

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

*Isabelle Badenhauer<sup>1</sup>, René Bournoville<sup>1</sup>, Serge Carré<sup>1</sup>, Christine Girousse,<sup>1</sup>  
avec la participation technique de Marilyn Vandier<sup>1</sup>*

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/m<sup>2</sup>/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

<sup>1</sup> 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<sup>ème</sup> 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<sup>ème</sup> 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.