peut en conclure qu'il est dû au gène *Vat*. Toutefois, il s'agit d'un effet cumulé de l'antibiose et de l'antixénose : le nombre de larves comptées à J_3 dépend de la fécondité de la femelle, mais également du nombre de jours pendant lesquels elle est restée sur la feuille. Afin de posséder une estimation de l'antibiose seule, il est possible de rajouter au modèle une variable de régression dont on n'estime pas le paramètre (variable « offset ») qui nous permettra de retirer l'effet de l'antixénose. Dans notre cas, cette variable est le logarithme népérien du nombre de jours de présence de la femelle (plus un, afin d'éviter les zéros). L'antixénose peut être estimée à l'aide d'un indice qui se calcule en divisant, pour chaque souche, le nombre de femelles présentes à J_3 sur Margot par le nombre de femelles présentes à J_3 sur Vedrantaïs. Si cet indice est égal à un, on peut supposer que *Vat* n'a pas d'influence sur le comportement de la souche considérée. Au contraire, plus l'indice diminue et s'approche de zéro, plus l'antixénose liée au gène *Vat* est forte.

2. EXEMPLE DE RESULTATS : ETUDE DE QUELQUES SOUCHES D'*Aphis gossypii*

Au printemps 2003, plusieurs souches d'*Aphis gossypii* ont été prélevées dans la région PACA afin de déterminer l'ampleur du contournement de la résistance *Vat* en culture de melon. Examinons le cas de deux souches prélevées à l'intérieur de serres de melons résistants : la souche EL 83 issue d'une colonie peu abondante, et la souche EL 90 qui provient au contraire d'une infestation importante. La virulence vis-à-vis de *Vat* de ces souches ainsi que de deux souches de laboratoires (NM1 et C9) a été testée.

L'analyse des données, faite à l'aide des logiciels SAS (SAS Institute Inc. 1999), nous indique que, d'une manière globale, il existe un très fort effet de la souche d'*Aphis gossypii* ($p < 0,0001$) ainsi que de la variété de melon ($p < 0,0001$). La figure 2a représente l'antibiose

seule en exprimant les résultats prédits par le modèle linéaire généralisé (nombre de larves produites par jour et par femelle) en fonction de la variété. On peut y observer la grande variabilité qui existe entre les différentes souches, ainsi que l'impact important de *Vat*. Ces différentes constatations se traduisent de la même manière au niveau de l'antixénose (figure 2b).

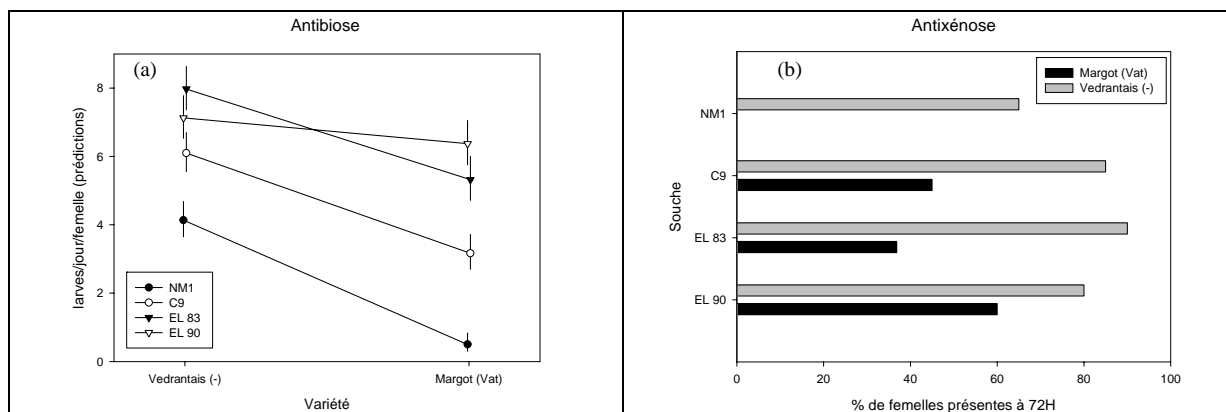


Figure 2 : (a) antibiose : nombre de larves pondues par jour et par femelle en fonction de la variété et selon les prédictions du modèle linéaire généralisé ; (b) antixénose : taux de présence des femelles à j_3 selon la souche de puceron et la variété de melon.

Le tableau 1 synthétise l'ensemble des résultats. Au niveau de l'antibiose, toutes les souches sont fortement affectées par *Vat*, à l'exception de la souche EL 90 qui ne présente pas de fécondité significativement différente sur Margot et sur Vedrantais (figure 2a). L'antixénose s'exprime quant à elle sur chacune des quatre souches, mais avec des intensités très variables. Au final, aucune des souches ne contourne le gène *Vat* : l'effet cumulé de l'antibiose et de l'antixénose est significatif pour toutes les souches. Toutefois, il existe une grande variabilité de réponses, et EL 90 présente par exemple un profil beaucoup moins sensible à *Vat* qui lui permet probablement de se développer beaucoup plus efficacement que les autres souches sur du melon résistant. Ce résultat est d'ailleurs confirmé par le succès de la colonisation par cette souche de la serre dans laquelle il a été échantillonné.

Souche	Provenance	Antibiose	Antixénose	Antibiose + Antixénose
NM1	Souche témoin labo	***	0	***
C9	Souche témoin labo	***	0,53	***
EL 83	Serre Carpentras	***	0,41	***
EL 90	Serre Carpentras	ns	0,75	***

Tableau 1 : tableau récapitulatif de l'impact du gène *Vat* sur chacune des quatre souches d'*Aphis gossypii* testées (*** = $p < 0,0001$; ns = $p > 0,05$).

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En comparaison avec les tests d'antibiose et d'antixénose classiques, la méthode exposée ici présente plusieurs avantages : elle est unique pour les deux types de réponse, elle est rapide, elle nécessite peu de matériel biologique et elle est très discriminante. Les résultats obtenus ne

restent cependant que des estimations de l'antibiose et de l'antixénose qui sont des phénomènes complexes. Toutefois, la méthode est bien adaptée à la recherche d'un contournement de la résistance *Vat* sur un ensemble de souches d'*Aphis gossypii*. Des tests plus fins peuvent ensuite être entrepris sur les souches les plus intéressantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pitrat M. et Lecoq H. (1980) Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus transmission by *Aphis gossypii* in *Cucumis melo*. *Phytopathology* 70:986-961.
- Pitrat M. et Lecoq H. (1982) Relations génétiques entre les résistances par non-acceptation et par antibiose du melon à *Aphis gossypii*. *Agronomie* 2:503-508.
- SAS Institute Inc. (1999) SAS/Stat User's Guide, Version 8 - SAS Institute. Cary NC USA.