

# Test en conditions contrôlées de la résistance variétale de la luzerne au puceron du pois

R. Bournoville<sup>1</sup>, B. Landré<sup>2</sup>, P. Aupinel<sup>2</sup>,  
C. Girousse<sup>1</sup>, I. Badenhausser<sup>1\*</sup>

La normalisation d'un test d'évaluation de la résistance variétale de la luzerne au puceron du pois est présentée. Elle permet la réalisation de tests fiables et répétitifs, fondés sur la survie de plantules infestées au stade "cotylédons ouverts" avec une biomasse donnée de pucerons multipliés avant le test.

## RÉSUMÉ

La procédure standardisée en conditions contrôlées décrite permet de réaliser des tests d'évaluation de la résistance variétale de la luzerne (au stade plantule) au puceron du pois. L'unité élémentaire de test, contenant 50 plantules, est infestée par 150 mg d'aphides au stade "cotylédons ouverts", puis à nouveau 6 jours après ; l'infestation est stoppée au 13<sup>e</sup> jour. La notation de l'état des plantules intervient au 27<sup>e</sup> jour et s'intéresse au pourcentage de plantes mortes. Les cultivars résistants présentent moins du tiers de mortalité, et les cultivars sensibles, plus des deux tiers. Six unités élémentaires sont nécessaires pour séparer deux cultivars dont les moyennes de mortalité diffèrent d'au moins 20%. Au cours du test, il faut particulièrement surveiller l'arrosage des plantules et l'éventuelle attaque par d'autres insectes (diptères Sciaridae, thrips californien).

\* Avec la collaboration technique de C. DUPONT<sup>2</sup>, F. MALINAUD<sup>2</sup>

## MOTS CLÉS

*Acyrtosiphon pisum*, cultivar, luzerne, méthode, puceron du pois, test de résistance.

## KEY-WORDS

*Acyrtosiphon pisum*, cultivar, luzerne, method, pea aphid, standard test resistance.

## AUTEURS

1 : I.N.R.A., Unité de recherches de Zoologie, F-86600 Lusignan.

2 : I.N.R.A., Unité expérimentale de Zoologie, Le Magneraud, BP 52, F-17700 Surgères.

## 1. Présentation

### ■ Le puceron du pois, un phytophage d'importance agronomique

Le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* Harris est **une espèce d'insecte caractérisée par sa constance et sa dominance dans les luzernières françaises** (BOURNOVILLE, 1978). Il peut accomplir la totalité de son cycle, incluant la phase sexuée et le dépôt d'oeufs hivernants, sur les productions fourragères. Cet insecte est présent dans la quasi-totalité des prélèvements réalisés sur une luzerne en pousse active, ses effectifs représentent les trois quarts des phytophages d'importance agronomique (BOURNOVILLE et CANTOT, 1980). Sa nuisibilité est liée au niveau de ses populations et, dans les conditions françaises, le niveau de risque est estimé à 3 000 aphides par unité de prélèvement (25 coups de filet) selon BOURNOVILLE et CANTOT (1980). Dans les zones de production de luzerne déshydratée et en particulier en Champagne, cet insecte peut atteindre ou dépasser ce niveau, au printemps (BOURNOVILLE, 1978) ou à l'automne (THIEULEUX, 1988). Plus récemment, depuis 1995, les cultures de luzerne porte-graines ont eu à supporter de très fortes pullulations printanières d'*A. pisum*, impliquant l'emploi d'insecticides (HACQUET, 1997). Cette situation reflète ce qui existe au niveau européen, puisque les enquêtes menées tant en production fourragère (BOURNOVILLE, 1976) qu'en production grainière de luzerne (BOURNOVILLE et al., 1984), situent *A. pisum* **dans le trio de tête des insectes d'importance agronomique**. Au niveau mondial, la répartition de cette espèce de puceron, probablement paléarctique à l'origine, s'est considérablement étendue par suite d'introductions accidentelles, qui en ont fait dans ces nouvelles zones un ennemi redouté pour la production de luzerne dans l'hémisphère nord (Etats-Unis) comme dans l'hémisphère sud (Amérique du Sud, Australie).

Par son mode d'alimentation, **le puceron du pois exerce son action directe sur sa plante-hôte en prélevant des assimilats**. Les travaux relatifs aux effets du puceron du pois sur la luzerne, en conditions extérieures, ont relevé une diminution de la croissance des tiges et de la production de matière sèche (CUPERUS et al., 1982), la résistance aux conditions hivernales étant également altérée (HARPER et LILLY, 1966). En conditions contrôlées, BADENHAUSSER et al. (1994) signalent qu'une population atteignant 300 aphides par tige en 12 jours à partir d'un inoculum de 2 pucerons par tige réduit la longueur des tiges de luzerne de 30% et le poids de matière sèche de 36%.

### ■ Cadre des recherches

GAYRAUD (1994) rapporte que les objectifs de la création variétale de la luzerne en France évoluent avec les besoins du marché. Si la résistance à la verse reste un élément important, la résistance aux ennemis et maladies devient une préoccupation majeure liée à la mise en évidence de l'action limitante des ennemis des cultures. Ainsi, LONNET (1996) signale qu'à moyen terme **les sélectionneurs français**

se sont donné comme objectif d'améliorer la résistance de la luzerne au puceron du pois. Après la mise au point de tests de résistance au pathogène *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth. (GONDRAN, 1978), et au nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Fil. (LECLERCQ et CAUBEL, 1991), les sélectionneurs français rassemblés au sein de l'Association de Créateurs de Variétés Fourragères (ACVF) se sont préoccupés, à partir de 1991, de **disposer d'une méthodologie d'évaluation de la résistance** de la luzerne envers *A. pisum*. Nous avons antérieurement indiqué (BOURNOVILLE, 1977) qu'un paramètre biologique de l'aphide (son taux de reproduction lors des deux premières semaines de reproduction) est un critère pouvant guider le classement variétal de la luzerne pour sa résistance au puceron du pois. Cette méthode, qui reflète les effets d'antibiose exercés par les plantes sur les pucerons, n'est cependant pas adaptée à une mise en oeuvre en série qui permette le criblage d'un grand nombre de cultivars.

**Aux Etats-Unis**, l'organisation de la lutte contre *A. pisum* dans la production fourragère de luzerne a utilisé depuis longtemps des méthodes alternatives à la lutte chimique, en développant la sélection de variétés résistantes. **Des méthodes ont été publiées** pour évaluer le classement variétal, **qui prennent en compte l'état des plantules soumises à une infestation massive de pucerons**. Elles sont périodiquement réactualisées, la dernière publication orientée vers les besoins des sélectionneurs étant celle de BERBERET *et al.* (1991). Si ces informations ont constitué une base des travaux que nous avons développés à partir de 1991, elles ont dû être complétées, afin de lever des incertitudes. Dans une précédente publication (GIROUSSE *et al.*, 1999), nous décrivons des éléments qui traitent de la plante - hôte d'élevage des pucerons utilisés pour l'infestation des plantules de luzerne, des conditions de présentation des cultivars (en mélange dans chaque unité expérimentale ou en présentation séparée) et nous précisons le nombre de répétitions nécessaires pour distinguer plusieurs génotypes.

**Cette publication complète la normalisation du test et fournit des éléments applicables en sélection afin de disposer d'une technique simple, fiable, répétitive et comparative** utilisable par plusieurs expérimentateurs. Elle concerne l'optimisation de la production de pucerons, les conditions d'installation du test (conditions d'ambiance, matériel de confinement des plantes) et d'infestation des plantules, et les types de notations réalisées. D'autre part, elle présente des exemples représentatifs de sa mise en pratique et examine quelques interférences à éviter.

## 2. La méthodologie : description du test

L'ensemble des opérations décrites ci-dessous se déroule **en conditions contrôlées de température et de photopériode**. Celles-ci ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , et 16 heures de photophase) garantissent une multiplication optimale des formes parthénogénétiques des pucerons. Elles offrent également une sécurité dans l'organisation du test en permettant de garantir un calendrier d'exécution.

## ■ Préparation de l'inoculum de pucerons servant au test

Il s'agit d'une population d'une forme verte du puceron *A. pisum*, prélevée dans une luzernière et maintenue sur un cultivar sensible de *Medicago sativa* L. A l'échelle des zones françaises de production de la luzerne, BOURNOVILLE (1981) a montré que la variabilité d'une population d'*A. pisum* prélevée dans une luzernière est représentative de la variabilité de clones du puceron issus de régions géographiquement séparées. **La luzerne peut être utilisée** soit sous forme de plantes en pot, soit **sous forme de brins coupés**. D'après notre expérience, la seconde technique qui permet un contrôle sanitaire de l'état des brins est préférable. Ces derniers sont prélevés au stade végétatif et lavés dans une solution d'eau additionnée de mouillant afin d'éviter l'introduction d'insectes de petite taille (thrips, punaises prédatrices). Une fois essuyées sur du papier filtre, les tiges sont disposées dans un Erlenmeyer (500 ml) placé dans une cage aux parois grillagées. Un inoculum initial de 100 mg de pucerons est placé sur 10 brins durant une semaine. Après ce temps, la population de pucerons présente est reportée sur 30 nouveaux brins afin de se multiplier de nouveau pendant une semaine. C'est alors qu'on recueille l'ensemble des populations aphidiennes en secouant les brins de luzerne au-dessus d'un récipient.

**Dans cet échantillon**, qui comporte des pucerons de tous stades, **on isole vingt adultes aptères que l'on pèse individuellement**. La moyenne de ces pesées nous sert à caractériser l'état de la souche. **Puis les pucerons sont répartis par pesée dans des tubes contenant chacun la biomasse infestante (150 mg)** d'une unité élémentaire de test.

## ■ Préparation des plantes et dispositif de test

**Les graines de luzerne du cultivar à tester sont mises à germer** sur du papier filtre humidifié durant 3 jours. Lorsque leurs radicales atteignent environ 1 cm, elles **sont repiquées une par une dans une plaque alvéolée de 50 multipots** (dimensions unitaires de l'alvéole : L=23 mm, l=23 mm, h=30 mm). Le substrat de culture contenu dans les alvéoles est un mélange à parts égales de sable, de compost et de terre chauffée à 80°C, afin de détruire les pathogènes et les graines adventices. **Chaque plaque alvéolée est placée dans une boîte de polystyrène** (parallélépipède rectangle de 26 cm de long, 13,5 cm de large et 8 cm de haut), **le tout constituant l'unité élémentaire**. Les parois de la boîte sont pourvues de 8 orifices grillagés permettant son aération. Son couvercle entièrement amovible est garni d'un fin grillage. Son fond est percé d'une vingtaine de trous qui permettent à l'eau, contenue dans un plateau placé sous l'unité, d'humidifier la terre. Ceci est facilité par la disposition d'une nappe d'arrosage au fond de la boîte sur laquelle on pose la plaque alvéolée. Les bords de cette dernière sont également coincés par des découpes de nappe d'arrosage afin d'éviter que les pucerons s'égarer à l'intérieur du dispositif.

## ■ Conditions de standardisation du test

Les éléments publiés disponibles et notre propre expérience nous conduisent à proposer plusieurs points de normalisation du test. **L'estimation du classement d'un cultivar est réalisée sur 7 unités élémentaires** de ce cultivar infestées d'aphides. On y adjoint **2 unités témoins du même cultivar, non infestées** par les pucerons, qui permettent de surveiller la bonne évolution de plantules en l'absence de pucerons. Dans les conditions expérimentales de notre pièce climatisée qui offre 4,5 m<sup>2</sup> d'étagères, cela permet d'inclure 6 cultivars dans un même test de criblage.

**Dès que les plantules repiquées atteignent le stade de l'étalement des cotylédons**, ce qui est généralement obtenu le lendemain de leur repiquage, **on réalise une première infestation par les aphides en répartissant une biomasse de 150 mg d'aphides de tous stades par unité élémentaire**. Cette biomasse est adaptée au volume interne de l'unité de test. Les éléments publiés antérieurement (GIROUSSE *et al.*, 1999) mentionnaient des unités de plus grand volume (42 dm<sup>3</sup>) imposant par conséquent des biomasses aphidiennes plus élevées, ce qui nécessitait plus d'efforts pour leur production. **Au bout de 6 jours, on réalise une notation individuelle de l'état des plantules** (saines, chlorosées, flétries, mortes) **et, pour les plantes saines, de leur stade d'évolution caractérisé par le nombre de feuilles** qu'elles présentent.

**Après cette notation, on renouvelle l'infestation avec 150 mg d'aphides par unité expérimentale** ; l'état de la souche infestante d'aphides est caractérisé, comme lors de la première infestation, par la pesée de 20 adultes aptères. **Au treizième jour après l'infestation initiale, une pulvérisation de deltaméthrine (1,5 cm<sup>3</sup>/l) supprime les aphides** des lots infestés. Cette matière active est suffisamment efficace contre les pucerons dans nos conditions de test, et n'entraîne pas d'effet phytotoxique. **On réalise alors une nouvelle notation de l'état et du stade des plantules. Cette notation est répétée au vingtième jour et au vingt-septième jour, moment où le test est arrêté.**

FIGURE 1 : Etat des plantules de luzerne de 2 lignées sensibles (à gauche) et de 2 lignées résistantes (à droite) au puceron du pois, à la fin d'un test (origine : S. CARRE).

FIGURE 1 : State of lucerne seedlings of 2 aphid-susceptible (left) and 2 aphid-resistant (right) strains at the end of a test (source : S. CARRE).



C'est alors qu'on effectue l'évaluation finale qui porte sur la comparaison des pourcentages de plantes saines dans les différents cultivars. La photographie en figure 1 montre la différence de survie de lignées de luzerne résistantes et sensibles au puceron.

### 3. La mise en oeuvre du test et les questions à résoudre

#### ■ Multiplication des pucerons sur brins coupés

Deux expériences incluant chacune 8 répétitions nous ont permis de valider le **protocole de multiplication des pucerons sur des brins coupés de luzerne**. Partant d'une masse de 100 mg d'aphides, les biomasses moyennes recueillies au bout d'une semaine d'élevage sur 10 brins ont été respectivement de 409 mg (écart type :  $s=52$ ) et 464 mg ( $s=59$ ). Après le transfert de ces insectes sur 30 brins on obtient, une semaine plus tard, une production moyenne de 1 199 mg ( $s=179$ ) et 1 415 mg ( $s=160$ ). Ces biomasses conviennent pour infester 7 unités à raison de 150 mg par unité et rétablir le niveau de population des souches pour les multiplications ultérieures.

Dans un ensemble de tests réalisés sur une période d'un an et demi, le poids moyen des pucerons d'une même souche (population recueillie le 29 octobre 1992 dans une luzernière de Lusignan) a été de 2,22 mg ( $s=0,54$ ). Notre expérience nous incite à considérer qu'**en dessous d'un poids moyen des adultes de 1,50 mg la souche a sûrement supporté des conditions d'élevage déficientes** (surpeuplement excessif, mauvaise qualité de la plante - hôte), qui peuvent induire des altérations de l'estimation du niveau de résistance.

#### ■ La réalisation des notations

Le test fournit ses résultats au bout de 27 jours d'expérimentation et c'est au terme de ce délai que s'exprime le classement variétal. Auparavant, des chloroses et des flétrissements se manifestent ; le taux de mortalité des plantes s'accroît jusqu'au 27<sup>e</sup> jour. Les éléments du tableau 1 rapportent l'évolution de deux cultivars de référence, l'un sensible (Milfeuil), l'autre résistant (CUF 101), qui sont respectivement

TABLEAU 1 : Evolution de l'état des plantules infestées (%) lors du test de 2 cultivars, Milfeuil et CUF 101, respectivement sensible et résistant au puceron du pois.

TABLE 1 : Evolution of the state of infested seedlings (%) observed in a test of 2 cultivars, Milfeuil and CUF 101, respectively susceptible and resistant to the pea aphid.

Catégorie de plantules (%)	Saines		Chlorosées		Flétries		Mortes	
	Milfeuil	CUF 101	Milfeuil	CUF 101	Milfeuil	CUF 101	Milfeuil	CUF 101
Calendrier d'expérimentation (jour) :								
J : infestation	100	100						
J + 6	99	95	0	0	1	4	0	1
J + 13 : arrêt de l'infestation	26	89	46	4	26	2	2	5
J + 20	11	84	12	2	8	1	69	13
J + 27	6	79	5	4	7	1	82	16

TABLEAU 2 : Répartition (%) des stades phénologiques des plantules survivantes des cultivars Milfeuil et CUF 101 à la fin d'un test.

TABLE 2 : Distribution (%) of phenological stages in surviving seedlings of cultivars Milfeuil and CUF 101 at the end of a test.

Cultivar	CUF 101		Milfeuil	
	Infesté	Non infesté	Infesté	Non infesté
<b>Nombre de feuilles des plantes survivantes :</b>				
1	1			
2	1		16	
3	2		41	
4	11		30	
5	19	4	8	2
6	31	16	4	6
7	28	46	1	46
8	7	28		36
9		6		10

d'origine française et américaine. **Des plantules sont encore flétries ou chlorosées au 27<sup>e</sup> jour** de l'expérience. Pour l'évaluation finale, ces plantules sont **jointes à la catégorie des plantules mortes** formant un ensemble qui s'oppose aux plantules saines. L'évolution de ces catégories intermédiaires vers la catégorie des plantules mortes nécessiterait de faire durer le test plus longtemps, ce qui ne s'avère pas utile puisque, quand bien même quelques plantes des catégories intermédiaires survivraient, leur mauvais état ne leur permettrait pas de les récupérer pour participer à une génération ultérieure. C'est donc une question d'optimisation de la durée du test que de choisir de l'arrêter à ce moment.

**La notation du stade d'évolution des plantes survivantes (estimé par le nombre de feuilles visibles) à la fin du test est également révélatrice du niveau de résistance du cultivar** (tableau 2). On note un plus grand étalement des stades dans les lots infestés que dans les lots témoins, ainsi qu'un retard de développement d'environ un stade pour un cultivar résistant et de plusieurs pour un cultivar sensible par rapport au témoin non infesté correspondant. Le test  $\chi^2$  réalisé sur les effectifs de plantules de divers stades de développement ne révèle pas de différence entre les lots témoins des variétés Milfeuil et CUF 101 ( $P = 0,46$ ), tandis que les lots infestés sont à chaque fois différents du témoin correspondant ( $P < 0,01$ ), de même que les 2 lots infestés diffèrent entre eux ( $P < 0,01$ ).

### ■ Interférences d'autres facteurs sur l'infestation aphidienne

Plusieurs causes peuvent gêner le bon déroulement du test, malgré sa réalisation en conditions contrôlées. Le faible espace disponible pour les plantules demande qu'on **surveille très attentivement l'arrosage des unités**. Si une dessiccation accidentelle survient, les flétrissements qu'elle provoque doivent être notés, afin d'éliminer les plantes concernées de l'estimation de l'action aphidienne.

D'autres difficultés peuvent provenir de la **présence accidentelle d'insectes**. Le terreau qui sert aux plantations peut être contaminé par **des larves de Diptères Nématocères de la famille des Sciaridae**. Il s'agit de petites larves apodes fusiformes, de couleur

blanche, à tête brunâtre. Les larves de certains *Sciaridae* (*Bradysia* spp.) prédisposent la luzerne et le trèfle violet aux fusarioses, et ils sont mis en cause dans la vécition de la verticilliose (GILLESPIE et MENZIES, 1993). Vivant dans l'humus, ces larves peuvent attaquer les jeunes plantules entraînant leur dépérissement rapide. C'est la rapidité de ce symptôme qui doit alerter l'expérimentateur. Les plantules sont attaquées dans la zone hypogée. Le soin apporté à la stérilisation du terreau ainsi que la couverture de toute les unités d'expérimentation permettent de se prémunir contre ce type d'attaque et de prévenir la ponte des adultes dans le terreau. Un autre insecte ne doit pas être introduit dans les élevages de pucerons. Il s'agit d'un **Thysanoptère, le thrips californien**, *Frankliniella occidentalis* Pergande. Importé accidentellement il y a une dizaine d'années en Europe, probablement avec des cultures florales, cet insecte polyphage apprécie la luzerne cultivée en serre où ses piqûres crispent les organes végétaux et ralentissent la croissance. La lutte chimique est particulièrement difficile contre cet insecte. Elle est pratiquement inutilisable pour protéger les plantes dans nos tests puisqu'elle empêcherait la multiplication des pucerons. Il convient d'être très vigilant quant à la contamination des plantes par ce Thysanoptère.

#### 4. Bilan : intérêt de la méthode

Suite à la demande exprimée par les sélectionneurs français de l'ACVF, notre souci a été de fournir **un test standardisé qui puisse être comparatif pour des expérimentations multilocales**. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de le conduire **en conditions contrôlées**. Cela nous a amenés à retenir des dispositifs peu encombrants et normalisés. Un autre intérêt de notre méthodologie par rapport aux éléments disponibles dans la bibliographie est **la précision relative aux conditions de multiplication et d'infestation des aphides**. Ces conditions doivent garantir un inoculum de qualité optimale : c'est pourquoi nous nous sommes attachés à préciser les conditions d'élevage des pucerons et les conditions pour obtenir la quantité nécessaire au test, en évitant le recours à une population récemment recueillie à l'extérieur qui peut présenter des risques d'introduction de facteurs de régulation naturelle des aphides (mycoses à entomophthorales et parasitisme par divers Hyménoptères). Enfin, nous avons adapté la biomasse d'aphides infestante à notre dispositif élémentaire, ce qui nous permet d'obtenir **le résultat d'un test dans des délais de moins d'un mois**. Cette prise en compte d'une biomasse est d'une plus grande précision que les éléments publiés qui se réfèrent à un taux d'infestation minimum de deux aphides par plante (BERBERET *et al.*, 1991) sans en indiquer la limite. La standardisation nous paraît essentielle à ce niveau car, selon la procédure d'infestation, on peut faire varier sensiblement les résultats.

#### ■ Charge de travail

Si l'on comptabilise le temps de multiplication des pucerons nécessaires à l'infestation, **ce test s'étale sur une quarantaine de**

**jours, dont une dizaine qui nécessite deux personnes si l'on réalise l'estimation d'une demi-douzaine de cultivars.** Pour économiser la production de pucerons infestants, nous avons réduit la taille de l'unité élémentaire à son minimum. L'utilisation de plaques alvéolées en matière plastique permet de minimiser le volume offert à chaque plantule. Elle est probablement moins favorable à l'évolution des plantules que les pots de tourbe qui ont été rapportés dans notre étude antérieure. Elle exige d'être attentif au bon arrosage des plantes.

La multiplication initiale des aphides demande deux semaines, en partant d'une souche déjà établie qui ne présente pas de risque d'altération de son état sanitaire. La pesée d'adultes lors de chaque infestation est un critère de surveillance de l'état de cette souche, qui doit être une population. La disponibilité de luzernes saines pour produire suffisamment d'aphides en deux semaines d'élevage est une nécessité absolue afin d'éviter la contamination des plantes par les Thysanoptères.

### ■ Critères de résistance

Le critère de résistance dans ce type de test fait référence à l'état de la plante. **Pour les besoins des sélectionneurs, la prise en compte de la survie des plantules au terme du test est suffisante. La notation de l'état des plantes survivantes, qui peut être plus précise (selon qu'on s'intéresse à leur stade, à leur hauteur ou à leur biomasse), alourdit le protocole et ne fait pas progresser de façon sensible le choix des plantes.** Un point essentiel d'exécution du test concerne la réalisation des premières contaminations au stade "cotylédons ouverts" des plantules dans les conditions exposées ci-dessus. Tout retard de contamination fausse l'expression de la mortalité et le niveau des résultats. On doit donc impérativement se fonder sur des repères phénologiques et non sur le calendrier pour réaliser les infestations. Ces contraintes sont cependant moins élevées que celles auxquelles on est soumis lorsque l'on pratique des tests d'évaluation de la résistance fondés sur des critères biologiques du puceron (BOURNOVILLE, 1977 ; GIROUSSE et BOURNOVILLE, 1994).

### ■ Criblage des cultivars et gamme de variation

Nous signalons par ailleurs (GIROUSSE *et al.*, 1999) que ce type de test doit mettre en oeuvre un nombre d'unités élémentaires permettant d'associer fiabilité et puissance du dispositif. Dans un ensemble de 8 tests successifs incluant de 3 à 6 cultivars, les pourcentages de plantules mortes des unités infestées ont varié de 9,7% à 94%, l'écart maximum entre des cultivars différents inclus dans la même série de test étant de 73%. Dans ces expériences, le cultivar signalé comme référence de sensibilité, Milfeuill, a présenté une moyenne de 82,1% de mortalité et le cultivar témoin de résistance, CUF 101, 16,8%. Cela situe la différence entre les deux catégories majeures de cultivars. Toutefois, dans une série de tests qui se sont étendus sur un an et demi, on a noté **des variations de mortalité pour le cultivar sensible de référence (Milfeuill), avec des valeurs de 70 à 94% de plantules**

**mortes en fin de test.** C'est sur la base de ces variations qu'on a pu établir le nombre d'unités élémentaires nécessaires par cultivar pour permettre la mise en évidence de différences de mortalité entre cultivars de l'ordre de 20% : si on choisit des niveaux de risques de 5% pour le risque de 1<sup>re</sup> espèce et de 10% pour le risque de 2<sup>e</sup> espèce, on trouve qu'il faut disposer de 6 répétitions par cultivar (soit 300 plantules).

Les résultats présentés à propos des variations relatives de lignées de référence dans diverses expériences ne doivent pas être interprétés de façon trop restrictive. S'il est vrai qu'on doit, dans chaque série de tests, introduire un cultivar témoin de sensibilité ou de résistance, sa variation dans une gamme modérée ne doit pas gêner l'interprétation. De même, la signification pratique des résultats, au-delà des conclusions des analyses de variance portant sur chaque série de tests, doit se référer également à des repères fondés sur l'expérience qui permettent de ranger les cultivars en des classes suffisamment distinctes. **Sur la base de la pratique acquise** avec cette méthodologie, nous proposons de **distinguer trois catégories de cultivars : les cultivars résistants qui présentent moins du tiers de mortalité, les sensibles qui excèdent les deux-tiers de mortalité, et une catégorie intermédiaire.** Dans aucune de nos expériences, les cultivars d'une catégorie déterminée n'ont dépassé ces limites. Toute distinction plus précise nécessite d'accroître la puissance de l'essai en mettant en jeu un plus grand nombre de répétitions ce qui, pour une unité de surface disponible constante dans une pièce climatisée, diminue le nombre de cultivars que l'on peut tester. Elle ne présente pas d'emblée un très grand intérêt pour le criblage de cultivars ou lignées de luzerne. La recherche des plantes résistantes dans une même lignée expérimentale correspond à une autre démarche où l'on peut souhaiter favoriser le nombre de plantes disposées par lignée dans un même essai. Ce choix est fonction des objectifs du sélectionneur dans l'utilisation de ce test.

Accepté pour publication, le 6 avril 1999.

### Remerciements

Nous remercions la section Fourragère de l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères de son soutien financier pour la réalisation de ce programme.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BADENHAUSSER I., BOURNOVILLE R., DEVAL R., DURAND J.L., LERIN J. (1994) : "Pea aphid (Homoptera : Aphididae) and water deficit interaction on Alfalfa stem growth", *J.econ.Entomol.*, 1689-1695.
- BERBERET R.C., CADDEL J.L., ZARRABI A.A. (1991) : "Pea aphid resistance", *Standard tests to characterize alfalfa cultivars*, Fox C.C., Berberet R.C., Gray F.A., Grau C.R., Jessen D.L., Peterson M.A., ed., 3<sup>rd</sup> edition, *North American alfalfa conference*.
- BOURNOVILLE R. (1976) : "Enquête sur les insectes nuisibles à la luzerne en production de fourrage", *Comptes-rendus réunion EUCARPIA, Groupe Medicago sativa*, Piestany (Tchécoslovaquie), Vurv ed., Piestany, 83-86.

- BOURNOVILLE R. (1977) : "Premiers résultats sur l'étude en France du comportement variétal de la luzerne (*Medicago sativa* L.) à l'égard du puceron du pois (*Acyrtosiphon pisum* Harris) (Homoptera : Aphididae) et du phytonome (*Hypera variabilis* Herbst.) (Coleoptera : Curculionidae)", *Bull SROP/OILB*, 3,97-101.
- BOURNOVILLE R. (1978) : "Relationships between alfalfa cropping practices in deshydration areas and pests populations", *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. green crop drying Cong.*, R.E. Howarth ed., University of Saksatchewan, Saskatoon,138-141.
- BOURNOVILLE R. (1981) : "Variability of the net reproductive rate of clones of the pea aphid on luzerne", *Bull OILB/SROP*, 4, 129-132.
- BOURNOVILLE R., CANTOT P. (1980) : "Variations d'effectifs des principaux insectes nuisibles à la luzerne selon le rang de la pousse et l'âge de la culture", *Fourrages*, 84, 113-129.
- BOURNOVILLE R., DONTCHEV K., SEDIVY J. (1984) : "Les ravageurs de la production de graines de luzerne en Europe", *Comptes-rendus réunion EUCARPIA, groupe Medicago sativa*, Brno (Tchécoslovaquie), OSEVA éd., Troubsko, 359-364.
- CUPERUS G.W., RADCLIFFE E.B., BARNES D.K., MARTEN G.C. (1982) : "Economic injury levels and economic thresholds for pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), on alfalfa", *Crop Protection*, 1, 4, 453-463.
- GAYRAUD P. (1994) : "The seeds production and the development of modern cultivars", *Eucarpia/FAO meeting, Management and breeding of perennial lucern for diversified purposes*, Lusignan (France), 264-270.
- GILLESPIE D.R., MENZIES J.G. (1993) : "Fungus gnats vector *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*", *Ann. appl. Biol.*, 123, 539-544.
- GIROUSSE C., BOURNOVILLE R. (1994) : "Biological criteria of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris and varietal resistance of luzerne", *Eucarpia/FAO meeting, Management and breeding of perennial lucern for diversified purposes*, Lusignan (France), 251-253.
- GIROUSSE C., BOURNOVILLE R., BADENHAUSSER I. (1999) : "Evaluation of alfalfa resistance to the pea aphid. Methodological aspects to improve a standardized seedling test", *Phytoprotection*, 79, 3 (sous presse).
- GONDRAN J. (1978) : "Tests de résistance utilisables en sélection", *Données utiles au sélectionneur pour améliorer la résistance des luzernes à l'égard des maladies et ravageurs*, Massenot M., Editions. SEI, CNRA, Versailles, n°64, 17-24.
- HACQUET J. (1997) : "Luzerne, mesurez la rentabilité de vos cultures", *Bull. Fed. natl. Agric. mult. Semen.*, 140, 21-22.
- HARPER A.M., LILLY C.E. (1966) : "Effects of the pea aphid on alfalfa in southern Alberta", *J. Econ. Entomol.*, 59, 1426-1427.
- LECLERCQ D., CAUBEL G. (1991) : "Résistance variétale de la luzerne au nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev ; test d'évaluation et application en sélection", *Agronomie*, 11, 603-612.
- LONNET P. (1996) : "Objectifs et critères actuels de la sélection des luzernes pérennes", *Fourrages*, 147, 303-308.
- THIEULEUX J. (1988) : *Résultats du suivi des maladies et ravageurs de la luzerne en Champagne Ardennes*, Rapport du Service régional de la Protection des végétaux "Champagne-Ardenne", 8p + tableaux.

SUMMARY

**Methodology for estimating the resistance of Lucerne to the Pea aphid : description and use**

As the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum* Harris) is one of the main pests of lucerne in France, plant breeders are interested in a general method to characterize the resistance of cultivars to this aphid. The different steps of a test are described, that, in order to standardize the method, evaluates the resistance of the seedlings to aphid infestation under controlled conditions (20°C, 16 h photoperiod). The best way to multiply the aphid biomass necessary for seedling infestation is to breed them on shoots of lucerne in a growth chamber. A unit of infestation consists in a plastic box containing 50 seedlings with the cotyledons just opened. Each unit is infested twice, at an interval of 6 days, with an aphid biomass of 150 mg. On day 13th, the infestation is stopped by an insecticide spray. Chlorosis and wilting appear before death occurs. Two weeks after the end of the aphid infestation, the percentage of dead seedlings is recorded. Six units per cultivar are enough to distinguish between cultivars differing by 20% in seedling mortality. Care must be taken when watering the seedlings if interferences with other factors of mortality are to be avoided, such as attacks by other insects : e.g. larvae of dark-winged fungus gnats (*Sciaridae*) and thrips (*Frankliniella occidentalis*). There is a discussion on the ease of application of the method and on the distribution of the cultivars into three classes : susceptible cultivars (less than one third of seedlings surviving), resistant (over two thirds surviving), and intermediate.